



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**DETERMINACIÓN DE LA IMPORTANCIA DE  
CTCF EN LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS  
TRONCALES EMBRIONARIAS HUMANAS  
HACIA NEURONAS DOPAMINÉRGICAS**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:**

**CÉSAR DANIEL MELÉNDEZ RAMÍREZ**



**DIRECTOR DE TESIS:  
DR. JAIME IVÁN VELASCO VELAZQUEZ**

**Ciudad Universitaria, CD. MX. 2018**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## Agradecimientos

Este trabajo se realizó en el laboratorio del Doctor Jaime Iván Velasco Velázquez en el Instituto de Fisiología celular de la UNAM.

Agradezco a mis sinodales por el tiempo dedicado en la revisión de mi tesis, por sus comentarios y la orientación brindada:

Dr. Ernesto Soto Reyes Solís	Instituto Nacional de Cancerología
Dr. Jaime Iván Velasco Velázquez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dra. Mayra Furlan Magaril	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Víctor Julián Valdés Rodríguez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico-UNAM (Papiit-UNAM IN 213716) por la financiación otorgada para la realización de este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt 272815) por la financiación otorgada para la realización de este trabajo, así como una beca para realización de tesis del mismo proyecto.

Al taller de epigenética, por darle seguimiento a mi formación y a mi proyecto, así como orientarme metodológicamente y proporcionarme material para facilitar mi avance:

Dr. Ernesto Soto Reyes Solís	Instituto Nacional de Cancerología
Dr. Rodrigo González Barrios de la Parra	Instituto Nacional de Cancerología
M. En C. Lissania Ximena Guerra Calderas	Instituto Nacional de Cancerología
M. En C. Manuel Flores León	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dra. Yessenia Sánchez Pérez	Instituto Nacional de Cancerología

Al Dr. Daniel Édgar Cortés Pérez y a la Dra. Itzel Escobedo Ávila del Instituto de Fisiología celular por todo el apoyo técnico proporcionado durante la realización este trabajo.

## **Dedicatorias**

A mis padres, Ana y César, por toda la paciencia, amor y cariño que pusieron en mi crianza. Así como por confiar en mí y brindarme su apoyo incondicional a lo largo de toda mi vida.

A mi hermana, Paola, por acompañarme desde el principio y siempre ser sincera conmigo.

A mis abuelos, por sus muestras de cariño incondicional, además de sus consejos y enseñanzas tan valiosos.

Al Doctor Iván, por toda la orientación y apoyo que me brindo, tanto en mi formación académica como en la realización de este proyecto, y sobre todo por confiar en mí.

Al Dr. Ernesto, el Dr. Rodrigo, la Dra. Yessenia y la M. en C. Lissania, por el tiempo dedicado a mi formación y a mi proyecto. Y, sobre todo por haberme integrado al laboratorio correcto.

A Adolfo, por todo su apoyo. Por siempre estar dispuesto a enseñarme cosas para llevar a cabo mi proyecto y por su amistad.

A Daniel, por ser un técnico académico tan comprometido con el laboratorio y nuestros proyectos. Un ejemplo a seguir.

A Itzel, por ir mas allá de sus obligaciones de técnico académico y haberme orientado con mis experimentos, además de preocuparse por mí.

A Fernanda, por introducirme en el laboratorio y ayudarme en el planteamiento de mí proyecto.

A Karla y a Alex, por enseñarme cosas tan valiosas para el desarrollo de mí proyecto.

A Manuel, por haberle puesto tanta atención a mi formación, enseñarme tantas cosas e involucrarse en mi proyecto como si también fuera suyo, y en especial por su amistad.

A Xóchitl, José Luis, Rolando, Oscar, Majo, Alonso, Beetsi y Karla Itzel, por hacer única mi estancia en el laboratorio y porque de cada uno de ustedes he aprendido muchísimas cosas.

A mis compañeros de taller, Iker, Yan, Karla y Mirna, por todos sus consejos y compañerismo.

Y a todos mis demás amigos y familiares, por hacer de mi vida una historia tan llena de felicidad. No me olvido de ninguno.

## **Índice:**

1 Abreviaturas	6
2 Resumen	8
3 Introducción	
3.1 Células troncales	9
3.2 Vías de mantenimiento de la pluripotencia	12
3.3 Diferenciación celular y desarrollo temprano	14
3.4 Desarrollo de las neuronas dopaminérgicas	15
3.5 Diferenciación de ESC humanas hacia neuronas dopaminérgicas	18
3.6 Diferenciación celular y cromatina	20
3.7 La proteína arquitectónica de la cromatina CTCF	20
3.8 CTCF y la reorganización nuclear durante la diferenciación	22
3.9 CTCF y el desarrollo del Sistema Nervioso Central	24
4 Planteamiento del problema	26
4.1 Pregunta de investigación	26
4.2 Hipótesis	26
4.3 Objetivo general	26
4.4 Objetivos particulares	26
4.5 Estrategia experimental	26
5 Material y Métodos	
5.1 Cultivo celular	27
5.2 Inmunofluorescencia	29
5.3 Obtención de RNA	30
5.4 Obtención del cDNA y análisis de expresión por secuenciación de RNA	31
5.5 Análisis de los niveles proteicos de CTCF por inmunofluorescencia	31
5.6 Western Blot	31
5.7 Análisis de la dinámica espacial de CTCF por inmunofluorescencia	32
5.7 Análisis estadístico	34
6 Resultados	

6.1 Caracterización del estado de pluripotencia de la línea celular de células troncales embrionarias humanas H9 GFP	35
6.2 Diferenciación de las células troncales H9GFP hacia neuronas dopaminérgicas mesencefálicas	36
6.3 Localización subcelular de CTCF mediante inmunofluorescencia a lo largo de la diferenciación dopaminérgica	37
6.4 Evaluación de los niveles transcripcionales de CTCF a lo largo de la diferenciación dopaminérgica mediante RNA-seq	40
6.5 Evaluación de los niveles proteicos de CTCF a lo largo de la diferenciación dopaminérgica mediante Inmunofluorescencia	42
6.6 Evaluación de la dinámica espacial de CTCF con respecto a la compactación nuclear a lo largo de la diferenciación dopaminérgica mediante inmunofluorescencia	43
6.7 Evaluación de los niveles proteicos de CTCF a lo largo de la diferenciación dopaminérgica mediante <i>Western blot</i>	45
7 Discusión	46
8 Conclusión	52
9 Perspectivas	53
10 Referencias	54

## 1 Abreviaturas

ALK	Receptor herterodimérico con actividad de quinasa serina/treonina (por sus iniciales inglés)
BMP4	Proteína morfogénica de hueso 4 (por sus iniciales en inglés)
BORIS	Hermano de regulación para los sitios improntados (por sus iniciales en inglés)
BDNF	Factor derivado del cerebro
CTCF	Factor de unión a CCCTC (por sus iniciales en inglés)
CTCFL	Parecido al facotor de unión a CCCTC (por sus iniciales en inglés)
DVL	Disheveled
EN1	Engrailed Homeobox 1
EN2	Engrailed Homeobox 2
ESCs	Células troncales embrionarias (por sus iniciales en inglés)
EP	Enfermedad de Parkinson
FGFb	Factor de crecimiento fibroblástico básico (por sus iniciales en inglés)
FGF8	Factor de crecimiento fibroblástico 8 (por sus iniciales en inglés)
FOXA2	Forkhead Box A2
FP	Placa de piso (por sus iniciales en inglés)
FPKM	Fragmentos por kilo base millón.
FRZ	Frizzled
GBX2	Gastrulation Brain Homeobox 2
GDNF	Factor neurotrófico derivado de la glía
H3K3me1	Monometilacion de la lisina tres de la histona tres
H3K3me3	Trimetilacion de la lisina tres de la histona tres
H3K9me3	Trimetilacion de la lisina nueve de la histona tres
H3K27ac	Acetilación de la lisina veintisiete de la histona tres
H3K27me3	Trimetilacion de la lisina veintisiete de la histona tres
H3K36me3	Trimetilacion de la lisina treinta y seis de la histona tres
MEFs	Fibroblastos embrionarios de ratón
hESCs	Células troncales embrionarias humanas (por sus iniciales en inglés)
ICM	Masa celular interna (por sus iniciales en inglés)
IGF	Factor de crecimiento insulínico tipo 1 (por sus iniciales en inglés)
iPSC	Célula troncal pluripotente inducida (por sus iniciales en inglés)
KLF4	Factor parecido a krupel 4 (por sus iniciales en inglés)
LIF	Factor inhibidor de leucemia
LMX1B	LIM Homeobox Transcription Factor 1 Beta
LRK	Lipoproteína asociada a receptor
LRRK2	Cinasa rica en repeticiones de leucina
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos (por sus iniciales en inglés)

mDA	Neuronas dopaminérgicas mesencefálicas (por sus iniciales en inglés)
MEFs	Fibroblastos embrionarios de ratón
MSX1	Msh Homeobox 1
MSX2	Msh Homeobox 2
MYOD1	Diferenciación miogénica 1 (por sus iniciales en inglés)
NGN2	Neurogenina 2
NURR1	Receptor nuclear 2 del grupo A de la subfamilia 4
OTX2	Orthodenticle Homeobox 2
PAX2	Paired Box 2
PAX5	Paired Box 5
PAX6	Paired Box 5
PBS	Amortiguador de fosfato (por sus iniciales en inglés)
PFA	Paraformaldehído
PITX3	Paired Like Homeodomain 3
PI3K	Fosfoinositol 3-quinasa
PRCN	Porcupine
SCs	Células troncales (por sus iniciales en inglés)
SMADs	Madres contra el homólogo de decapentaplégico (por sus iniciales en inglés)
SNC	Suero normal de cabra
SHH	Sonic el erizo (del inglés)
SSEA3	Antígeno glicolipídico etapa específico 3 (por sus iniciales en inglés)
SSEA4	Antígeno glicolipídico etapa específico 4 (por sus iniciales en inglés)
TE	Trofoectodermo
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante beta (por sus iniciales en inglés)
TH	Tirosina hidroxilasa
TNAP	Fosfatasa alcalina tejidos específica (por sus iniciales en inglés)
TUJ1	$\beta$ -Tubulina III
WNT	Proteína parecida a Wingless (por sus iniciales en inglés)
WNT1	Proteína parecida a Wingless 1 (por sus iniciales en inglés)
WNT11	Proteína parecida a Wingless 11 (por sus iniciales en inglés)
YY1	Yin Yang 1



## 2 Resumen

Las células troncales embrionarias son células pluripotenciales, indiferenciadas y que se caracterizan por su autorrenovación y potencial de diferenciación hacia todo tipo celular proveniente de las tres capas germinales embrionarias. Se han diseñado protocolos de diferenciación de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas humanas partiendo de células troncales embrionarias. Con las células ya diferenciadas se pueden estudiar aspectos importantes del desarrollo de este subtipo neuronal tan importante, que además es el principal tipo celular afectado en la enfermedad de Parkinson.

Las estructuras cromatínicas de alto orden experimentan remodelaciones asociadas a procesos como la diferenciación celular, las cuales repercuten en la expresión génica. Esta reestructuración está mediada por un grupo de proteínas arquitectónicas, como la proteína CTCF. Hay estudios que implican a CTCF en mecanismos de desarrollo y de diferenciación en distintos linajes celulares. Se ha reportado, mediante hibridación *in situ*, un alto nivel de expresión de CTCF en el sistema nervioso central del ratón, durante los días embrionarios en los que ocurre la neurogénesis; además, estudios *in vitro* han reportado cambios en los niveles de expresión y ocupación de CTCF durante algunos estadios de la diferenciación de ciertos subtipos neuronales murinos. Sin embargo, no se ha evaluado si este proceso ocurre durante la diferenciación de células humanas, ni se han dirigido estudios hacia el linaje dopaminérgico. Por lo que el objetivo de este trabajo es determinar si existe una dinámica de expresión y niveles proteicos de CTCF durante la diferenciación de células troncales embrionarias humanas hacia neuronas dopaminérgicas mesencefálicas.

Durante el estudio se diferenciaron células troncales humanas hacia neuronas dopaminérgicas y se determinaron mediante distintas técnicas los niveles de CTCF en tres puntos de la diferenciación: el día 0, el día 14 y el día 28. Se observó una disminución significativa en los niveles CTCF a nivel de transcrito y a nivel de proteína en el día 14 de diferenciación, cambio que no se observó en los otros dos tiempos evaluados. Estos resultados sugieren que CTCF atraviesa un proceso de regulación particular durante la diferenciación dopaminérgica, en el que se requiere disminuir su expresión durante el estadio de los precursores neurales para el correcto establecimiento de la arquitectura nuclear neuronal y por lo tanto del programa transcripcional de este subtipo celular.

### 3 Introducción

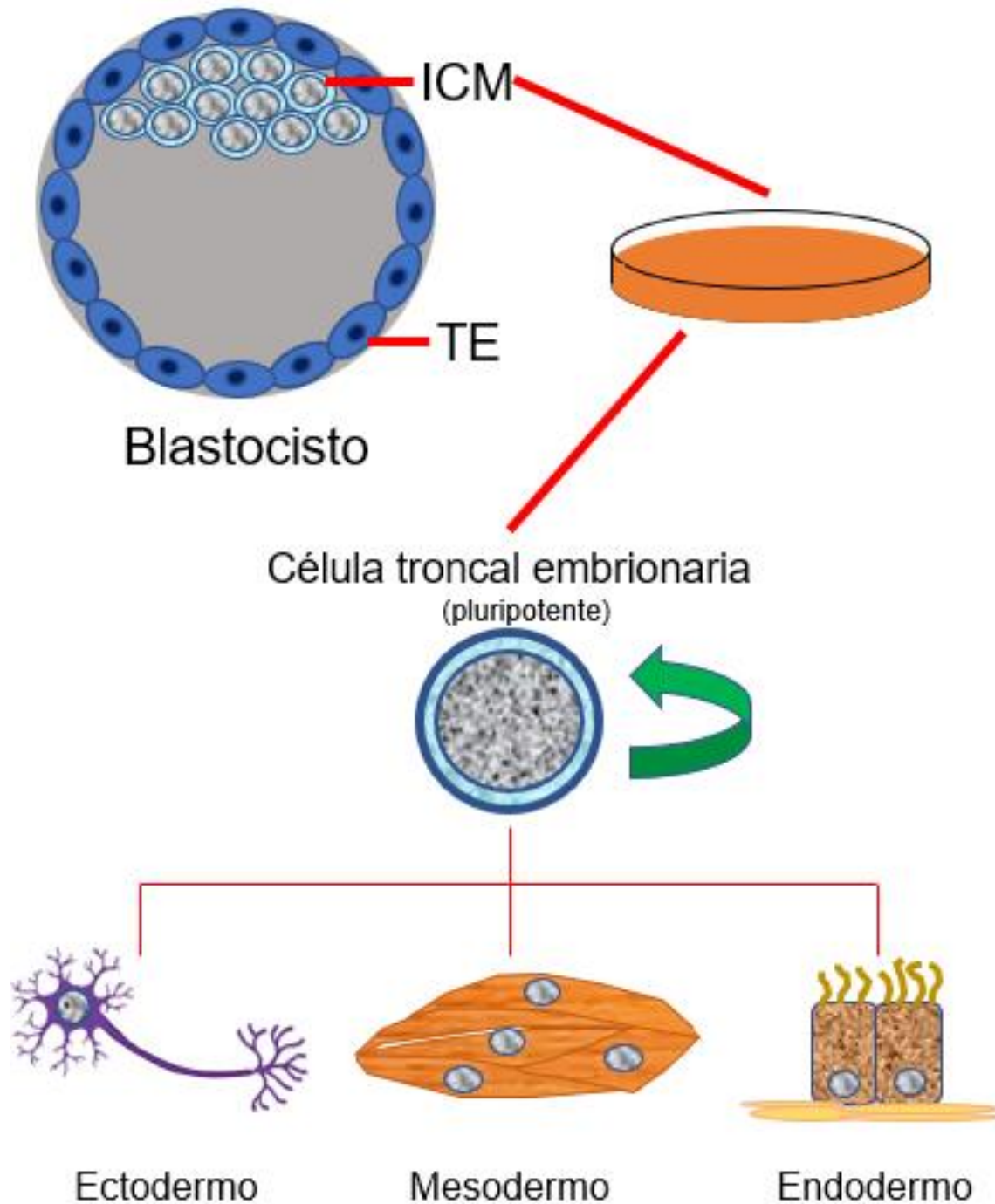
#### 3.1 Células Troncales:

Las células troncales (SCs; por sus siglas en inglés) son células indiferenciadas caracterizadas por su capacidad de autorrenovación a largo plazo y su habilidad para diferenciarse hacia distintos tipos celulares (Cogle et al., 2003; Thomson et al., 1998; van Hoof et al., 2012). Existe más de un tipo de SCs, según la variedad de tejidos a los que pueden dar lugar. Los cigotos son clasificados como células totipotenciales, porque pueden dar origen a cualquier tejido del embrión, pero también a los tejidos extraembrionarios de soporte. Antes de la implantación del embrión, las células del nuevo organismo, comienzan su especialización y se agrupan en distintas poblaciones, formando una capa celular externa (trofoblasto), la masa celular interna (ICM; por sus siglas en inglés) y el endodermo primitivo (Cogle et al., 2003; Rossant, 2007). Al cultivarse, cada una de estas poblaciones origina un linaje de SCs distinto. Las SCs del trofoblasto y las del endodermo extraembrionario no pueden formar tejidos de origen embrionario. De la ICM se derivan las células troncales embrionarias (ESCs), las cuales son pluripotenciales, porque pueden dar lugar a las células de cualquier tejido de las tres capas germinales embrionarias (endodermo, mesodermo y ectodermo), pero no a células del tejido extraembrionario, como la placenta. Las ESCs pueden mantenerse pluripotentes indefinidamente en condiciones específicas de cultivo celular (**Fig. 1**) (Thomson and Marshall, 1998; Rossant, 2007).

Hasta la fecha se han derivado una gran cantidad de líneas de SCs provenientes de embriones en etapas de desarrollo temprano de distintas especies de mamíferos. La primera se originó a partir de un blastocisto de ratón (Evans and Kaufman, 1981). Se comprobó la capacidad de estas células para contribuir al el desarrollo de tejidos originados de las tres capas germinales, tras ser inyectadas dentro de blastocistos en desarrollo (incluso a células de la línea germinal), formando organismos quiméricos; la contribución a todos los tejidos, incluyendo los gametos, se ha consolidado como la máxima prueba de pluripotencia (Bradley et al. 1984). Este logro fue seguido por la derivación de SCs de otros roedores (Doetschman et al., 1988; Iannaccone et al. 1994) y primates no humanos como los macacos Rhesus (*Macaca mulatta*) (Thomson et al., 1995).

Las primeras cinco líneas de células troncales embrionarias humanas (hESCs) (H1, H13, H14, H7 y H9) fueron derivadas y descritas por Thomson et al., (1998). Cada una se obtuvo a partir del cultivo de catorce células de la ICM de embriones humanos, cuyos cigotos fueron producidos por medio de fertilización *in vitro*, y donados para investigación bajo consentimiento informado de los padres. Las líneas celulares presentaron cariotipos normales (46XY las tres primeras; y 46XX para las restantes) (Thomson et al., 1998). No ha sido posible, por razones de ética, comprobar si estas líneas tienen la capacidad de contribuir a los tejidos de las tres capas embrionarias después de ser inyectadas en un blastocisto (Amit & Itskovitz-Eldor, 2002). Pero desde luego, se les ha sometido a otras pruebas de pluripotencia importantes, como la formación de teratomas con componentes celulares de las tres capas germinales al ser inyectadas en ratones inmunosuprimidos y la expresión de proteínas asociadas a la pluripotencia (Thomson et al., 1998).

