

TESIS DOCTORAL

Regulación de la diferenciación celular por retrotransposones Alu: modificaciones estructurales en la cromatina e implicación en la maduración de células germinales

Francisco Javier González Rico

Programa de doctorado en Biología Molecular y Celular, Biomedicina y Biotecnología

2018



TESIS DOCTORAL

Regulación de la diferenciación celular por retrotransposones Alu: modificaciones estructurales en la cromatina e implicación en la maduración de células germinales

Francisco Javier González Rico

Programa de doctorado en Biología Molecular y Celular, Biomedicina y Biotecnología

2018

Conformidad del director de tesis

Conformidad del codirector de tesis

Fdo: Pedro M. Fernández Salguero

Fdo: Ángel Carlos Román García

Índice

Introducción

- 1. El receptor de dioxina (AhR): toxicología.
- 2. Estructura proteica de AhR
- 3. Mecanismo de activación y localización intracelular de AhR.
- 4. Papel de AhR en la fisiología celular.
- 5. Control de la expresión génica.
- 6. Elementos repetitivos: retrotransposones.
- 7. Modificación de la arquitectura de la cromatina.
- 8. Diferenciación celular y pluripotencia.
- 9. NANOG.
- 10. OCT4.
- 11. Gametogénesis.

Materiales y métodos.

- 1. Cultivo de líneas celulares.
 - 1.1. Tratamientos.
 - **1.2.** Vectores.

2. Análisis de niveles proteicos mediante immunoblotting (