Algunas de estas proteínas expresadas por las ESCs son factores reguladores muy importantes para el mantenimiento de la pluripotencia, como POU5F1/OCT4, NANOG y SOX2 (Nichols et al., 1998; Niwa et al., 2000; Mitsui et al., 2003). También expresan marcadores moleculares de superficie como los antígenos embrionarios glicolípidicos etapa específicos (SSEA3 y SSEA 4), los antígenos de queratán sulfato (TRA-1-60, TrRA-1-81, GCTM2 y GCT343), y los antígenos proteicos CD9, THY1 y HLA1. Enzimáticamente, se caracterizan por tener alta actividad de la fosfatasa alcalina tejido inespecífica (TNAP) y de la telomerasa, proteína que impide el acortamiento de los telómeros dependiente de la división celular, mediante la adición de secuencias repetidas (TTAGGG) en el extremo terminal de estos, confiriéndoles así, la capacidad de continua autorrenovación (Thomson et al. 1998; De Miguel et al., 2010). La pérdida de estos atributos se asocia a la diferenciación. Debido a que estas líneas celulares no se formaron de la expansión clonal de una sola célula, existe la posibilidad de que haya heterogeneidad en la eficiencia de diferenciación.



**Figura 1.** En la parte superior se muestra la población de la ICM del blastocisto y el trofoblasto (TE) en su parte exterior. Las ESCs se obtienen al cultivar la ICM, la flecha verde indica su alta capacidad de autorenovación, es decir su habilidad de mantenerse indefinidamente en condiciones de cultivo celular. Son pluripotenciales, tienen la capacidad de diferenciarse a cualquier tejido de las tres capas germinales embrionarias: ectodermo, como células nerviosas; mesodermo, como el músculo esquelético, y endodermo que da lugar a los epitelios.

### 3.2 Vías de mantenimiento de la pluripotencia:

Como se mencionó anteriormente, la capacidad de las ESCs para mantener su estado pluripotente, depende de factores transcripcionales específicos, vías de señalización, modificaciones postraduccionales de las histonas, RNAs regulatorios y modificadores de la cromatina (Guenther, 2011). Algunos de estos mecanismos han sido ampliamente descritos, mientras que otros no se han estudiado a profundidad.

Los factores transcripcionales juegan un papel muy importante en la determinación del estado celular, mediante su interacción con modificadores de la cromatina o directamente con la maquinaria transcripcional. Existen factores específicos que cumplen con funciones críticas durante el desarrollo y su expresión es necesaria para mantener el carácter pluripotente y de autorrenovación de las SCs, como los ya mencionados factores centrales de la pluripotencia: OCT4, SOX2 y NANOG (Guenther, 2011). No extraña que estos factores hayan sido los principales candidatos para reprogramar células somáticas terminalmente diferenciadas hacia un estado de pluripotencia, dando origen a las SCs pluripotenciales inducidas (iPSC; por sus siglas en inglés). Inesperadamente, NANOG resultó dispensable para este proceso; pues no fue necesario en el coctel mínimo necesario para conseguir la reprogramación, pues probablemente su expresión endógena es inducida rápidamente por factores como OCT4 (Takahashi & Yamanaka, 2006).

Se han esclarecido algunos de los mecanismos por los cuales se piensa que la triada de los factores de la pluripotencia actúa sobre el genoma. Se determinó que éstos comparten muchos sitios de unión a lo largo del genoma de mamífero, y que además tienen la capacidad de co-ocupar estos *loci* (Boyer et al., 2005). Algunos corresponden a elementos reguladores de genes codificantes para proteínas vinculadas con el mantenimiento de la pluripotencia, mientras que otros son sitios que corresponden a genes que deben ser silenciados, puesto que codifican para proteínas necesarias para el desarrollo, como son los controladores de la especificación a ectodermo, endodermo y mesodermo. También se determinó que cada una de estas proteínas interactúa directamente con su propio gen y con el de las otras dos proteínas de la triada, estableciendo así un robusto sistema de auto-mantenimiento del programa pluripotente (Boyer et al., 2005).

También han sido descritos otros factores transcripcionales involucrados, como KLF4, SALL4, ESRRB, entre otros. Y aun no se sabe con certeza cómo es que el mismo grupo de factores transcripcionales que pueden activar transcripcionalmente un grupo determinado de genes, pueden funcionar también en procesos de represión. Sin embargo, se ha sugerido que pudiera deberse a una co-ocupación con elementos modificadores de la cromatina que son específicos para cada *locus* (Boyer et al., 2005).

Las cascadas de señalización también juegan un papel crucial en el mantenimiento de la pluripotencia. Se sabe que las vías de LIF y BMP4 son esenciales para el mantenimiento de la pluripotencia de las ESCs de ratón; sin embargo, se ha visto que la actividad de estas vías no tiene el mismo efecto en hESCs (Vallier, 2005). Se ha descrito que más que una diferencia entre especies, esto podría deberse al estado de diferenciación en el que las células se encuentran; donde las células murinas se encuentran en un estado *naive*, un estado más primitivo o temprano en el desarrollo, mientras que las humanas están en estado *primed* o “preparado” para la diferenciación (Nichols and Smith, 2009; Hackett and Surani, 2014).

Se sabe que el Factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) es necesario para mantener la autorrenovación de las hESC mediante la vía de MAPK, la cual podría desencadenar en la activación de redes transcripcionales (Ohtsuka & Dalton, 2008). Así mismo, los agonistas de la vía PI3K (IGF/insulina) también podrían estar promoviendo la supervivencia y la autorrenovación de las hESC. Además, se ha reportado que la vía de MAPK podría estar involucrada en la supresión de vías necesarias para el compromiso celular (Ohtsuka & Dalton, 2008).

La vía de WNT también es necesaria para el mantenimiento de la pluripotencia (Sato et al., 2004). Las WNTs son glicoproteínas que son secretadas y posteriormente acetiladas por la proteína Porcupine (PCRN). Tras este proceso, las WNTs pueden unirse al co-receptor formado por la proteína de siete dominios transmembranales Frizzled (FRZ) y la lipoproteína asociada a receptor 5/6 (LRK por sus siglas en inglés), dando lugar a la activación de la proteína Disheveled (DVL), la cual evita la degradación de  $\beta$ -Catenina, proteína que se asocia con factores transcripcionales y se transloca al núcleo para iniciar la transcripción de los genes blanco (Huelsken & Behrens, 2002; Sato et al., 2004).

Se sabe que los ligandos TGF- $\beta$ , Activina y Nodal también son elementos necesarios para el mantenimiento de la pluripotencia (Beattie et al., 2005; Xu et al., 2008); estos pertenecen a la súper familia TGF- $\beta$ . Su unión a los receptores heterodiméricos con actividad

de cinasa de serina/treonina (ALKs, por sus siglas en inglés) produce la activación por fosforilación de las proteínas SMADs. Los ligandos TGF-  $\beta$ , Nodal, y Activinas, activan a las SMADs 2 y 3 por medio de los receptores ALK4, ALK5 y ALK7, mientras que las proteínas morfogénicas de hueso (BMPs, por sus siglas en inglés), y los factores de crecimiento y diferenciación activan a las SMADs 1, 5 y 8, por medio de los receptores ALK1, ALK2, ALK3 y ALK6, haciendo que éstas formen complejos entre sí, los cuales incluyen en común a la SMAD 4. Estos complejos fosforilados se translocan hacia el núcleo celular, donde regulan la transcripción de sus genes blanco; los cuales incluyen genes como NANOG (Beattie et al., 2005). La SMAD 6 es inhibitoria de la SMAD 1 y 5, y la SMAD 7 es inhibitoria de las dos ramas; actúan regulando el nivel de degradación de los receptores (James et al., 2005; Gaarenstroom and Hill, 2014).

### 3.3 Diferenciación celular y desarrollo temprano

En los mamíferos, el compromiso celular se dispara durante la embriogénesis temprana. Los mecanismos han sido ampliamente estudiados en modelos como el ratón; se ha reportado que posterior a la implantación del embrión, la ICM forma una capa de células llamada epiblasto (Tam & Behringer, 1997). Al inicio de la gastrulación, se forma la línea primitiva en la parte del epiblasto que dará lugar a la región posterior del embrión. En esta etapa, se generan las tres capas germinales y se determina el plan corporal, a partir del cual se guiarán los procesos morfogénicos del embrión (Tam and Behringer, 1997). Las células del epiblasto migran a través de la línea primitiva, formando al mesodermo o al endodermo definitivo (en el caso de las células que migran desde la parte más posterior de la línea primitiva). La inducción de los distintos linajes celulares es dependiente de las condiciones microambientales formadas por la regionalización de la línea primitiva, así de cómo la activación e inhibición coordinada de diferentes vías de señalización (BMP4, WNT y Nodal), afecta a las células aledañas. Así mismo, el ectodermo se deriva la piel y los linajes celulares neurales; la formación de éste en el embrión temprano ocurre a partir de células del epiblasto que nunca atraviesan la línea primitiva (Murry and Keller, 2008).

Los mecanismos involucrados en los procesos de diferenciación son muy complejos y aún no se han esclarecido del todo. Las señales involucradas en el compromiso celular requieren la interacción de muchos elementos intrínsecos y extrínsecos (Kim et al., 2016). Los

modelos *in vitro* de diferenciación de ESCs han sido una valiosa herramienta para recapitular el desarrollo embrionario temprano, y así poder estudiar los momentos clave de la determinación hacia distintos linajes celulares en modelos con condiciones más controladas (Murry and Keller, 2008). Gracias a la manipulación de distintas vías en estos modelos, se ha podido estudiar la dinámica de los elementos responsables de dirigir el proceso: factores de crecimiento, factores transcripcionales, cascadas de señalización, interacciones célula-célula (Snykers et al., 2009) y cambios epigenéticos (Kraushaar and Zhao, 2013).

### 3.4 Desarrollo de las neuronas dopaminérgicas

En el desarrollo de los mamíferos, posterior a la especificación de las tres capas germinales embrionarias, se forma un cúmulo de células llamado nódulo primitivo, que posteriormente da lugar a una estructura cordonosa denominada notocorda. Esta estructura longitudinal desempeña funciones de gran importancia, una de ellas es inducir el ectodermo suprayacente para su conversión en tejido neural. Este proceso está mediado por las señales de nogina y cordina que van desde la notocorda hasta el ectodermo, las cuales bloquean la actividad de las proteínas morfogénicas de hueso (BMP4), cuya ausencia hace que se produzca por defecto la formación del tejido neural (Carlson, 2014).

La inducción primaria desemboca en la neurulación, proceso en el que ocurre la transformación morfológica del ectodermo embrionario hacia una estructura engrosada denominada placa neural; la cual, posteriormente se estrecha y alarga, para después plegarse lateralmente a lo largo del surco neural, y así, con la fusión de las puntas más apicales de los pliegues, originar el cierre del tubo neural. Este proceso ocurre bidireccionalmente hacia las partes craneal y caudal, respectivamente. Para que la formación del sistema nervioso central se complete, se requiere de su regionalización, de manera que el tubo neural sufre una serie de segmentaciones (Carlson, 2014). El primer grupo de compartimentos que conformaran posteriormente al encéfalo son: el prosencéfalo, el mesencéfalo y el rombencéfalo (Carlson, 2014).

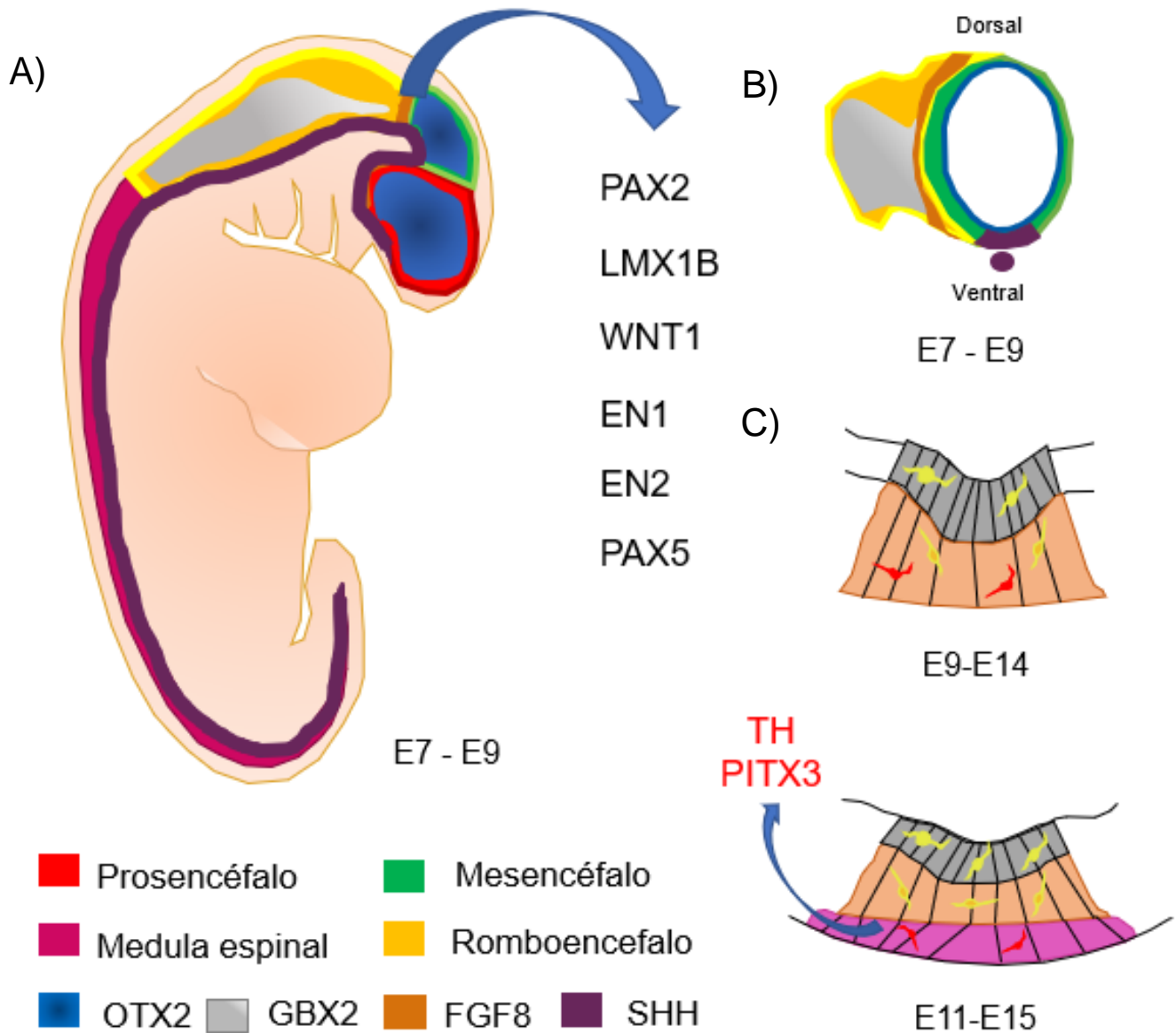
El mesencéfalo de un organismo adulto alberga la mayor parte de las neuronas dopaminérgicas del sistema nervioso central. Durante el desarrollo de esta región del tubo neural, la región de la placa de piso secreta el morfógeno Sonic Hedgehog (SHH), una proteína de señalización que está implicada con el desarrollo de distintas poblaciones de neuronas



dopaminérgicas. El organizador ístmico separa el mesencéfalo del rombencéfalo. Donde el posicionamiento de esta barrera es muy importante para el desarrollo de ambas regiones. Dicha frontera está delimitada por la expresión de dos factores que se reprimen mutuamente: OTX2, cuya expresión ocurre únicamente en el prosencéfalo y el mesencéfalo, y GBX2, cuya expresión está restringida a la parte más anterior del rombencéfalo. El organizador ístmico empieza a expresar otros factores como Pax2, LMX1B, WNT1 y EN1. Estos factores participan en inducir la expresión de FGF8, además de posicionarla en el organizador ístmico. Posteriormente, inicia la expresión de EN2 y PAX5 en esta misma frontera entre el mesencéfalo y el rombencéfalo (Hegarty, 2013).

En la parte anterior del tubo neural, surge una estructura delimitada por la expresión de FGF8, la cual es una barrera entre el mesencéfalo y el rombencéfalo. Algunas señales provenientes de esta región como la expresión de WNT1 y EN1/2 son necesarias para la supervivencia y proliferación de las células del mesencéfalo ventral, las cuales empiezan a delimitarse como una población compacta en la zona que posteriormente dará a la estructura desarrollada. La señalización de OTX2 también participa en la regulación del tamaño del mesencéfalo así como en su identidad posicional, mientras que SHH, afecta selectivamente a las células de esta región haciéndolas adquirir el compromiso celular hacia el linaje dopaminérgico (**Fig. 2**) (Gale & Li, 2008).

SHH se encuentra expresado en la porción más ventral del mesencéfalo, donde se originarán las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo (mDA); el resto del mesencéfalo se encuentra delimitado por la expresión de otros factores, mientras que flanqueando esta zona se encuentran los progenitores del núcleo rojo. Posteriormente, factores como LMX1A, LMX1B, NGN2, MSX1/2 y FOXA2 se encargan de que estas células adquieran la especificación neural de mDA. Al diferenciarse, las van migrando desde la zona proliferativa hacia zona ventra del mesencéfalo en donde empiezan a expresar NURR1 y PITX3. Finalmente, las neuronas expresan Tirosina hidroxilasa (TH), enzima limitante en la producción de dopamina durante la síntesis serial de las catecolaminas (**Fig. 2**) (Gale & Li, 2008).



**Figura 2:** **A)** Corte transversal de un embrión en E7-E9 en donde se muestra la regionalización del sistema nervioso central. Se señala con una flecha azul el organizador ístmico, así como los factores que son expresados desde éste y la localización de algunas moléculas importantes para este proceso, como OTX2, GBX2, FGF8 y SHH. **B)** Corte transversal del tubo neural en donde se muestra con colores los patrones de expresión de los genes que participan en la regionalización del mesencéfalo: OTX2, GBX2, FGF8 y SHH. **C)** Cortes transversales del mesencéfalo ventral en donde se muestra la maduración y migración de las neuronas dopaminérgicas. Las células amarillas en las regiones gris y naranja representan células inmaduras. Las células rojas en la región rosa representan neuronas dopaminérgicas maduras con expresión de TH y PITX3.

### 3.5 Diferenciación de ESCs humanas a neuronas dopaminérgicas

Es posible obtener precursores neurales con capacidad de diferenciarse hacia neuronas, astrocitos y oligodendrocitos a partir de ESCs (Okabe et al., 1996). Se ha definido usando cultivos de células troncales embrionarias que la inducción del neuroectodermo es la vía “por defecto”, pues ocurre en la ausencia de suero u otros inductores de la línea primitiva y es inhibida por los mismos. Sin embargo, se ha demostrado que al igual que en el mesodermo y endodermo es dependiente de vías de señalización. En este caso producida por el FGF secretado por las ESCs en diferenciación (Ying et al., 2003).

Las señales endógenas de Notch median la especificación neural de las ESCs hacia precursores neurales e impiden la posterior diferenciación de estos, permitiendo su expansión y supervivencia. Se piensa que esta vía no actúa en la inducción primaria, sino en la amplificación, sincronizando el proceso y homogeneizando los niveles de expresión de Sox1 al interior de las poblaciones celulares, además de inhibir la diferenciación hacia linajes no neurales (Lowell et al., 2006). La manipulación de esta vía y otras, además del refinamiento de las componentes en los medios de cultivo, han permitido perfeccionar la diferenciación de tal manera que ahora es posible obtener un subtipo neuronal preferentemente sobre los otros (Murry & Keller, 2008).

Inicialmente, las estrategias existentes para conseguir la neuralización de las hESC, consistían en la diferenciación espontánea tras el cultivo secuencial en condiciones basales, la adición de ácido retinoico y el cocultivo con algunos tipos de células estromales (Hoffman and Carpenter, 2005). Estos métodos se han podido perfeccionar gracias al conocimiento actual de las vías de señalización implicadas en la determinación del destino neural en el embrión, como la vía de SHH, que tiene un papel importante en el establecimiento del neuroectodermo, y por lo tanto en la formación de los derivados neurales (Maye et al., 2004). Se ha observado que la vía de WNT está implicada en el mantenimiento y la expansión de los progenitores neurales (Davidson et al., 2007). También se ha demostrado la importancia de la familia de factores de crecimiento fibroblástico y la superfamilia TGF-  $\beta$  en el desarrollo embrionario temprano de los vertebrados (Murry and Keller, 2008).

Como se mencionó anteriormente, el estudio de las neuronas mDA resulta muy importante por ser el principal tipo celular afectado en la Enfermedad de Parkinson (EP).

Se han definido distintos protocolos de diferenciación para producir neuronas mDA a partir de ESCs, los cuales pueden ser buenos modelos para el estudio del desarrollo y la diferenciación de estas células. En 2011, se reportó la gran eficiencia de un protocolo que contemplaba una doble inhibición de la vía de las SMADs para la derivación de precursores de la placa de piso (FP), así como la posterior diferenciación terminal de estos mediante la adición de moléculas pequeñas; este protocolo ha recapitulado con éxito el desarrollo de las neuronas mDA (Kriks et al., 2011). El protocolo tiene una duración variable entre veintiocho y treinta días, o incluso más, dependiendo del tiempo que se dejen madurar las neuronas. En este protocolo se pueden destacar varios estadios del desarrollo: células troncales en el día cero; precursores neurales del día once al catorce y neuronas dopaminérgicas en maduración del día veintiuno en adelante (Kriks et al., 2011).

Las células obtenidas mediante este procedimiento presentan supervivencia a largo plazo *in vitro*. Expresan genes de neuronas maduras y otros específicos de este subtipo neuronal, como la enzima TH, FOXA2, LMX1A, NURR1, Sinapsina, y el transportador de dopamina (DAT), entre otros. Además, mostraron tener una morfología y el fenotipo electrofisiológico característico de neuronas mDA. Estas neuronas han sido utilizadas con éxito en trasplantes a modelos animales de la EP, mostrando una alta supervivencia de las mismas tras el procedimiento, y una mejoría significativa en las pruebas conductuales a las que se sometieron a los roedores que fueron trasplantados, con respecto a aquellos a los que sólo se les indujo una lesión (Kriks et al., 2011).

### 3.6 Cromatina y diferenciación celular

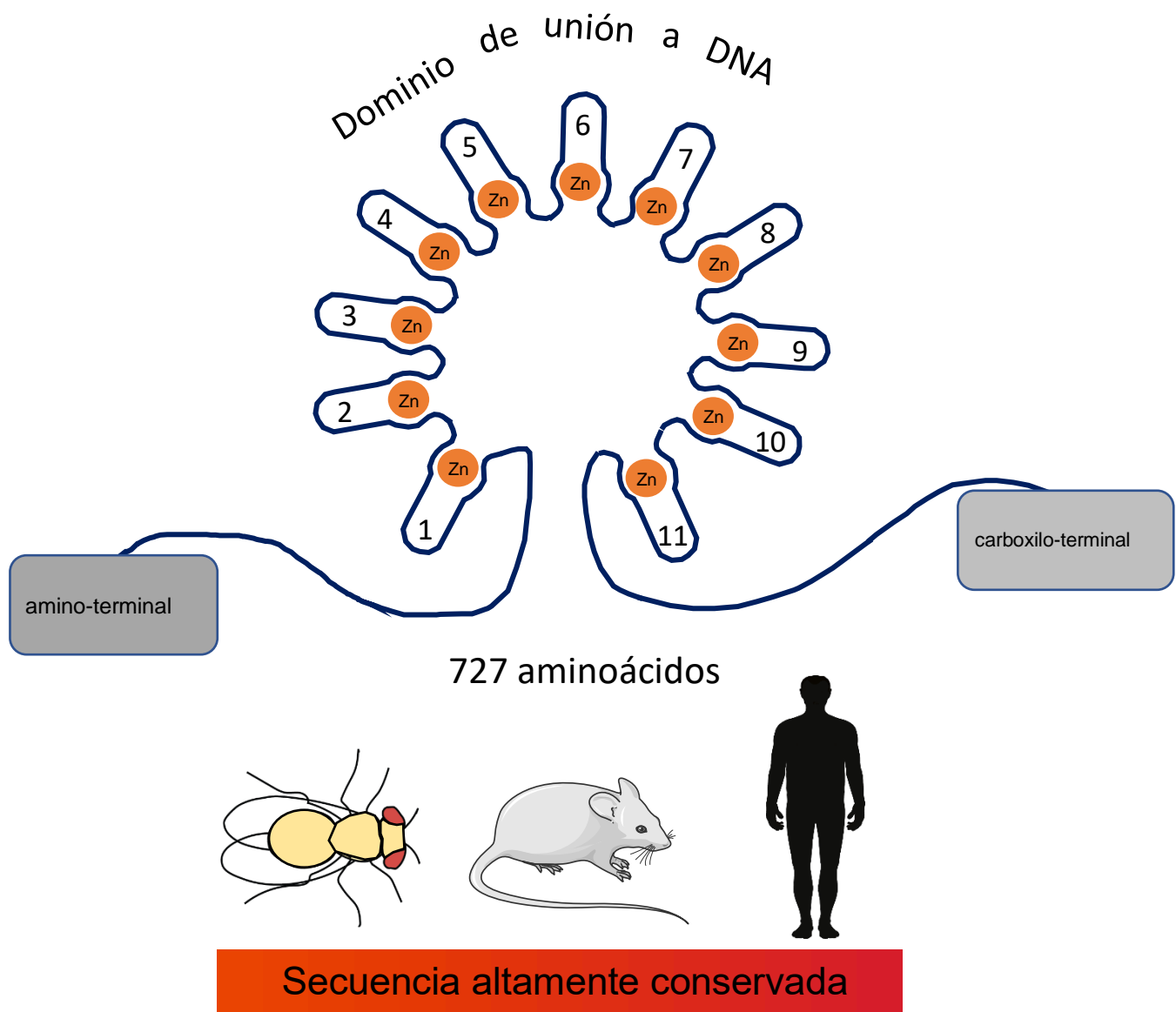
La epigenética son todas aquellas modificaciones covalentes heredables por lo menos mitóticamente y que no afectan la secuencia primaria de bases nitrogenadas del DNA pero que si repercuten en estado de la cromatina y por lo tanto la accesibilidad de la maquinaria transcripcional a los genes (Gavin, 2017). Algunas de estas modificaciones son la metilación en el carbono cinco de las citosinas del DNA y las modificaciones postraduccionales de las histonas (Misteli, 2007; Sams et al., 2016). También hay evidencia de que la conformación tridimensional del núcleo interfásico y el acomodo que esto permite, influye en la manera en la cual las secuencias reguladoras dentro del genoma interactúan físicamente con sus blancos mediante bucles de cromatina (Holwerda, 2012).

Se ha demostrado que la metilación del DNA, las modificaciones postraduccionales de las histonas y la estructura tridimensional del genoma son procesos dinámicos durante la diferenciación celular y el desarrollo de los organismos. Se sugiere que de esta manera se propicia la reestructuración del paisaje epigenético y de las interacciones de secuencias reguladoras distales, como los enhancer, lo que repercute directamente en la actividad transcripcional (Kazakevych, 2017; Siersbæk et al., 2017; Wu et al., 2017). Las remodelación de las estructuras cromatínicas como los compartimentos, los dominios topológicamente asociados y las asas de cromatina, asociada a procesos como la diferenciación celular, son mediadas por un grupo de proteínas conocidas como proteínas arquitectónicas de la cromatina, como YY1, Coehsina y la proteína multifuncional CTCF (Kang et al., 2015).

### 3.7 La proteína arquitectónica de la cromatina CTCF

Factor de unión a CCCTC o CTCF es una proteína formada por una sola cadena polipeptídica de 727 aminoácidos, altamente conservada desde *Drosophila melanogaster* hasta *Homo sapiens* y cuya expresión se ha reportado ampliamente distribuida en tejidos de mamíferos. Su estructura secundaria está dividida en tres regiones: la región amino-terminal, la carboxilo-terminal y una región intermedia, la cual es un dominio de unión a DNA formado por once dedos de zinc (**Fig. 3**) (Phillips and Corces, 2009). Estos once dedos de zinc permiten unirse a una amplia gama de secuencias blanco dentro en el genoma humano dado que diferentes dedos pueden reconocer distintas secuencias (Kim et al., 2007).

# CTCF



**Figura 3.** Esquema de CTCF compuesta por 727 residuos de aminoácidos. Se hace distinción en sus tres dominios: El extremo amino-terminal del lado izquierdo, el extremo carboxilo-terminal del lado derecho, y su dominio de unión a DNA formado por once dedos de zinc en el centro. La secuencia de aminoácidos de CTCF esta altamente conservada desde *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) hasta los mamíferos como *Mus musculus* (ratón) y *Homo sapiens* (humano).

CTCF tiene un papel importante, pues se le ha atribuido la capacidad de mediar interacciones cromosómicas a larga distancia entre secuencias reguladoras, así como formar asas de cromatina, formando dominios represivos y de activación, lo que la hace partícipe de muchos procesos como transcripción, replicación, silenciamiento, recombinación y splicing (Phillips & Corces, 2009; Ong & Corces, 2014).

CTCF también interactúa con múltiples cofactores proteicos, los cuales pueden ser: factores transcripcionales, proteínas de la cromatina u otras proteínas multifuncionales. Se ha propuesto que estas interacciones son el mecanismo por el cual CTCF es capaz de participar en procesos biológicos los cuales, en ocasiones, parecen no tener relación entre sí. Aún no se conoce cómo se determina el cofactor con el que CTCF interactúa en cada situación, pero se ha propuesto que esto también podría estar mediado por combinatorias diferenciales de sus once dedos de zinc (Zlatanova and Caiafa, 2009). Los niveles de expresión de CTCF son variables entre distintos tejidos, indicando su importancia en el mantenimiento fenotípico de los tipos celulares (Phillips & Corces, 2009). Se le ha visto implicado en muchos procesos como la inactivación del cromosoma X (Donohoe et al., 2007), la retención de histonas para la herencia de información posicional durante el recambio de éstas por protaminas durante la espermatogénesis (Hernández-Hernández, 2016; Rivero-Hinojosa, 2016) y la impronta genómica (Pant et al., 2003).

*CTCF* tiene un parálogo, un gen llamado *CTCF*L, el cual codifica para la proteína BORIS del inglés hermano del regulador de de sitios improntados (Brother of the regulator of imprinted sites) (Loukinov et al., 2002). Esta proteína fue encontrada y caracterizada a partir de extractos proteicos de testículo en los que se identificaron proteínas unidas a motivos de unión en el DNA reportados para CTCF. BORIS tiene un motivo de unión a DNA formado por once dedos de zinc invariante con respecto al de CTCF (Loukinov et al., 2002). Sin embargo, sus dominios amino-terminal y carboxilo-terminal no son iguales. La expresión de *CTCF*L solo se ha visto en testículo; concretamente en espermatoцитos, único tejido humano conocido que no expresa *CTCF* (Loukinov et al., 2002). Por esta razón se ha establecido que los patrones de expresión entre estos dos genes son mutuamente excluyentes. La expresión aberrante de *CTCF*L en tejidos somáticos se ha visto reportada en distintos tipos de cáncer, por lo que se le ha atribuido un papel importante en la progresión de estas enfermedades (He et al., 2017).

### 3.8 CTCF y la reorganización nuclear durante la diferenciación

Distintos estudios han implicado a CTCF en mecanismos de diferenciación de linajes celulares. Se han reportado aumento y disminución en los niveles de expresión de CTCF durante el desarrollo, que parecen ser dependientes de la vía de diferenciación específica de cada linaje celular (Delgado-Olguin et al., 2011; Tsui, 2016; Beagan et al., 2017); este hecho evidencia un alto nivel de regulación durante estos procesos, apuntando a la posible relevancia de CTCF para los mismos. El papel de CTCF en la diferenciación celular es un campo vasto que no se ha explorado del todo (Delgado-Olguin et al., 2011). Se sabe que las interacciones proteicas mediante las cuales contribuye en la diferenciación de cada tejido, son particulares para cada uno de éstos, estos procesos han sido abordados independientemente, tomando en consideración vías de regulación tejido-específicas en la diferenciación de cada tipo celular (Phillips & Corces, 2009; Ong & Corces, 2014;).

Existe evidencia de la importancia de la remodelación tridimensional del núcleo mediada por cambios en la ocupación de CTCF a lo largo del genoma, con el fin de activar programas transcripcionales linaje-específicos (Mikkelsen et al., 2010). Por ejemplo, se ha reportado que, durante la diferenciación miogénica, CTCF promueve el reclutamiento de factores transcripcionales indispensables para este proceso, como MyoD, hacia secuencias reguladoras músculo-específicas. Y que de esta manera se promueve la expresión de Wnt11 (Delgado-Olguin et al., 2011). La familia de Wnt comprende un grupo de proteínas ampliamente involucradas en aspectos del desarrollo, en el que se ha determinado su papel como moduladores de este proceso (Moon, 1993), incluso en el sistema nervioso central (McMahon et al., 1997).

Se ha demostrado que CTCF tiene un posicionamiento dinámico durante la adipogénesis. Los análisis revelan cambios en una fracción considerable de los sitios de enriquecimiento de CTCF durante la diferenciación de los adipocitos; esta ganancia y pérdida de ocupación brinda una configuración nuclear de gran importancia para la regulación génica en cada uno de los estadios del proceso. Además, se determinó que esta proteína arquitectónica podría estar posicionándose cerca de regiones reguladoras como enhancer y reclutando modificadores de la estructura cromatínica para la activación funcional de estos elementos (Dubois-Chevalier et al., 2014).



También se ha demostrado que CTCF participa en la diferenciación y el desarrollo de células germinales masculinas. Se comprobó que la delección de CTCF en espermatoцитos de ratón genera infertilidad, posiblemente causada por anomalías morfológicas en los espermatozoides y la disrupción de la retención de histonas durante el recambio de éstas por protaminas. Los resultados se asociaron a la desregulación de una gran cantidad de genes importantes para la espermatogénesis, aun cuando la mayoría de los promotores o enhancers conocidos para estos genes, no tengan sitios reportados de unión a CTCF. Probablemente los cambios en la expresión se puedan explicar por una desorganización global de la cromatina debida a la pérdida de CTCF (Hernández-Hernández, 2016).

### 3.9 CTCF y el desarrollo del Sistema Nervioso Central

Estudios de hibridación *in situ* en embriones de ratón revelaron que CTCF se encuentra mayormente expresado en extremidades y cerebro durante los días embrionarios (E) 10-12, y que dicha expresión predomina en cerebro hacia el E13 (Delgado-Olguin et al., 2011). Notablemente se presenta en la misma ventana temporal en la que se lleva a cabo la neurogénesis murina, cuya cúspide es en el día embrionario 14 (Sauvageot, 2002; Wurst and Prakash, 2014). Por otro lado, las mutaciones de CTCF en humano se han relacionado con retraso mental y microcefalia (Gregor et al., 2013). Los análisis de secuenciación transcriptómica en los pacientes arrojaron datos sobre genes asociados al ribosoma y a la transcripción en un estado de sobreexpresión, mientras que genes asociados a neuronas y a la respuesta a estímulos, presentan una expresión disminuida. Entre los genes con expresión disminuida se encuentra *PARK8*, que codifica para la cinasa rica en repeticiones de leucina (LRRK2) (Gregor et al., 2013). Dichas las mutaciones son la principal causa conocida de la EP familiar (Berwick & Harvey, 2013).

Se ha reportado que el posicionamiento de CTCF en el genoma es capaz de regular la expresión de genes durante la diferenciación de tejidos. Un ejemplo conocido es *Pax6*, un factor transcripcional clave para el desarrollo del ojo y otras regiones del sistema nervioso central, que es regulado negativamente por CTCF (Li et al., 2004). En algunos casos, se ha reportado que *CTCF* y *PAX6* tienen patrones de expresión mutuamente excluyentes, dando por consecuencia dinámicas de expresión a CTCF (Wu et al., 2006; Canto-Soler et al., 2008;

Tsui et al., 2016), mientras que se ha reportado que en la diferenciación *in vitro* de células troncales a glía radial, esta proteína arquitectónica de la cromatina permanece invariante, aun cuando su posicionamiento en secuencias genómicas sí varía, produciendo así cambios en la expresión de *Pax6* (Gao et al., 2011).

En modelos murinos de diferenciación para otras regiones del cerebro como la corteza, el cerebelo y el bulbo olfatorio, se ha comprobado que CTCF disminuye su expresión y su ocupación a lo largo del genoma en el estadio de precursor neural con respecto al estadio de células troncales y neuronas terminalmente diferenciadas (Beagan et al., 2017).

También se sabe que CTCF juega un papel clave en la regulación del equilibrio entre proliferación y diferenciación de los precursores neurales telencefálicos. Además de estar relacionado con la sobrevivencia de estos. La ablación condicional de CTCF *in vivo*, se asocia a muerte celular mediada por PUMA y a una pérdida del reservorio de los progenitores neurales durante el desarrollo embrionario murino. Esto genera una desorganización del tejido, así como una disminución en su tamaño (Watson et al., 2014); también se ha descrito que la deleción condicionada de CTCF en la corteza cerebral y del hipocampo durante el desarrollo de ratones conlleva serias anomalías durante el proceso. Estas alteraciones incluyen deficiencia en la formación de las sinapsis, disrupción en la expresión de las protocadherinas y la formación estocástica de sus isoformas, decremento en la arborización dendrítica, así como un establecimiento inadecuado de los mapas somatosensoriales (Hirayama et al., 2012). Estos resultados en conjunto, resaltando aun más el papel de esta proteína en el desarrollo del sistema nervioso central.

## **4 Planteamiento del problema**

La proteína CTCF juega un papel importante en los procesos de diferenciación celular y desarrollo de distintos linajes celulares, incluidos procesos asociados al sistema nervioso central, donde se ha observado que CTCF tiene distintas dinámicas de expresión durante la diferenciación neural. Sin embargo, ninguno de los estudios de CTCF en diferenciación celular ha sido realizado en células humanas como modelo, ni tampoco hay estudios que describan el patrón de expresión de CTCF durante la diferenciación del linaje de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas, un subtipo neuronal de gran importancia por tratarse del principal tipo celular afectado en la EP. El establecer la dinámica de expresión y los niveles proteicos de CTCF en un modelo de diferenciación *in vitro*, podría arrojar datos sobre el papel de esta proteína en distintos estadios de este proceso diferenciativo.

### **4.1 Pregunta de investigación**

¿Cuál es la dinámica de CTCF durante la diferenciación de células troncales embrionarias humanas hacia neuronas dopaminérgicas mesencefálicas?

### **4.2 Hipótesis**

CTCF presentará distintos niveles de expresión durante el proceso de la diferenciación de células pluripotenciales humanas hacia neuronas dopaminérgicas.

### **4.3 Objetivo general**

Determinar los niveles proteicos y transcripcionales de CTCF a lo largo de la diferenciación de la línea celular troncal humana H9 GFP, hacia neuronas dopaminérgicas.

#### 4.4 Objetivos particulares

- Comprobar el estado pluripotencial de la línea celular troncal humana H9GFP.
- Diferenciar células de la línea celular troncal humana H9GFP hacia neuronas dopaminérgicas mesencefálicas y analizar la eficiencia de la diferenciación.
- Evaluar los niveles transcripcionales de *CTCF* durante el proceso de diferenciación dopaminérgica en los días 0, 14 y 28.
- Evaluar los niveles proteicos de *CTCF* durante el proceso de diferenciación dopaminérgica en los días 0, 14 y 28.

#### 4.5 Estrategia experimental

- Caracterizar el estado pluripotencial de la línea celular troncal humana H9GFP mediante inmunofluorescencias para detectar marcadores de este estadio (OCT4, SOX2, NANOG y SSEA4).
- Diferenciar las células troncales embrionarias humanas H9GFP, mediante un protocolo previamente reportado, hacia neuronas dopaminérgicas mesencefálicas y evaluar la eficiencia de la diferenciación por medio de inmunofluorescencia para detectar  $\beta$ -Tubulina III (TUJ1) y Tirosina Hidroxilasa (TH).
- Determinar los niveles transcripcionales de *CTCF* durante el proceso de diferenciación en los días 0, 14, y 28, mediante secuenciación de RNA.
- Medir la abundancia de la proteína *CTCF* durante el proceso de diferenciación en los días 0, 14, y 28, mediante inmunofluorescencia y *Western Blot*.

## 5 Material y Métodos

### 5.1 Cultivo celular

Se utilizó la línea de células troncales embrionarias de humano H9GFP, la cual expresa constitutivamente la proteína verde fluorescente (GFP). Para la diferenciación dopaminérgica, estas células se mantienen hasta el 75% de confluencia sobre una matriz de Matrigel (BD ®) con Medio Knock Out (Gibco ®) suplementado (Tabla 1) y condicionado previamente con fibroblastos de ratón o de humano, inactivados mitóticamente (MEFs o HEFs, respectivamente).

Para la diferenciación dopaminérgica se utilizó el protocolo reportado por Kriks *et al.* en 2011, el cual consiste en la utilización de moléculas pequeñas a distintos días (**Fig. 3**).

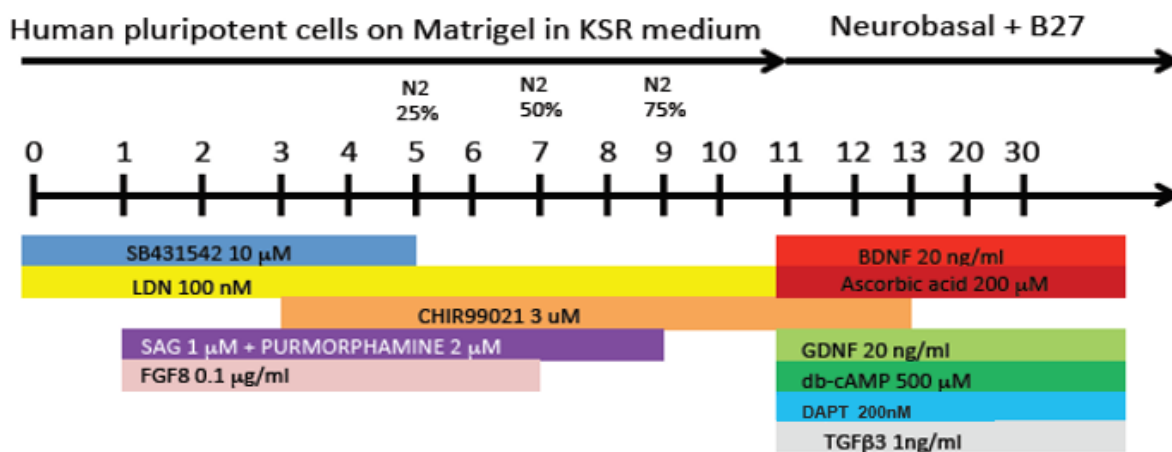
Tabla 1. Composición de los principales medios de cultivo utilizados

#### Medio Knock Out suplementado (KSR)

- Medio Knock Out (Gibco ®) 80%
- Reemplazo de suero Knock Out (Gibco ®) 20%
- Aminoácidos no esenciales (Gibco ®) 1%
- L-glutamina 2 mM (Gibco ®)
- 2-mercaptoetanol (Sigma ®) 0.1 mM
- FGF2 (Gibco ®) 10 ng/ml

#### Medio de maduración neuronal

- Medio Neurobasal (Gibco ®) 98%
- Suplemento B27 (Gibco ®) 2%
- BDNF 20 ng/ml
- Ácido ascórbico 200  $\mu$ M
- GDNF 20 ng/ml
- db-cAMP 500  $\mu$ M
- DAPT 200 nM
- TGF- $\beta$ 3 1 ng/ml



**Figura 3.** Protocolo de diferenciación utilizado para obtener neuronas dopaminérgicas a partir de células troncales.

## 5.2 Inmunofluorescencia

Para realizar la técnica en las células troncales, se colocaron cubreobjetos de vidrio sobre una placa de veinticuatro pozos y posteriormente se trataron con gelatina porcina al 0.5% durante veinte minutos. Se sembraron ciento cincuenta mil fibroblastos (MEFs o HEFs) en cada pozo y se dejaron por un día en medio DMEM (Gibco®) suplementado con suero fetal bovino al 10%. Posteriormente se sembraron trescientas mil células H9GFP por pozo sobre la capa de células alimentadoras y se mantuvieron 2-3 días con medio Knock Out DMEM (Gibco®) suplementado (KSR). Posteriormente se les retiró el medio y se lavaron dos veces PBS para después ser fijadas por veinte minutos con PFA 4% a 4°C. Finalmente se repitió el lavado con PBS.

Los precursores neurales fueron resembrados al día 13 y al día 21 del proceso de diferenciación sobre cubreobjetos de vidrio en una placa de 24 pozos tratados previamente con Poli L-Ornitina durante un mínimo de 8 horas y posteriormente tratados con Fibronectina 1 µg/mL y Laminina 5 µg/mL por 24 horas; las células del grupo resembrado en el día 13 se fijaron al día siguiente con paraformaldehído al 4% y el grupo resembrado en el día 14 se dejó madurar hasta el día 28 para su fijación con paraformaldehído al 4%.

Para la inmunodetección, se permeabilizaron las células durante 25 minutos con Tritón X-100 al 2% en PBS; y posteriormente se lavaron durante 5 minutos con PBS. Se bloquean con suero normal de cabra al 10% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios fueron diluidos en suero de cabra al 10% en PBS durante toda la noche a 4°C en agitación a las diluciones indicadas a continuación (Tabla 2).

A continuación, se retiran los anticuerpos primarios y se dan tres lavados de 5 minutos cada uno con PBS en agitación. Posteriormente se incuban los anticuerpos secundarios durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación diluidos en suero de cabra al 10% en PBS a la dilución que se indica a continuación (Tabla 2). Se dan tres lavados en agitación de 5 minutos con PBS y se incuba con HOECHST dilución 1:100 en suero normal de cabra al 10% con PBS durante 10 minutos. Tras un lavado, se montan sobre portaobjetos de vidrio utilizando Aqua-Poly/Mount.

Tabla 2. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para inmunofluorescencia

Anticuerpos primarios para inmunofluorescencia

<b>Anticuerpo</b>	<b>Especie</b>	<b>Marca</b>	<b>Dilución</b>
CTCF	Conejo	Millipore (07-729)	1:2,000
OCT4	Ratón	BD (611202)	1:250
SOX2	Conejo	Millipore (AB5603)	1:500
NANOG	Ratón	Preprotech (500-P236)	1:1,000
SSEA4	Ratón	Abcam (ab16287)	1:100
TUJ1	Ratón	Covance (MMS435P-100)	1:2,000
TH	Conejo	Pel-freez (401-01-0)	1:1,000

Anticuerpos secundarios para inmunofluorescencia

<b>Anticuerpo</b>	<b>Especie</b>	<b>Marca</b>	<b>Dilución</b>
Alexa Fluor 568 anti-Ms	Cabra	Invitrogen	1:600
Alexa Fluor 647 anti-Rb	Cabra	Jackson imm	1:600

### 5.3 Obtención del RNA

El RNA total se extrajo a distintos tiempos de la diferenciación (0, 14, 28) utilizando Tri Reagent®. Las células se desprenden utilizando TrypLE™ Express (Gibco®) y se centrifugan para retirar el medio. La pastilla de células se lava 3 veces con PBS. Se centrifugan nuevamente y se homogeneizan en 1 ml de Tri Reagent®. Tras 5 minutos a temperatura ambiente, se añaden 0.2 ml de cloroformo. Se mezcla invirtiendo el tubo por 15 segundos y se deja 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifuga a 12000 g por 15 minutos a 4°C. El contenido del tubo queda separado en tres fases; la fase superior se transfiere a un nuevo tubo (fase acuosa) y se añaden 0.5 ml de isopropanol. Las muestras se dejan a -20°C durante toda la noche y posteriormente se centrifugan a 12000 g por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se remueve y se añade 1 ml de etanol al 75% para lavar. Se somete brevemente al vórtex y se centrifuga a 7500 g durante 5 minutos a 4°C. Se retira el sobrenadante y se deja seca la pastilla por 10 minutos dentro de la campana de extracción. El RNA es solubilizado en agua DEPC y posteriormente cuantificado mediante NanoDrop™. Se corrió un gel de integridad con el RNA extraído y se seleccionaron las mejores muestras.

#### 5.4 Obtención del cDNA y análisis de expresión por secuenciación de RNA

Se llevó a cabo una transcripción reversa utilizando el Kit de Super Script™ III Reverse Transcriptase. Se colocan en un tubo 1 µl de oligo(dT) (50 µM), 5 µg de RNA total, 1 µl de dNTP Mix 10 mM y se completa con agua estéril hasta 13 µl. La mezcla se calienta 65°C por 5 minutos y se incuba en hielo por al menos un minuto. Se añaden 4 µl del First-Strand Buffer (5x)™, 1 µl de DTT 0.1 M y 1 µl de RNaseOUT™. Se incuba a 50°C por 60 minutos; posteriormente se incrementa la temperatura a 55°C y finalmente se inactiva la reacción calentando a 70°C por 15 minutos. El cDNA resultante se cuantificó nuevamente mediante NanoDrop™.

Se realizó una secuenciación masiva, Mi-seq de Illumina, paired end (Q30=89.5%; lecturas totales=72,738,268; lecturas PF=50,378,718; largo de lectura=2x75pb; porcentaje de lecturas por muestra: D0-1=11.8140%, D0-2=13.2956%, D0-4=11.6236%, D14-7=10.4771%, D14-8=11.2418%, D14-9=10.99%, D14-10=12.648%, D28-13=6.4498%, D28-14=10.2955%). Se hizo un comparativo de genes cuyo comportamiento en el proceso ya estaba reportado, para validar los datos de genes de interés, como *CTCF* y *CTCFL*. Se obtuvo el Z-Score utilizando el P-value de los genes analizados.

#### 5.5 Análisis de los niveles proteicos de CTCF por inmunofluorescencia

Para analizar los niveles proteicos de CTCF se tomaron fotografías de las inmunofluorescencias realizadas a los tres tiempos de la diferenciación dopaminérgica (D0, D14, D28). Para obtener la intensidad promedio de la fluorescencia normalizada con respecto al área del núcleo, se utilizó la herramienta de ROI manager del software ImageJ. Se tomaron en cuenta 100 núcleos por cada experimento, con un total de 3 repeticiones por condición.

#### 5.6 Western Blot

Para extraer proteína se recuperan las células utilizando TrypLE™ Express (Gibco®) y se centrifugan para retirar el medio. La pastilla conteniendo las células se lava 3 veces con PBS. Las células resuspendidas se centrifugan nuevamente y se homogeneizan en 200 a 400 µl de Buffer de Lisis (Tabla 3). Posteriormente se centrifugan a 12000 g durante veinte minutos



a 70°C y el sobrenadante es almacenado a -70°C para su posterior análisis. Las muestras de proteína se cuantificaron mediante el método de Bradford de Bio-Rad®, según las especificaciones del proveedor.

Se corrieron las muestras de proteína durante tres horas a 120 V en un gel de SDS-PAGE con dos concentraciones, 7.5% en la parte superior y 12% en la parte inferior y de 1.5 mm de grosor (Tabla 3).

Posteriormente, las proteínas previamente separadas en el gel mediante la electroforesis fueron trasferidas a una membrana de PVDF, previamente hidratada con metanol, en cámara húmeda durante 5.45 horas a 60V en cuarto frío (4°C). Las proteínas previamente separadas en el gel mediante la electroforesis fueron trasferidas a una membrana de PVDF, previamente hidratada con metanol, en cámara húmeda durante 5.45 horas a 60V en cuarto frío (4°C).

Posteriormente se bloqueó la membrana con leche baja en grasa al 7.5% en TBS Tween al 0.5% durante 2 horas a temperatura ambiente. El anticuerpo primario anti-CTCF (Millipore 07-729) hecho en conejo se incubó en la solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C (Tabla 4). Posteriormente se realizaron tres lavados de 10 minutos cada uno con TBS Tween al 0.5%. Se incubó durante una hora con el anticuerpo secundario anti-conejo HRP IgG (Santa Cruz®) en solución de bloqueo. Trascurrido el tiempo, se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con TBS Tween al 0.5%, y se reveló utilizando como sustrato Luminata Forte (Merck®) y un foto-documentador.

Las imágenes obtenidas fueron analizadas mediante la herramienta de Gels del software ImageJ. La intensidad de la señal de CTCF fue normalizada con respecto a la señal para  $\beta$ -Actina.

## 5.7 Análisis de la dinámica espacial de CTCF por inmunofluorescencia

Se tomaron fotografías en microscopio confocal, ajustando al mínimo el parámetro de Z en cada una de estas, con el fin de fotografiar una sección delgada. Las fotografías fueron analizadas mediante ImageJ. Se determinó un umbral de color para la marca de CTCF y otro para la marca de HOECHST, resaltando las regiones intensas para cada una. Se cuantificó el área de colocación de ambas señales y se sacó el porcentaje de colocación con respecto al área total.

Tabla 3. Composición de las soluciones utilizadas para el ensayo de Western Blot

**Gel separador de la parte superior (7.5%)**

Acrilamida 30%-bis 0.8% 2.5mL  
 Tris-HCl pH8.8 (1.5 M) 2.5ml  
 Agua 4.9 ml  
 SDS 10% 0.1 ml  
 APS 10% 0.06 ml  
 TEMED 0.01 ml

**Gel separador de la parte inferior (12%)**

Acrilamida 30%-bis 0.8% 4.1 ml  
 Tris-HCl pH8.8 (1.5 M) 2.5 ml  
 Agua 3.3 ml  
 SDS 10% 0.1 ml  
 Persulfato de amonio 10% 0.06 ml  
 TEMED 0.01 ml

**Gel concentrador**

Acrilamida 30%-bis 0.8% 1.25 ml  
 Tris-HCl pH8.8 (1.5 M) 1.25 ml  
 Agua 7.4 ml  
 SDS 10% 0.1 ml  
 APS 10% 0.1 ml  
 TEMED 0.01 ml

**Buffer de Lisis**

Tris-HCl 50 mM  
 NaCl 150 mM  
 Nonident NP40 1%  
 Deoxicolato 0.5%  
 Coctel de inhibidores (Complete® Roche)

**Buffer de electroforesis**

Buffer de electroforesis (10x): pH 8.3  
 Tris-base 25 mM  
 Glicina 192 mM  
 SDS 10%  
Buffer de electroforesis:  
 Buffer de electroforesis (10x) 100 ml  
 Agua 900 ml

**Buffer de transferencia húmeda**

Buffer de transferencia (10x): pH 8.3  
 Tris-HCl 25 mM  
 Glicina 192 mM  
Buffer de transferencia (1x):  
 Buffer de transferencia (10x) 100 ml  
 Metanol 200 ml  
 Agua 700 ml

Anticuerpos primarios para Western Blot

<b>Anticuerpo</b>	<b>Especie</b>	<b>Marca</b>	<b>Dilución</b>
CTCF	Conejo	Millipore (07-729)	1:2000
$\beta$ -Actina	Ratón	Santa Cruz	1:1000

Anticuerpos secundarios para Western Blot

<b>Anticuerpo</b>	<b>Especie</b>	<b>Marca</b>	<b>Dilución</b>
anti-Ms HRP IgG	Cabra	Santa Cruz	1:10000
anti-Rb HRP IgG	Cabra	Santa Cruz	1:5000

### 5.8 Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con la ayuda del software GraphPad PRISM® 6.0. El valor de alfa se tomó como 0.05. Tanto para la gráfica de la expresión de *CTCF* y *CTCF*L mediante secuenciación de RNA, como para la comparación entre la intensidad de la fluorescencia, la dinámica espacial de CTCF y la evaluación de los niveles proteicos de CTCF mediante *Western Blot* se llevó a cabo un ANOVA de una vía y un análisis *post hoc* de Tukey.

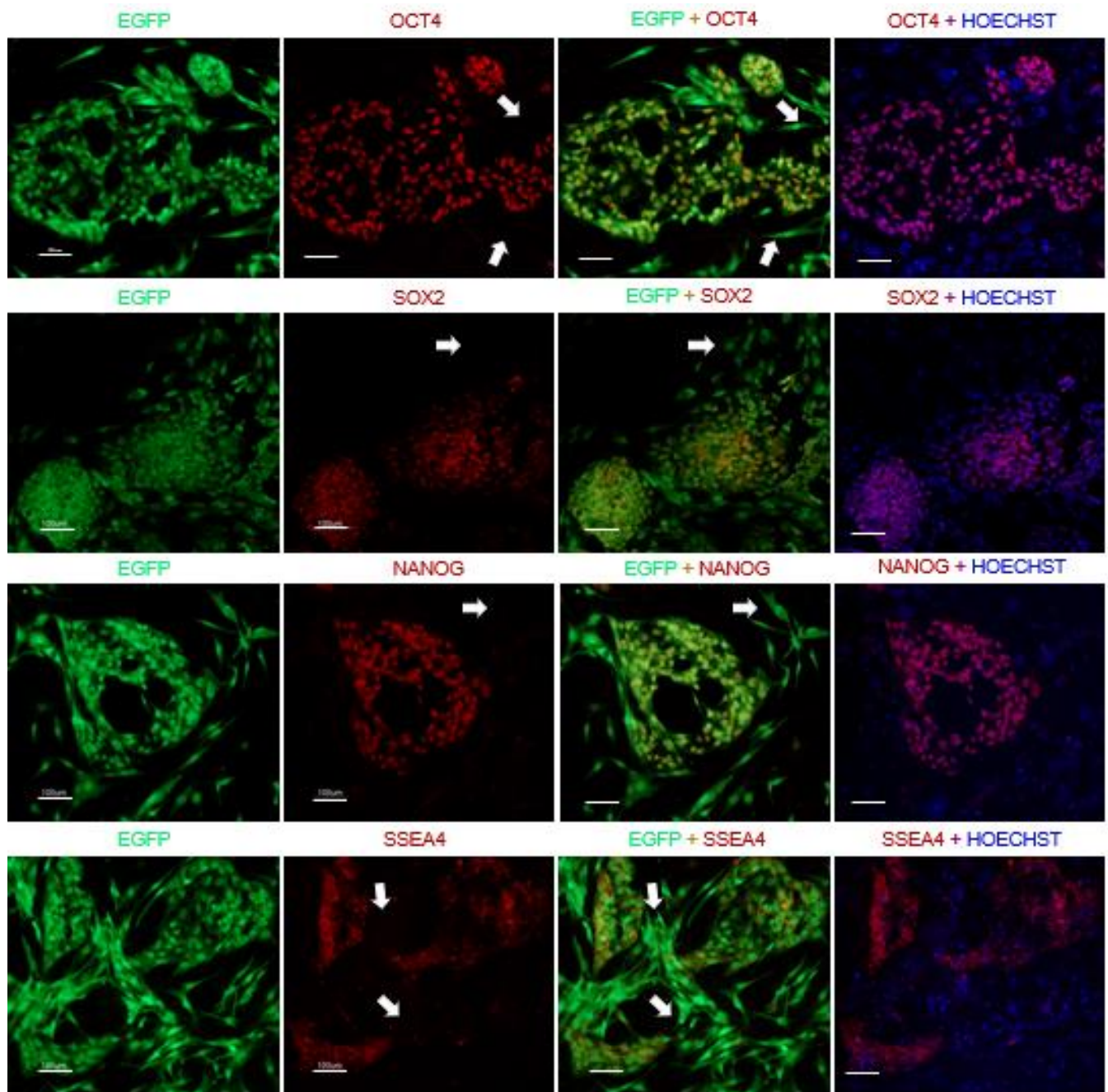
## 6 Resultados

### 6.1 Caracterización del estado de pluripotencia de la línea de células troncales embrionarias humanas

Con la finalidad de comprobar la expresión de proteínas asociadas al estado pluripotencial en la línea celular usada como modelo de estudio para este trabajo (H9GFP), se realizaron inmunofluorescencias contra los tres factores transcripcionales más importantes para el mantenimiento de la pluripotencia OCT4, SOX2 y NANOG, así como contra el antígeno glicolipídico de superficie etapa-específico SSEA4, una molécula de superficie presente en las células pluripotenciales. Se observó inmunoreactividad en las células para las cuatro proteínas (**Fig. 4**). La señal para estos marcadores fue más intensa en las células pequeñas con una elevada relación núcleo/citoplasma, ubicadas en colonias, mientras que la señal fue baja o inexistente en las células cuya morfología era fibroblastoide y se encontraban en los espacios entre las colonias, aún cuando expresan EGFP.

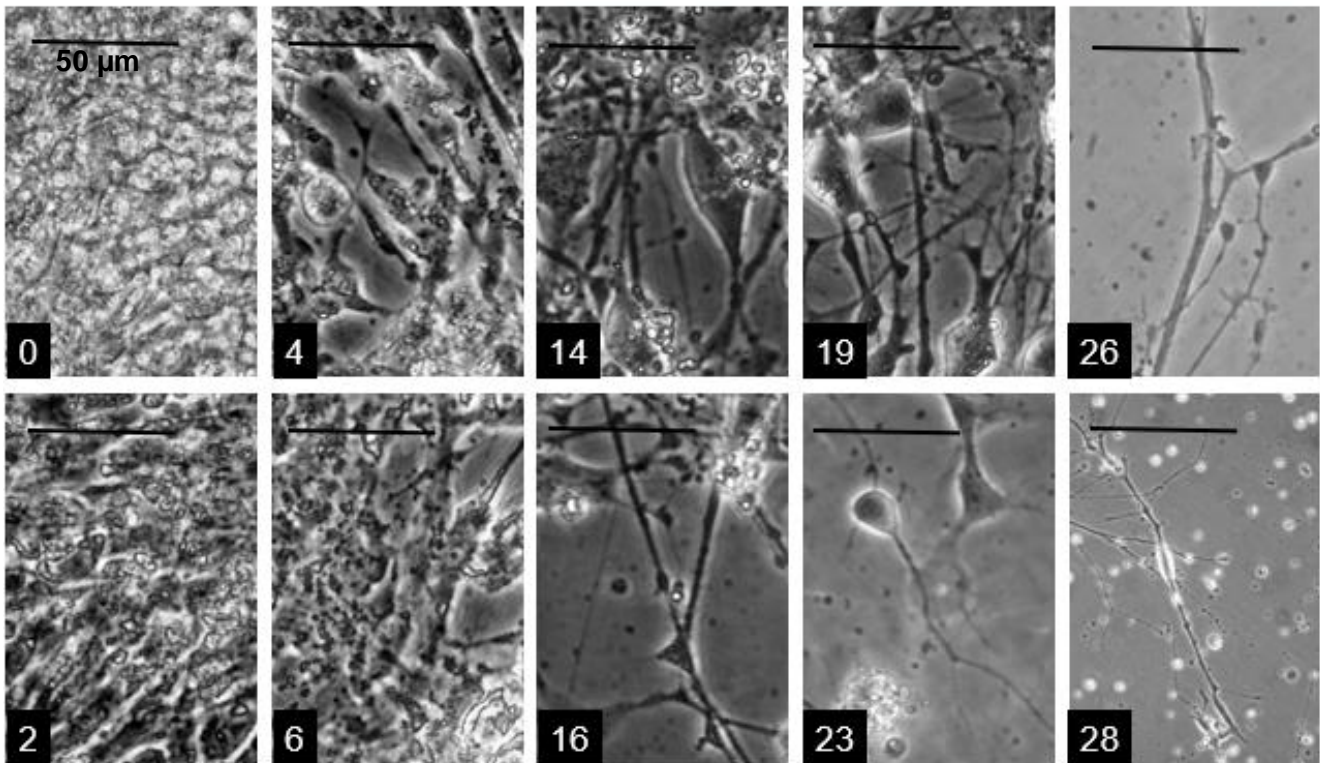
### 6.2 Diferenciación de las células troncales H9GFP hacia neuronas dopaminérgicas mesencefálicas

Posterior a haberse comprobado el estado pluripotencial de las células, se llevaron a cabo procesos de diferenciación mediante un protocolo reportado anteriormente, el cual se basa en la utilización de moléculas pequeñas (**Fig. 5**) (Kriks et al., 2011). Se inicia con las células troncales sembradas sobre matrigel y consiste en una inhibición dual de la vía de las SMADs, seguido de una especificación del linaje dopaminérgico para posteriormente llevar a cabo la maduración neuronal. Posterior al día 21 de diferenciación, las células son resembradas sobre pozos previamente tratados con poli-L-ornitina y posteriormente acondicionados con una matriz de Fibronectina/Lamiana para favorecer la adhesión y supervivencia de las neuronas (**Fig. 5**).



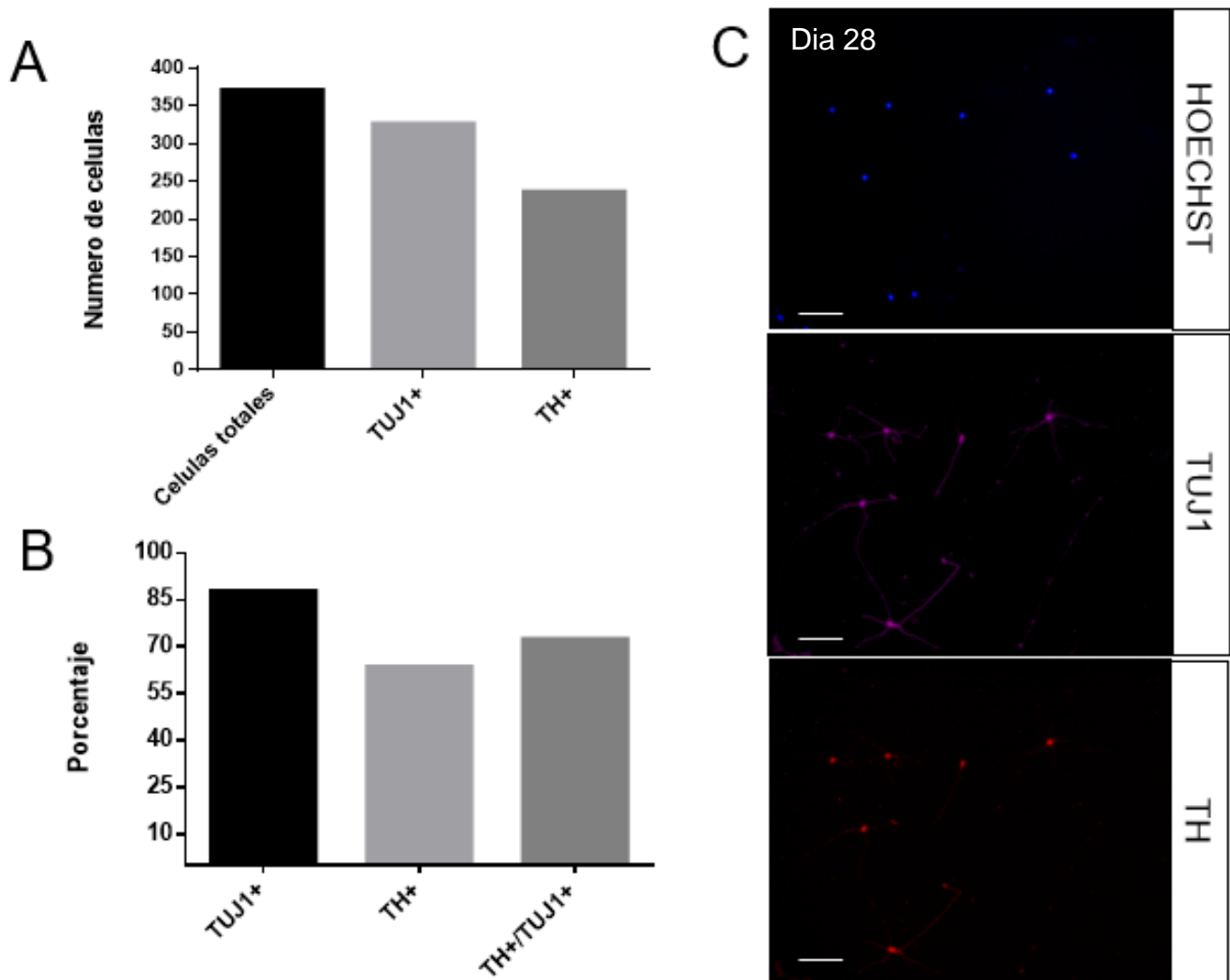
**Figura 4.** Imágenes representativas de inmunofluorescencias realizadas en la línea troncal pluripotencial humana H9GFP, donde se encontró inmunoreactividad para los factores transcripcionales OCT4, SOX2 y NANOG, así como para el antígeno glicolípidico etapa-especifico SSEA4. Las flechas blancas muestran células provenientes de la línea H9GFP, pues expresan la proteína verde fluorescente pero que se encuentran fuera de las colonias y no son positivas para los marcadores de pluripotencia. La barra de escala representa 100  $\mu$ m.

# DIFERENCIACIÓN DE NEURONAS DOPAMINÉRGICAS



**Figura 5:** En la parte superior se muestran imágenes representativas, en contraste de fases, del proceso de diferenciación dopaminérgica a partir de hESCs. Los números de la parte inferior derecha indican el día de diferenciación en el que fue tomada la fotografía. La barra de escala representa 50 µm.

Para comprobar la eficiencia de la diferenciación, se realizaron inmunofluorescencias al día 28 para detectar  $\beta$ -Tubulina III (TUJ1) y Tirosina Hidroxilasa (TH). Se contaron el total de células en diez campos de una preparación, obteniendo un total de 371 células. Posteriormente se obtuvo el porcentaje de neuronas mediante la relación de células positivas para TUJ1 con respecto al total, así como el porcentaje de neuronas con fenotipo dopaminérgico, mediante la relación del total de células positivas para TH con respecto a las células positivas para TUJ1. Se obtuvo un promedio del 87.87% de células TUJ1 positivas respecto al total de células y un 63.61% de células TH respecto al total de células TUJ1 positivas en los campos analizados (**Fig. 6**).



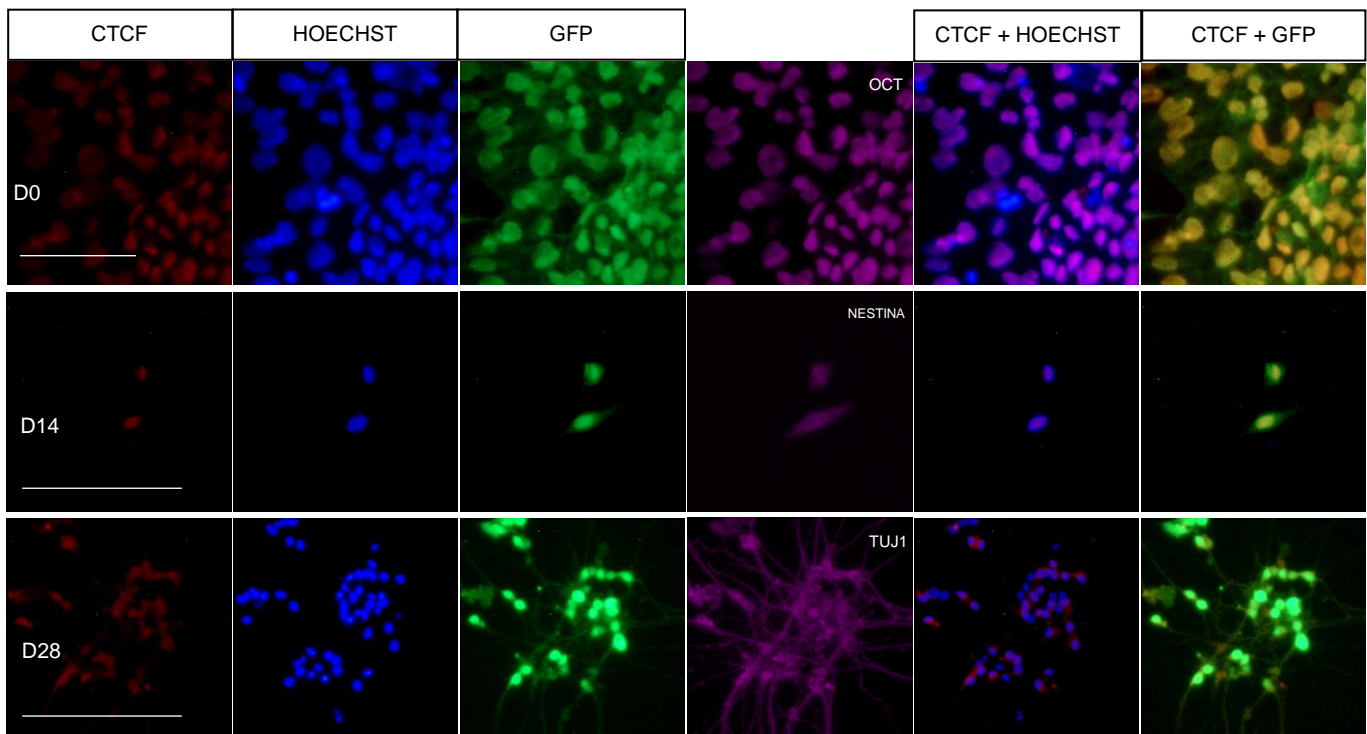
**Figura 6:** Resultados del análisis para el conteo de células positivas a TUJ1 y TH. **A)** Gráfica del conteo total de células mediante la tinción del DNA nuclear con HOECHST, representando también el total de células TUJ1 positivas y TH positivas. Se tomaron varios campos de una misma réplica experimental en los cuales se encontró un total de 371 células **B)** Gráfica del porcentaje de células positivas a TUJ1 con respecto al total de células (87.87%) y del porcentaje de células TH al total de células (63.71%), así como con respecto al total de células TUJ1 positivas (72.39%). Se tomaron diez campos de una misma réplica experimental. **C)** Imágenes representativas de las inmunofluorescencias realizadas al día 28 de la diferenciación para marcar  $\beta$ -Tubulina III (TUJ1) y Tirosina Hidroxilasa (TH), tomadas en cuenta para el conteo y análisis. La barra de escala representa 100  $\mu$ m.



### 6.3 Localización subcelular de CTCF mediante inmunofluorescencia a lo largo de la diferenciación dopaminérgica

Con el fin de visualizar la localización subcelular de CTCF a lo largo de la diferenciación dopaminérgica, se seleccionaron tres estadios representativos del proceso: Día 0 correspondiente a las células troncales pluripotenciales; día 14, correspondiente a los precursores neurales y día 28 para neuronas dopaminérgicas, en los cuales se realizaron inmunofluorescencias. Para las tres condiciones se observó la presencia de CTCF mayoritariamente en el núcleo, como era esperado (**Fig. 7**) En algunos casos, el proceso de inmunofluorescencia provoco que las células se despegaran, quedando a baja densidad en las preparaciones.

#### Inmunofluorescencia contra CTCF en los tres estadios de diferenciación



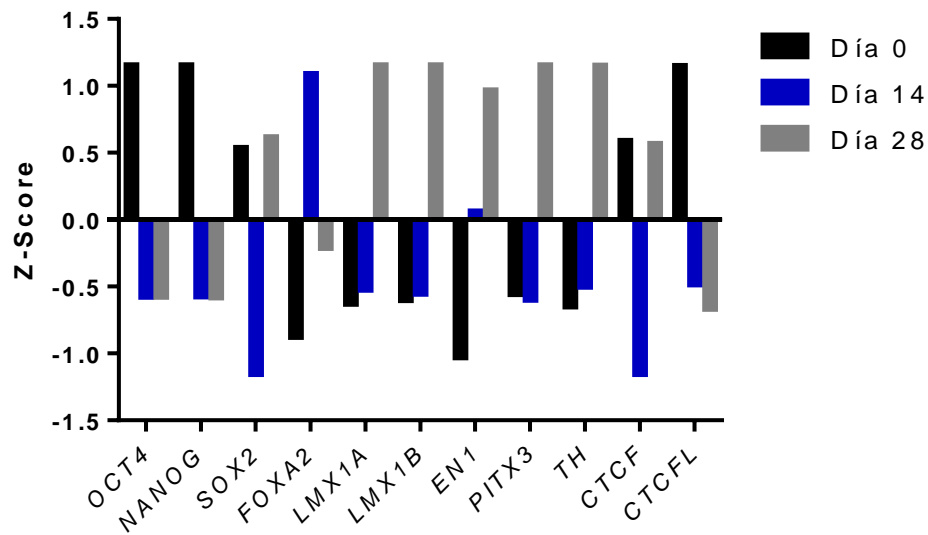
**Figura 7.** Imágenes representativas de la localización de CTCF mediante inmunofluorescencia en los tres estadios de la diferenciación: día 0, 14 y 28 (D0, D14 y D28). En el D0 se muestra la señal del factor transcripcional OCT4 como marcador de pluripotencia. En el D14 se muestra la señal para NESTINA como marcador de precursores neurales. En el D28 se muestra la señal para  $\beta$ -Tubulina III (TUJ1) como marcador de neuronas maduras. La barra de escala representa 100  $\mu$ m.



#### 6.4 Evaluación de los niveles transcripcionales de *CTCF* a lo largo de la diferenciación dopaminérgica mediante RNA-seq

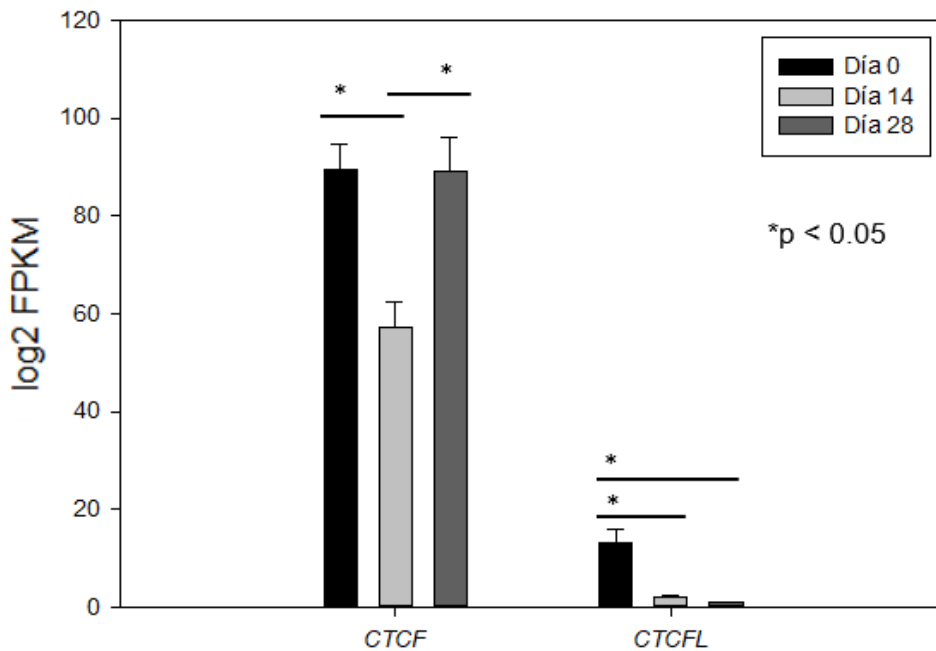
Se realizó un RNA-seq para cada uno de los estadios de diferenciación seleccionados (D0, D14 y D28). Con el fin de validar los datos de la secuenciación, se obtuvo el Z-Score de genes cuyo comportamiento ya ha sido reportado en procesos de mantenimiento de la pluripotencia (*OCT4*, *NANOG* y *SOX2*) y la diferenciación dopaminérgica (*SOX2*, *FOXA2*, *LMX1A*, *LMX1B*, *NURR1*, *EN1*, *PITX3* y *TH*). Se observó el patrón esperado para los genes de pluripotencia *OCT4* y *NANOG*, los cuales tuvieron altos niveles transcripcionales durante el D0 con respecto a los otros dos días (D14 y D28). *SOX2* se mantuvo alto en las tres condiciones, aunque disminuyendo su expresión en el D14 con respecto a los otros dos días. *FOXA2* estuvo fuertemente expresado en el D14 con respecto a los D0 y D28; mientras que el resto de los genes asociados a diferenciación dopaminérgica mostraron altos niveles transcripcionales en D28 con respecto a D0 y D14. *CTCF* tuvo altos niveles transcripcionales en D0 y D28 con respecto al D14. *CTCF* es un parálogo de *CTCF* cuya expresión sólo se ha reportado en tejido testicular; como era esperado, la expresión de *CTCF* se mantuvo baja durante el proceso, aunque mostrados niveles transcripcionales más altos en D0 con respecto a D14 y D28 (**Fig. 8A**). Se graficaron los datos de expresión de *CTCF* y *CTCF*, para comprobar si existían diferencias significativas entre los días analizados (D0, D14 y D28). Se observó una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) en la expresión de *CTCF* para el día catorce (D14) de diferenciación con respecto a los días cero y veintiocho (D0 y D28). La expresión de *CTCF* tuvo una disminución estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) en los días veintiocho (D28) y catorce (D14) con respecto al día cero (D0) (**Fig. 8B**).

A)



Dinámica de expresión de CTCF y CTCFL durante la diferenciación dopaminérgica

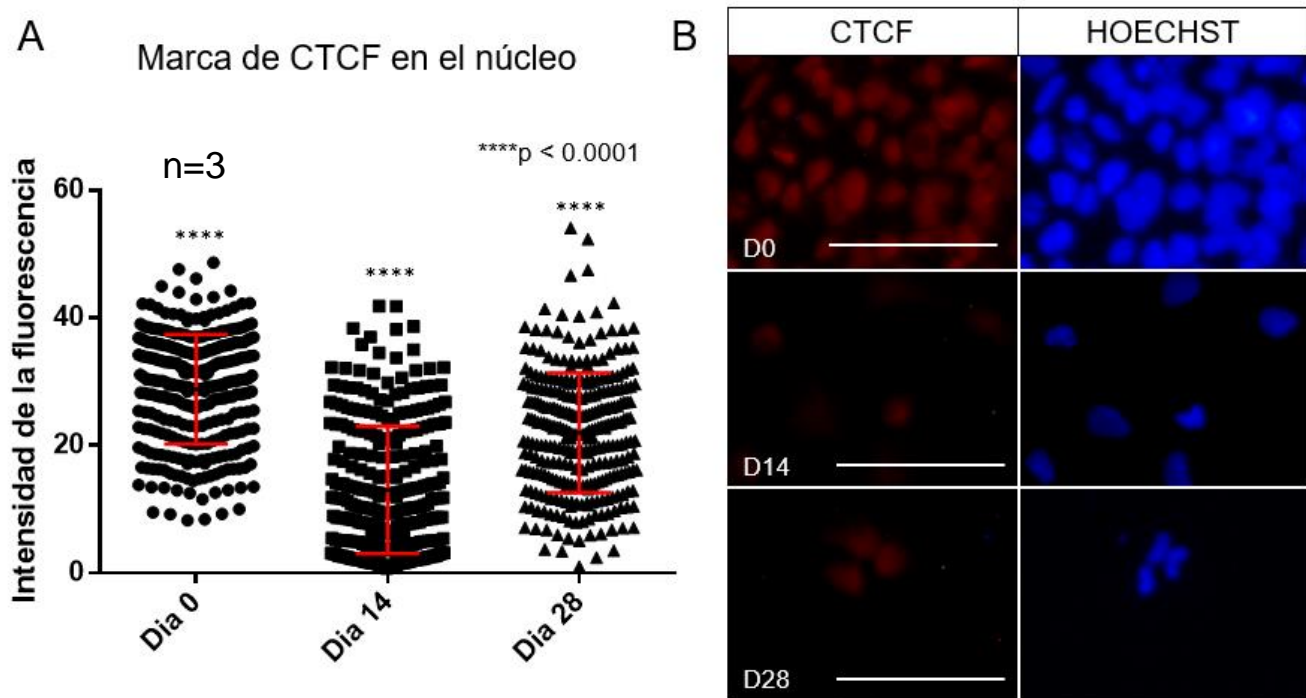
B)



**Figura 8. A)** Z-Score de genes asociados al mantenimiento de la pluripotencia y a la diferenciación dopaminérgica, así como de *CTCF* y su parálogo *CTCFL*. **B)** Análisis estadístico de la expresión de *CTCF* y *CTCFL* obtenida mediante secuenciación de RNA. Se muestra la media  $\pm$  la desviación estándar. FPKM=Fragmentos por kilo base millón.

## 6.5 Evaluación por inmunofluorescencia, de los niveles proteicos de CTCF a lo largo de la diferenciación dopaminérgica

Con el fin de comprobar si el patrón observado en la secuenciación de RNA para los niveles de CTCF durante la diferenciación, era recapitulado en niveles proteicos, se analizó la intensidad de la fluorescencia para la señal de CTCF en los estadios seleccionados. Se tomaron en cuenta únicamente células positivas para OCT4 en D Nestina en D14 y positivas para TUJ1 en D28. Se observó una diferencia significativa ( $p < 0.0001$ ) entre los tres grupos; la tendencia fue la misma observada mediante la secuenciación de RNA, mostrando una disminución en la intensidad de la señal en el día catorce (D14) de la diferenciación con respecto a los días cero y veintiocho (D0 y D28) (**Fig. 9**).



**Figura 9.** Análisis de los niveles proteicos de CTCF a través de los tres estadios de diferenciación mediante inmunofluorescencia. **A)** Cuantificación de la intensidad de la señal de CTCF en el núcleo durante los tres estadios de la diferenciación: día 0 (D0), día 14 (D14) y día 28 (D28). Se muestra la media  $\pm$  desviación estándar. La intensidad de la fluorescencia se obtuvo mediante análisis realizados en el software ImageJ con la herramienta de ROI Manager. Para el análisis se tomaron cien mediciones por cada n; teniendo una n de tres para cada día de diferenciación. **B)** Imágenes representativas de inmunofluorescencias para CTCF en los tres estadios de la diferenciación. La barra de escala representa 100  $\mu$ m.

## 6.7 Evaluación mediante inmunofluorescencia, de la dinámica espacial de CTCF con respecto a la compactación nuclear a lo largo de la diferenciación dopaminérgica

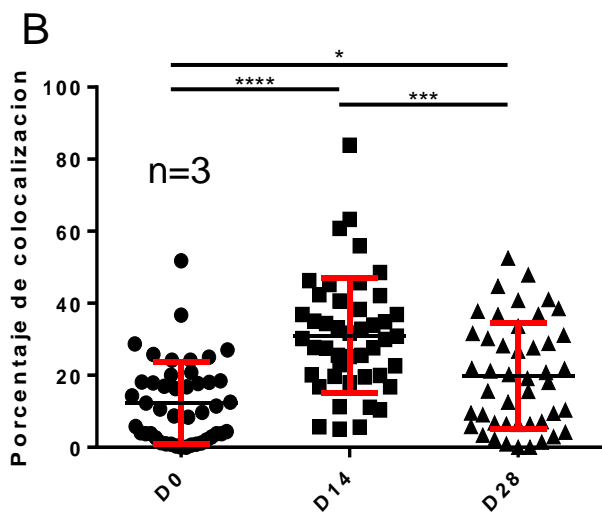
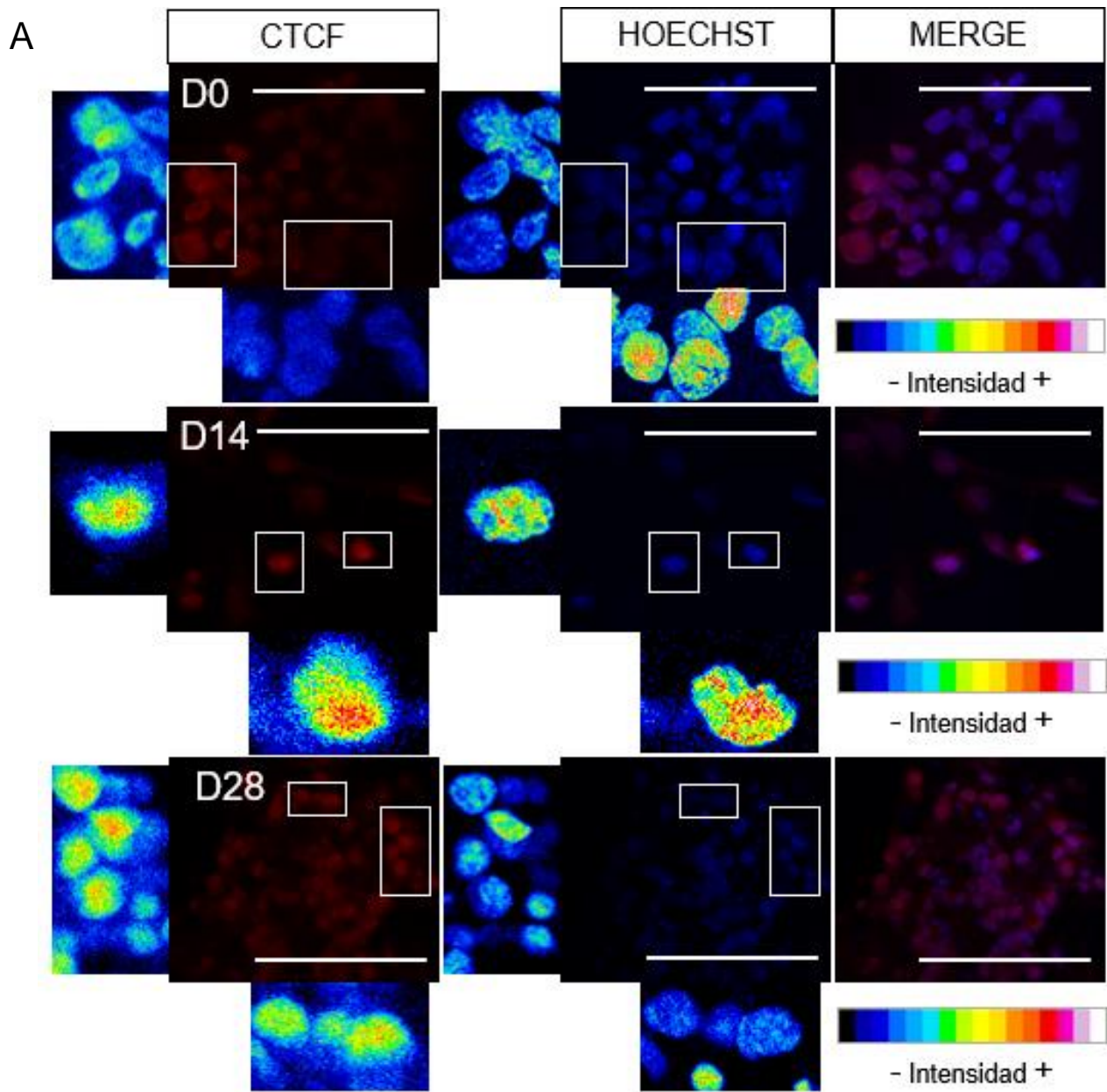
Otros grupos han observado mediante HI-C que los cambios en el nivel de expresión de CTCF durante la diferenciación neural están asociados a cambios de su posicionamiento a lo largo del genoma. Con el fin de encontrar evidencias de estos cambios en la localización genómica de CTCF durante la diferenciación dopaminérgica, se analizaron fotografías tomadas en microscopia confocal de inmunofluorescencias realizadas en los tres estadios de diferenciación (D0, D14, D28). Usando un mapa de calor basado en la intensidad de la marca de HOECHST, un colorante fluorescente utilizado para teñir núcleos celulares, pues se une al surco menor de la doble cadena de DNA, se determinó un umbral para cromatina laxa correspondiente a la señal por debajo del color amarillo (**Fig. 10**) y cromatina compacta por arriba del color amarillo (**Fig. 10**). Se ha establecido que los puntos de mayor fluorescencia de este colorante están relacionados con un alto empaquetamiento del material genético y, por tanto, se han utilizado como una forma de visualizar heterocromatina. Se ha observado que estas regiones colocalizan con proteínas involucradas en la compactación de la cromatina y el silenciamiento epigenético (Linhoff, Garg, & Mandel, 2015; Smeets et al., 2014).

De la misma manera se determinaron las regiones con mayor intensidad para la marca de CTCF y se analizaron los porcentajes de colocalización para ambas señales en las tres etapas de diferenciación, tomando en cuenta únicamente células OCT4 positivas para D0, únicamente células NESTINA positivas para D14 y únicamente células TUJ1 positivas en D28.

Se analizó la correlación entre En las células troncales pluripotenciales (D0) se observó un bajo porcentaje de colocalización entre las regiones altamente representadas por posicionamiento de CTCF y sitios con niveles altos de heterocromatina, así como un bajo nivel de CTCF en las zonas con una alta intensidad para la marca de HOECHST, mostrando un interesante patrón mutuamente excluyente entre las dos marcas (**Fig. 10**).

En los precursores neurales (D14) se observó un incremento significativo en el porcentaje de colocalización de las regiones con una alta intensidad de CTCF y las regiones de heterocromatina (**Fig. 10**).

En las neuronas dopaminérgicas (D28) se observó un patrón de colocalización intermedio que fue estadísticamente distinto al compararse tanto con las células troncales ( $p < 0.05$ ) como con los precursores neurales ( $p < 0.005$ ) (**Fig. 10**).

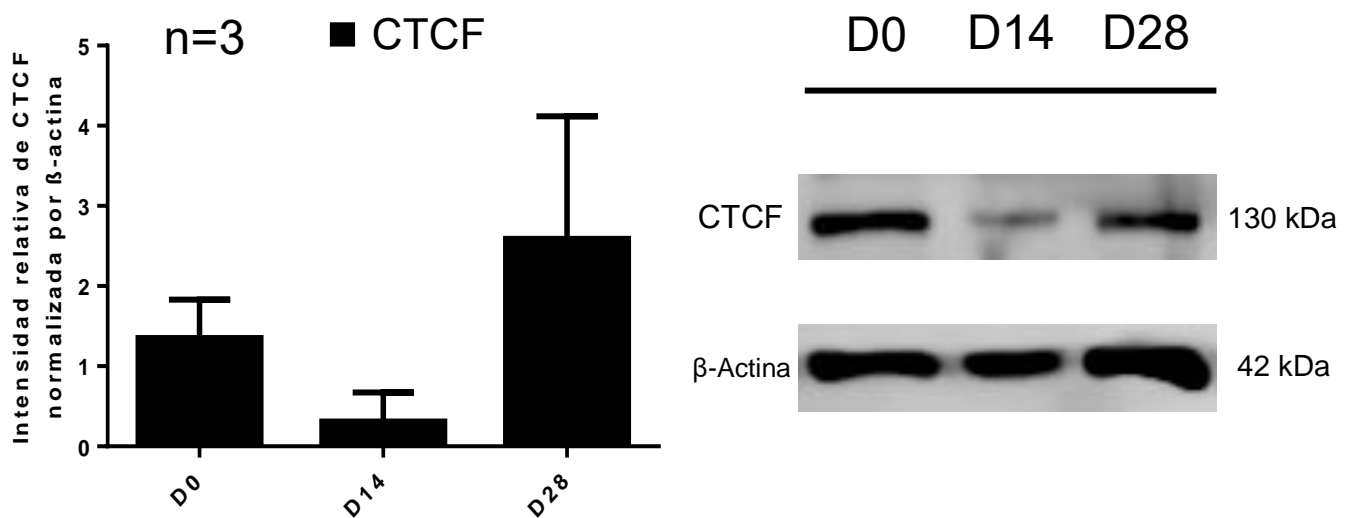


**Figura 10.** Análisis de la distribución espacial de CTCF con respecto a la heterocromatina. **A)** Imágenes representativas de la intensidad de la marca para CTCF y los picos de intensidad para la marca de HOECHST como indicadores de regiones heterocromatínicas a través de la diferenciación dopaminérgica. **B)** Cuantificación del porcentaje de colocalización entre las regiones más intensas para las dos marcas en los tres estadios de diferenciación. \* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ . La barra de escala representa 100  $\mu\text{m}$ .

## 6.6 Evaluación de los niveles proteicos de CTCF a lo largo de la diferenciación dopaminérgica mediante *Western blot*

Para comprobar los datos obtenidos mediante la cuantificación de la intensidad en la fluorescencia para la detección de CTCF en los tres estadios de la diferenciación, se realizaron ensayos de *Western blot* con proteína proveniente de lisados celulares en los días analizados anteriormente.

Se observó una disminución en los niveles proteicos de CTCF del día 0 al día 14 de diferenciación y un posterior aumento en el día 28, que llegó a niveles incluso más altos que los observados en el día 0 (**Fig. 11**). Ninguno de estos cambios resultó ser estadísticamente significativo, pues la desviación estándar mostrada entre las réplicas biológicas es alta. Sin embargo, estos resultados muestran una tendencia similar a lo obtenido anteriormente mediante el análisis de las inmunofluorescencias, y posee cierto nivel de recapitulación de lo que se observa a nivel de RNA.



**Figura 11.** Análisis de los niveles proteicos de CTCF a través de tres estadios de diferenciación mediante *Western blot*. **A)** Cuantificación de la intensidad relativa con respecto a  $\beta$ -Actina de la señal de CTCF en proteína total obtenida de lisados a distintos tiempos de la diferenciación: día 0 (D0), día 14 (D14) y día 28 (D28). Se muestra la media  $\pm$  desviación estándar. No se obtuvieron diferencias significativas (ANOVA de una vía). **B)** Imágenes de los dos *Western blot* analizadas para la obtención de los datos.

## 7 Discusión

Se ha propuesto que el genoma de los mamíferos está organizado en compartimentos estructurales que regulan la interacción entre secuencias a escalas genómicas pequeñas (por debajo de mega-bases). Esto implica que el núcleo celular debería experimentar algunos rearrreglos estructurales necesarios para la activación o inactivación de genes durante los procesos del desarrollo y la diferenciación celular (Beagan et al., 2017). Como se mencionó anteriormente, CTCF es una proteína bien caracterizada, capaz de mediar estas interacciones entre loci genómicos y que se encuentra expresada en prácticamente todos los tejidos del cuerpo humano; en consecuencia, debería estar presente en todas las etapas de diferenciación de las células (Kang et al., 2015). En este trabajo se encontró que CTCF está expresado a lo largo de los tres estadios de diferenciación tomados para el análisis.

Sin embargo, se observó una disminución de CTCF en el día catorce de diferenciación con respecto a los otros dos tiempos evaluados, mientras que los estadios del día cero, y día veintiocho, correspondientes a las células pluripotenciales y a las neuronas dopaminérgicas respectivamente, mostraron niveles comparables de CTCF. La disminución en el día catorce está representada a nivel transcripcional y se observa también a nivel de proteína. Los cambios en la expresión de esta proteína a lo largo de distintos estadios representan una buena aproximación para identificar indicios de reestructuración cromatínica asociada a diferenciación celular, como se ha demostrado en trabajos anteriores. Encontrar dinámicas de expresión de esta proteína arquitectónica no es algo trivial, pues se ha observado que no sigue un patrón común a lo largo de distintos linajes celulares (Beagan et al., 2017; Gao et al., 2011; Tsui et al., 2016)

En trabajos anteriores se demostró en un modelo de diferenciación a partir de precursores neurales extraídos de ratones en días postnatales tempranos, una disminución de CTCF en el estadio de precursor neural con respecto a los niveles en células troncales y neuronas diferenciadas, (Beagan et al., 2017; Sams et al., 2016), lo que concuerda con los resultados obtenidos en este estudio a pesar de la diferencia en los modelos utilizados. Esta comparación es importante porque permite observar que el comportamiento de CTCF durante la diferenciación neural tiene homología entre humano y ratón. También corrobora que el modelo de diferenciación utilizado para este proyecto es capaz de recapitular algunas

características de la remodelación epigenética ocurrida en modelos más parecidos al desarrollo *in vivo*.

El protocolo de diferenciación utilizado en este estudio se enfoca en la producción de neuronas dopaminérgicas, un linaje neuronal hasta ahora inexplorado para la dinámica de expresión de CTCF. El resultado mostró un comportamiento similar a lo ocurrido en el desarrollo de otras regiones del cerebro como la corteza, el cerebelo y el bulbo olfatorio (Beagan et al., 2017).

Otro punto abordado en trabajos anteriores de diferenciación neural fue la localización global de CTCF en el genoma. Se observó que la disminución en la expresión de esta proteína durante el proceso de diferenciación está generalmente asociada con un decremento de su ocupación genómica (Beagan et al., 2017; Tsui et al., 2016), por lo que se presume que en este proceso podría estar ocurriendo un mecanismo similar. Aunque es necesario comprobar los datos mediante inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP), el análisis de la localización de CTCF con respecto a la heterocromatina, se observó una tendencia a la exclusión mutua durante el estadio de célula troncal (**Fig. 12**); se ha reportado que CTCF regula la interacción promotor-enhancer de algunos genes indispensables para el mantenimiento de la pluripotencia como NANOG, SOX2, cMYC, KLF4 y LIN28 y que la ocupación de esta proteína en estos sitios transcripcionalmente activos es indispensable para el mantenimiento de la autorrenovación (Balakrishnan et al., 2012). La relación CTCF-heterocromatina se invierte posteriormente en los precursores neurales (**Fig. 12**); se ha reportado que durante la transición entre células troncales a precursores neurales hay un debilitamiento de las interacciones entre “compartimentos A” de la cromatina (caracterizados por estar transcripcionalmente activos), además de un reforzamiento de los contactos entre “compartimentos B” (caracterizados por estar transcripcionalmente inactivos), por lo que CTCF podría estar localizado mayoritariamente hacia sitios de heterocromatina en este estadio (Bonev et al., 2017). De la misma manera, el estadio de precursor neural se asocia a una disminución de las interacciones entre genes de pluripotencia como OCT4 y NANOG, con sus enhancers, lo que además parece estar vinculada con otros eventos epigenéticos importantes para el silenciamiento de estos genes, como la pérdida de modificaciones postraduccionales de histonas asociadas a promotores transcripcionalmente activos como la H3K4me3 y la posterior metilación del DNA en estas mismas regiones (Beagan et al., 2017; Bonev et al., 2017; Topalovic et al., 2017).



Asimismo, se reportó que los precursores neurales tienen un posicionamiento de CTCF mucho más restringido con respecto a las células troncales; es interesante señalar que la mayoría de los sitios de ocupación presentes en esta etapa pueden ser encontrados también en células troncales embrionarias (Beagan et al., 2017) y que muchos corresponden a sitios regulatorios para el desarrollo neural. Parece que el mecanismo mediante el cual existe una distinción funcional de estas regiones está relacionado con la co-ocupación de CTCF con otras proteínas estructurales de la cromatina como lo que ocurre con YY1. YY1 es otra proteína con un dominio de unión a DNA formado por dedos de zinc que cumple funciones como organizador tridimensional del genoma. Se ha observado un posicionamiento de YY1 concomitantemente con el de CTCF específicamente en regiones reguladoras de genes asociados a precursores neurales y la transición hacia neuronas maduras (Beagan et al., 2017). Es posible que la reestructuración de la cromatina en esos loci este dada por propiedades emergentes que surgen de la interacción de CTCF con estos.

También es posible que algunos de los sitios ocupados por CTCF durante el estadio de célula troncal correspondan a regiones con marcas bivalentes, es decir marcas de histonas represivas y activadoras simultáneamente en un locus (H3K4me2/H3K4me3, H3K27me3, H9K9ac) (Nativio et al., 2011). De ser así, esto explicaría porque la mayoría de los sitios de ocupación de CTCF para el estadio de precursores neurales ya están presentes desde el estadio de célula troncal. Se sabe que la mayoría de los genes que tienen marcas bivalentes son genes importantes para el desarrollo y mediante este mecanismo se evita que queden silenciados terminalmente mientras la célula recibe los estímulos que determinaran el linaje al cual se diferenciara (Mantsoki et al., 2018).

Por otro lado, el que CTCF tenga una disminución durante el estadio de precursores neurales, no indica que no sea necesario durante esta etapa o que su papel pierda importancia en este estadio. Dicha disminución podría ser necesaria para el establecimiento del programa celular requerido al término de la diferenciación, un proceso muy complejo que requiere cambios en la interacción de distintos compartimentos transcripcionales, así como un recambio de las marcas epigenéticas globales (Bonev et al., 2017). De hecho, como ya se mencionó anteriormente, CTCF podría estar regulando la expresión de proteínas esenciales para la diferenciación y mantenimiento del fenotipo dopaminérgico, como LRRK2 (Gregor et al., 2013).

Existe evidencia de que LRRK2 participa en procesos asociados a la neurogénesis. Se ha reportado que una cantidad considerable de esta proteína se asocia a la membrana celular donde su actividad de cinasa se ve potenciada, por lo que se piensa que podría estar involucrada en el tráfico transmembranal. Además, LRRK2 se asocia al funcionamiento de los receptores membranales, los cuales median el crecimiento axonal, y la endocitosis requerida en las vías de señalización neurogénica, como NOTCH y WNT. También se ha observado co-localización de LRRK2 con microtúbulos dentro del cono axonal de crecimiento; LRRK2 se ha visto implicada en la regulación por fosforilación de las proteínas ERM (ezrina-radixina-moesina), las cuales participan también en el desarrollo del cono de crecimiento. Finalmente, se ha visto que la expresión del mRNA de *LRRK2* en el sistema nervioso central inicia en el día embrionario<sup>10</sup> en el murino (Berwick & Harvey, 2013), lo que correlaciona con el inicio de la neurogénesis en el ratón (Sauvageot & Stiles, 2002). Estas observaciones, en conjunto, muestran que la idea de una implicación de LRRK2 en la neurogénesis, está respaldada por fuerte evidencia experimental.

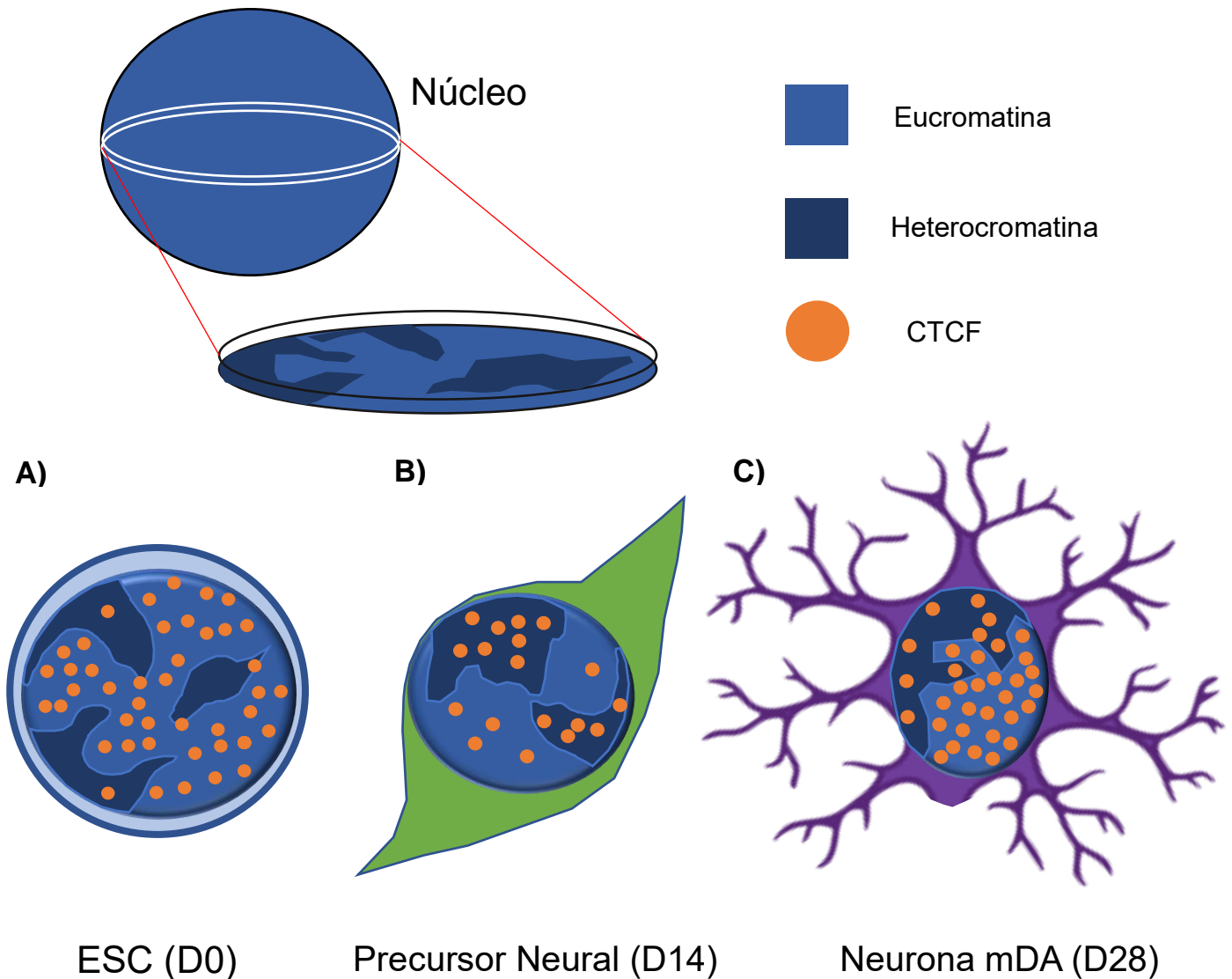
Un hecho interesante la demostración de que el estadio de células troncales se caracteriza por tener marcas de activación transcripcional altamente representadas (H3K4me1, H3K36me3, H3K27ac), lo que denota un estado abierto de la cromatina. Asimismo, la expresión elevada de CTCF durante este estadio con respecto a los precursores neurales, podría estar indicando un enriquecimiento de esta proteína a lo largo del genoma. El estadio de precursor neural se caracteriza por tener una disminución global en las marcas epigenéticas de activación (H3K4me1, H3K36me3, H3K27ac), y un ligero aumento en la marca represiva de heterocromatina constitutiva (H3K9me3) (Bonev et al., 2017), lo que, en conjunto con la disminución de CTCF podría estar evidenciando un proceso de restricción de los sitios transcripcionalmente activos para cuando se inicie el programa de las células terminalmente diferenciadas (Beagan et al., 2017).

Recientemente se reportó que el gen que codifica para TH tiene dominios río arriba altamente conservados. Se comprobó que uno de esos sitios corresponde a un motivo de unión de CTCF. Se determinó que la presencia de esta proteína en esa región en el bulbo olfatorio y neuronas corticales tiene como resultado la represión transcripcional del gen, posiblemente debida al bloqueo de un enhancer con actividad en ese sitio. Es de resaltar que no se ha encontrado enriquecimiento de CTCF en este locus en el mesencéfalo (Wang, 2018) por lo que

hasta la fecha no se ha descrito su papel como regulador de TH en neuronas dopaminérgicas de la sustancia *nigra pars compacta*.

Por otro lado, la expresión del *CTCF*L (BORIS) parálogo de CTCF, se mantuvo baja en el estadio de células troncales y disminuyó aún más durante la diferenciación dopaminérgica, como era de esperarse dado que *CTCF*L es un gen producto de la duplicación de *CTCF*, por lo que su dominio de unión a DNA es prácticamente el mismo, su expresión está restringida a tejido testicular donde parece tener un patrón de expresión mutuamente excluyente con el de CTCF (Loukinov et al., 2002). La expresión de BORIS en tejidos somáticos se asociado ampliamente al desarrollo de cáncer, pues esta desencadena una desorganización global del genoma al competir con CTCF por los motivos de unión (He et al., 2017).

## Modelo propuesto



**Figura 12.** Se esquematiza el modelo propuesto en este trabajo a partir de las observaciones realizadas. A) CTCF esta mayoritariamente asociado a las regiones de baja densidad cromatínica en las ESCs. B) CTCF disminuye su abundancia en el estadio de precursor neural con respecto al estadio de ESC y se encuentra distribuido de una manera más homogénea en el núcleo, aunque con una tendencia a la disposición heterocromatínica. C) CTCF aumenta su abundancia en las neuronas mDA, volviendo a niveles comparables a los existentes en ESCs y se encuentra distribuido con una ligera asociación a regiones de baja densidad cromatínica.

## 8 Conclusión

El hecho de que CTCF tenga una dinámica de expresión diferencial a distintos tiempos de la diferenciación dopaminérgica *in vitro* sugiere que esta proteína presenta un proceso de regulación particular para este proceso diferenciativo en específico. Esto podría tener implicaciones biológicas *in vivo* que explican su papel durante la diferenciación dopaminérgica, en donde podría estar regulando genes esenciales de manera negativa o positiva.

La disminución en la expresión de CTCF durante el estadio de precursores neurales podría deberse a la necesidad de un estado transitorio de reestructuración tridimensional nuclear en el que se establezcan nuevas interacciones entre dominios topológicos, y un recambio de barreras genómicas y reescritura de las modificaciones epigenéticas asociadas, tales como la disminución de las marcas histónicas de activación y el aumento en la metilación del DNA en promotores de genes controladores del programa troncal. Este sería un proceso necesario para apagar y silenciar de la red transcripcional de pluripotencia e iniciar la expresión de inductores de diferenciación que ayudarán a establecer el nuevo programa transcripcional en las neuronas dopaminérgicas terminalmente diferenciadas.

El presente estudio es relevante ya que no se ha evaluado el papel de CTCF en modelos de diferenciación en células humanas, ni para el linaje dopaminérgico. Se encontró un patrón diferencial de expresión de CTCF a lo largo de la diferenciación dopaminérgica *in vitro*, el cual se pudo ver a nivel de mensajero y de proteína. También se observó una tendencia a una relocalización genómica de CTCF a través de la diferenciación dopaminérgica. Estos resultados respaldan estudios previamente realizados en los que se evaluó la expresión y localización de CTCF en modelos de diferenciación neuronal *in vivo* e *in vitro* en el ratón.

## 9 Perspectivas

Este trabajo abordó únicamente la dinámica transcripcional y niveles proteicos de CTCF en tres puntos de la diferenciación dopaminérgica, arrojando datos que indican una regulación particular para esta proteína durante el proceso, que pudiera estar indicando una dinámica ocupacional diferencial a lo largo del genoma. Si bien estos tres estadios reflejan etapas clave como son: el estado pluripotente de célula troncal, el estado multipotente de precursor neural y el estado terminalmente diferenciado de neurona dopaminérgica, sería interesante evaluar más puntos del proceso para determinar el momento preciso de la disminución observada, así como el restablecimiento de los niveles de CTCF hacia el final de la diferenciación.

En este trabajo se reportó la abundancia total de CTCF durante tres estadios de diferenciación dopaminérgica. Sin embargo, es necesario realizar fraccionamientos subcelulares para obtener únicamente la abundancia de CTCF en la cromatina, ya que el ensayo de *Western Blot* se realizó utilizando proteína total.

Actualmente se han realizado estudios enfocados en la diferenciación de otras regiones del cerebro, por lo que sería interesante evaluar si existen cambios entre los subtipos neuronales, asociados a genes o a linaje específicos. Es necesario hacer una revisión bioinformática con el fin de encontrar blancos putativos o previamente reportados de CTCF en regiones reguladoras aledañas a genes controladores de la diferenciación dopaminérgica, y de ser posible, comprobar experimentalmente que la unión de CTCF en estos motivos sea crucial para una correcta diferenciación dopaminérgica. Esto nos permitiría entender la razón del comportamiento de la dinámica de CTCF durante este proceso, así como su importancia.

También se podrían asociar los datos del RNA-seq a blancos putativos de CTCF para evaluar posteriormente mediante ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina si la ocupación de CTCF en estos sitios podría estar repercutiendo en la expresión de estos genes.

## 10 Referencias

- Amit, M., & Itskovitz-Eldor, J. (2002, March). Derivation and spontaneous differentiation of human embryonic stem cells. *Journal of Anatomy*. Wiley-Blackwell.  
<https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.2002.00032.x>
- Balakrishnan, S. K., Witcher, M., Berggren, T. W., & Emerson, B. M. (2012). Functional and Molecular Characterization of the Role of CTCF in Human Embryonic Stem Cell Biology. *PLoS ONE*, 7(8), e42424. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042424>
- Beagan, J. A., Duong, M. T., Titus, K. R., Zhou, L., Cao, Z., Ma, J., ... Phillips-cremins, J. E. (2017). YY1 and CTCF orchestrate a 3-D chromatin looping switch during early neural lineage commitment. *Genome Research*, gr.215160.116.  
<https://doi.org/10.1101/gr.215160.116>
- Beattie, G. M., Lopez, A. D., Bucay, N., Hinton, A., Firpo, M. T., King, C. C., & Hayek, A. (2005). Activin A Maintains Pluripotency of Human Embryonic Stem Cells in the Absence of Feeder Layers. *Stem Cells*, 23(4), 489–495. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0279>
- Berwick, D. C., & Harvey, K. (2013). LRRK2: an éminence grise of Wnt-mediated neurogenesis? *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7, 82.  
<https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00082>
- Bonev, B., Mendelson Cohen, N., Szabo, Q., Fritsch, L., Papadopoulos, G. L., Lubling, Y., ... Cavalli, G. (2017). Multiscale 3D Genome Rewiring during Mouse Neural Development. *Cell*, 171(3), 557–572.e24. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.043>
- Boyer, L. A., Lee, T. I., Cole, M. F., Johnstone, S. E., Levine, S. S., Zucker, J. P., ... Young, R. A. (2005). Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells. *Cell*, 122(6), 947–956. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.020>
- Bradley, A., Evans, M., Kaufman, M. H., & Robertson, E. (1984). Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature*, 309(5965), 255–256.  
<https://doi.org/10.1038/309255a0>
- Carlson, B. M. (2014). Human Embryology and Developmental Biology, Urogenital System. *Human Embryology and Developmental Biology*, 1, 1–48. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-05385-3.50011-8>
- Cogle, C. R., Guthrie, S. M., Sanders, R. C., Allen, W. L., Scott, E. W., & Petersen, B. E.

- (2003). An Overview of Stem Cell Research and Regulatory Issues. *Mayo Clinic Proceedings*, 78(8), 993–1003. <https://doi.org/10.4065/78.8.993>
- Davidson, K. C., Jamshidi, P., Daly, R., Hearn, M. T. W., Pera, M. F., & Dottori, M. (2007). Wnt3a regulates survival, expansion, and maintenance of neural progenitors derived from human embryonic stem cells. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 36(3), 408–415. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2007.07.013>
- de Miguel, M. P., Fuentes-Julián, S., & Alcaina, Y. (2010). Pluripotent Stem Cells: Origin, Maintenance and Induction. *Stem Cell Reviews and Reports*. <https://doi.org/10.1007/s12015-010-9170-1>
- Delgado-Olguin, P., Brand-Arzamendi, K., Scott, I. C., Jungblut, B., Stainier, D. Y., Bruneau, B. G., & Recillas-Targa, F. (2011). CTCF Promotes Muscle Differentiation by Modulating the Activity of Myogenic Regulatory Factors. *Journal of Biological Chemistry*, 286(14), 12483–12494. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.164574>
- Doetschman, T., Williams, P., & Maeda, N. (1988). Establishment of hamster blastocyst-derived embryonic stem (ES) cells. *Developmental Biology*, 127(1), 224–7.
- Donohoe, M. E., Zhang, L.-F., Xu, N., Shi, Y., & Lee, J. T. (2007). Identification of a Ctf cofactor, Yy1, for the X Chromosome Binary Switch. *Molecular Cell*, 25(1), 43–56. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.11.017>
- Dubois-Chevalier, J., Oger, F., Dehondt, H., Firmin, F. F., Gheeraert, C., Staels, B., ... Eeckhoute, J. (2014). A dynamic CTCF chromatin binding landscape promotes DNA hydroxymethylation and transcriptional induction of adipocyte differentiation. *Nucleic Acids Research*, 42(17), 10943–10959. <https://doi.org/10.1093/nar/gku780>
- Evans, M. J., & Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292(5819), 154–156. <https://doi.org/10.1038/292154a0>
- Gaarenstroom, T., & Hill, C. S. (2014). TGF- $\beta$  signaling to chromatin: How Smads regulate transcription during self-renewal and differentiation. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 32, 107–118. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.01.009>
- Gale, E., & Li, M. (2008). Midbrain dopaminergic neuron fate specification: Of mice and embryonic stem cells. *Molecular Brain*, 1(1), 8. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-1-8>
- Gao, J., Wang, J., Wang, Y., Dai, W., & Lu, L. (2011). Regulation of Pax6 by CTCF during induction of mouse ES cell differentiation. *PLoS ONE*, 6(6), e20954. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020954>



- Gavin, D., Grayson, D., Varghese, S., & Guizzetti, M. (2017). Chromatin Switches during Neural Cell Differentiation and Their Dysregulation by Prenatal Alcohol Exposure. *Genes*, 8(5), 137. <https://doi.org/10.3390/genes8050137>
- Gregor, A., Oti, M., Kouwenhoven, E. N., Hoyer, J., Sticht, H., Ekici, A. B., ... Zweier, C. (2013). De Novo Mutations in the Genome Organizer CTCF Cause Intellectual Disability. *The American Journal of Human Genetics*, 93(1), 124–131. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.05.007>
- Guenther, M. G. (2011). Transcriptional control of embryonic and induced pluripotent stem cells. *Epigenomics*, 3(3), 323–343. <https://doi.org/10.2217/epi.11.15>
- Hackett, J. A., & Surani, M. A. (2014). Regulatory Principles of Pluripotency: From the Ground State Up. *Cell Stem Cell*, 15(4), 416–430. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.09.015>
- He, J., Huang, Y., Liu, Z., Zhao, R., Liu, Q., Wei, L., ... Qin, Y. (2017). Hypomethylation of BORIS is a promising prognostic biomarker in hepatocellular carcinoma. *Gene*, 629, 29–34. <https://doi.org/10.1016/J.GENE.2017.07.077>
- Hegarty, S. V., Sullivan, A. M., & O’Keeffe, G. W. (2013, July 15). Midbrain dopaminergic neurons: A review of the molecular circuitry that regulates their development. *Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.04.014>
- Hernández-Hernández, A., Lilienthal, I., Fukuda, N., Galjart, N., & Höög, C. (2016). CTCF contributes in a critical way to spermatogenesis and male fertility. *Scientific Reports*, 6(1), 28355. <https://doi.org/10.1038/srep28355>
- Hirayama, T., Tarusawa, E., Yoshimura, Y., Galjart, N., & Yagi, T. (2012). CTCF Is Required for Neural Development and Stochastic Expression of Clustered Pcdh Genes in Neurons. *CellReports*, 2, 345–357. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.06.014>
- Hoffman, L. M., & Carpenter, M. K. (2005). Characterization and culture of human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*, 23(6), 699–708. <https://doi.org/10.1038/nbt1102>
- Holwerda, S., & de Laat, W. (2012). Chromatin loops, gene positioning, and gene expression. *Frontiers in Genetics*, 3(OCT), 34–1. <https://doi.org/10.3389/fgene.2012.00217>
- Huelsken, J. (2002). The Wnt signalling pathway. *Journal of Cell Science*, 115(21), 3977–3978. <https://doi.org/10.1242/jcs.00089>
- Iannaccone, P. M., Taborn, G. U., Garton, R. L., Caplice, M. D., & Brenin, D. R. (1994). Pluripotent Embryonic Stem Cells from the Rat Are Capable of Producing Chimeras. *Developmental Biology*, 163(1), 288–292. <https://doi.org/10.1006/dbio.1994.1146>

- James, D. (2005). TGF /activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. *Development*, 132(6), 1273–1282. <https://doi.org/10.1242/dev.01706>
- Kang, J. Y., Song, S. H., Yun, J., Jeon, M. S., Kim, H. P., Han, S. W., & Kim, T. Y. (2015). Disruption of CTCF/cohesin-mediated high-order chromatin structures by DNA methylation downregulates PTGS2 expression. *Oncogene*, 34(45), 5677–5684. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.17>
- Kazakevych, J., Sayols, S., Messner, B., Krienke, C., & Soshnikova, N. (2017). Dynamic changes in chromatin states during specification and differentiation of adult intestinal stem cells. *Nucleic Acids Research*, 45(10), 5770–5784. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx167>
- Kim, H. D., Lee, E. A., Choi, Y. H., An, Y. H., Koh, R. H., Kim, S. L., & Hwang, N. S. (2016, April 1). High throughput approaches for controlled stem cell differentiation. *Acta Biomaterialia*. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.02.022>
- Kim, T. H., Abdullaev, Z. K., Smith, A. D., Ching, K. A., Loukinov, D. I., Green, R. D. D., ... Ren, B. (2007). Analysis of the Vertebrate Insulator Protein CTCF-Binding Sites in the Human Genome. *Cell*, 128(6), 1231–1245. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.12.048>
- Kraushaar, D. C., & Zhao, K. (2013). The epigenomics of embryonic stem cell differentiation. *International Journal of Biological Sciences*. <https://doi.org/10.7150/ijbs.7998>
- Kriks, S., Shim, J.-W., Piao, J., Ganat, Y. M., Wakeman, D. R., Xie, Z., ... Studer, L. (2011). Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease. *Nature*, 480(7378), 547–551. <https://doi.org/10.1038/nature10648>
- Li, T., Lu, Z., & Lu, L. (2004). Regulation of eye development by transcription control of CCCTC Binding Factor (CTCF). *Journal of Biological Chemistry*, 279(26), 27575–27583. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313942200>
- Linhoff, M. W., Garg, S. K., & Mandel, G. (2015). A high-resolution imaging approach to investigate chromatin architecture in complex tissues. *Cell*, 163(1), 246–55. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.002>
- Loukinov, D. I., Pugacheva, E., Vatolin, S., Pack, S. D., Moon, H., Chernukhin, I., ... Lobanenkov, V. V. (2002). BORIS, a novel male germ-line-specific protein associated with epigenetic reprogramming events, shares the same 11-zinc-finger domain with CTCF, the insulator protein involved in reading imprinting marks in the soma.

*Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(10), 6806–6811.

<https://doi.org/10.1073/pnas.092123699>

Lowell, S., Benchoua, A., Heavey, B., & Smith, A. G. (2006). Notch promotes neural lineage entry by pluripotent embryonic stem cells. *PLoS Biology*, 4(5), 805–818.

<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040121>

Mantsoki, A., Devailly, G., & Joshi, A. (2018). Dynamics of promoter bivalency and RNAP II pausing in mouse stem and differentiated cells. *BMC Developmental Biology*, 18(1), 2.

<https://doi.org/10.1186/s12861-018-0163-7>

Maye, P., Becker, S., Siemen, H., Thorne, J., Byrd, N., Carpentino, J., & Grabel, L. (2004). Hedgehog signaling is required for the differentiation of ES cells into neurectoderm.

*Developmental Biology*, 265(1), 276–290. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2003.09.027>

McMahon, A. P., Takada, S., Ikeya, M., Lee, S. M. K., & Johnson, J. E. (1997). Wnt signalling required for expansion of neural crest and CNS progenitors. *Nature*, 389(6654), 966–970.

<https://doi.org/10.1038/40146>

Mikkelsen, T. S., Xu, Z., Zhang, X., Wang, L., Gimble, J. M., Lander, E. S., & Rosen, E. D. (2010). Comparative Epigenomic Analysis of Murine and Human Adipogenesis. *Cell*,

143(1), 156–169. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.09.006>

Misteli, T. (2007). Beyond the Sequence: Cellular Organization of Genome Function. *Cell*, 128(4), 787–800. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.028>

Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., ... Yamanaka, S. (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*, 113(5), 631–42.

Moon, R. T. (1993). In pursuit of the functions of the Wnt family of developmental regulators: insights from *Xenopus laevis*. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*,

15(2), 91–7. <https://doi.org/10.1002/bies.950150204>

Murry, C. E., & Keller, G. (2008). Differentiation of Embryonic Stem Cells to Clinically Relevant Populations: Lessons from Embryonic Development. *Cell*, 132(4), 661–680.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.02.008>

Nativio, R., Sparago, A., Ito, Y., Weksberg, R., Riccio, A., & Murrell, A. (2011). Disruption of genomic neighbourhood at the imprinted IGF2-H19 locus in Beckwith-Wiedemann syndrome and Silver-Russell syndrome. *Human Molecular Genetics*, 20(7), 1363–74.

<https://doi.org/10.1093/hmg/ddr018>

- Nichols, J., & Smith, A. (2009). Naive and Primed Pluripotent States. *Cell Stem Cell*, 4(6), 487–492. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.05.015>
- Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., ... Smith, A. (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell*, 95(3), 379–91.
- Niwa, H., Smith, A. G., & Miyazaki, J. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nature Genetics*, 24(4), 372–376. <https://doi.org/10.1038/74199>
- Ohtsuka, S., & Dalton, S. (2008). Molecular and biological properties of pluripotent embryonic stem cells. *Gene Therapy*, 15, 74–81. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3303065>
- Okabe, S., Forsberg-Nilsson, K., Spiro, A. C., Segal, M., & McKay, R. D. G. (1996). Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro. *Mechanisms of Development*, 59(1), 89–102. [https://doi.org/10.1016/0925-4773\(96\)00572-2](https://doi.org/10.1016/0925-4773(96)00572-2)
- Ong, C.-T., & Corces, V. G. (2014). CTCF: An Architectural Protein Bridging Genome Topology and Function. *Nature Reviews Genetics*, 15(4), 234–246. <https://doi.org/10.1038/nrg3663>
- Pant, V., Mariano, P., Kanduri, C., Mattsson, A., Lobanenko, V., Heuchel, R., & Ohlsson, R. (2003). The nucleotides responsible for the direct physical contact between the chromatin insulator protein CTCF and the H19 imprinting control region manifest parent of origin-specific long-distance insulation and methylation-free domains. *Genes and Development*, 17(5), 586–590. <https://doi.org/10.1101/gad.254903>
- Phillips, J. E., & Corces, V. G. (2009). CTCF: Master Weaver of the Genome. *Cell*, 137(7), 1194–1211. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.001>
- Rivero-Hinojosa, S., Kang, S., Lobanenko, V. V., & Zentner, G. E. (2017). Testis-specific transcriptional regulators selectively occupy BORIS-bound CTCF target regions in mouse male germ cells. *Scientific Reports*, 7, 41279. <https://doi.org/10.1038/srep41279>
- Rossant, J. (2007). Stem cells and lineage development in the mammalian blastocyst. *Reproduction, Fertility, and Development*, 19(1), 111–8.
- Sams, D. S., Nardone, S., Getselter, D., Raz, D., Tal, M., Rayi, P. R., ... Elliott, E. (2016). Neuronal CTCF Is Necessary for Basal and Experience-Dependent Gene Regulation, Memory Formation, and Genomic Structure of BDNF and Arc. *Cell Reports*, 17(9), 2418–

2430. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.11.004>

- Sato, N., Meijer, L., Skaltsounis, L., Greengard, P., & Brivanlou, A. H. (2004). Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nature Medicine*, *10*(1), 55–63. <https://doi.org/10.1038/nm979>
- Sauvageot, C. M., & Stiles, C. D. (2002, June 1). Molecular mechanisms controlling cortical gliogenesis. *Current Opinion in Neurobiology*. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(02\)00322-7](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(02)00322-7)
- Siersbæk, R., Madsen, J. G. S., Javierre, B. M., Nielsen, R., Bagge, E. K., Cairns, J., ... Mandrup, S. (2017). Dynamic Rewiring of Promoter-Anchored Chromatin Loops during Adipocyte Differentiation. *Molecular Cell*, *66*(3), 420–435.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.04.010>
- Smeets, D., Markaki, Y., Schmid, V. J., Kraus, F., Tattermusch, A., Cerase, A., ... Cremer, M. (2014). Three-dimensional super-resolution microscopy of the inactive X chromosome territory reveals a collapse of its active nuclear compartment harboring distinct Xist RNA foci. *Epigenetics & Chromatin*, *7*(1), 8. <https://doi.org/10.1186/1756-8935-7-8>
- Snykers, S., De Kock, J., Rogiers, V., & Vanhaecke, T. (2009). In Vitro Differentiation of Embryonic and Adult Stem Cells into Hepatocytes: State of the Art. *Stem Cells*, *27*(3), 577–605. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2008-0963>
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, *126*(4), 663–676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- Tam, P. P., & Behringer, R. R. (1997). Mouse gastrulation: the formation of a mammalian body plan. *Mechanisms of Development*, *68*(1–2), 3–25.
- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., & Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science (New York, N. Y.)*, *282*(5391), 1145–7.
- Thomson, J. A., Kalishman, J., Golos, T. G., Durning, M., Harris, C. P., Becker, R. A., & Hearn, J. P. (1995). Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *92*(17), 7844–8.
- Thomson, J. A., & Marshall, V. S. (1998). Primate embryonic stem cells. *Current Topics in Developmental Biology*, *38*, 133–65.

- Topalovic, V., Schwirtlich, M., Stevanovic, M., & Mojsin, M. (2017). Histone modifications on the promoters of human OCT4 and NANOG genes at the onset of neural differentiation of NT2/D1 cells. *Biochemistry (Moscow)*, *82*(6), 715–722.  
<https://doi.org/10.1134/S0006297917060086>
- Tsui, S., Wang, J., Wang, L., Dai, W., & Lu, L. (2016). CTCF-mediated and Pax6-associated gene expression in corneal epithelial cell-specific differentiation. *PLoS ONE*, *11*(9), e0162071. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162071>
- Valeria Canto-Soler, M., Huang, H., Soledad Romero, M., & Adler, R. (n.d.). Transcription Factors CTCF and Pax6 Are Segregated to Different Cell Types During Retinal Cell Differentiation.
- Vallier, L. (2005). Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. *Journal of Cell Science*. <https://doi.org/10.1242/jcs.02553>
- van Hoof, D., Krijgsveld, J., & Mummery, C. (2012). Proteomic analysis of stem cell differentiation and early development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *4*(3). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008177>
- Wang, M., Fones, L., & Cave, J. W. (2018). Conserved Upstream Regulatory Regions in Mammalian Tyrosine Hydroxylase. *Molecular Neurobiology*.  
<https://doi.org/10.1007/s12035-018-0936-9>
- Watson, L. A., Wang, X., Elbert, A., Kernohan, K. D., Galjart, N., & Berube, N. G. (2014). Dual Effect of CTCF Loss on Neuroprogenitor Differentiation and Survival. *Journal of Neuroscience*, *34*(8), 2860–2870. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3769-13.2014>
- Wu, D., Li, T., Lu, Z., Dai, W., Xu, M., & Lu, L. (2006). Effect of CTCF-Binding Motif on Regulation of PAX6 Transcription. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *47*(6), 2422. <https://doi.org/10.1167/iovs.05-0536>
- Wu, H., Gordon, J. A. R., Whitfield, T. W., Tai, P. W. L., van Wijnen, A. J., Stein, J. L., ... Lian, J. B. (2017). Chromatin Dynamics Regulate Mesenchymal Stem Cell Lineage Specification and Differentiation to Osteogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, *1860*(4), 438–449.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2017.01.003>
- Wurst, W., & Prakash, N. (2014, February 1). Wnt1-regulated genetic networks in midbrain dopaminergic neuron development. *Journal of Molecular Cell Biology*. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjt046>

- Xu, R.-H., Sampsel-Barron, T. L., Gu, F., Root, S., Peck, R. M., Pan, G., ... Thomson, J. A. (2008). NANOG Is a Direct Target of TGF $\beta$ /Activin-Mediated SMAD Signaling in Human ESCs. *Cell Stem Cell*, 3(2), 196–206. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2008.07.001>
- Ying, Q.-L., Stavridis, M., Griffiths, D., Li, M., & Smith, A. (2003). Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. *Nature Biotechnology*, 21(2), 183–186. <https://doi.org/10.1038/nbt780>
- Zlatanova, J., & Caiafa, P. (2009). CTCF and its protein partners: divide and rule? *Journal of Cell Science*, 122(9), 1275–1284. <https://doi.org/10.1242/jcs.039990>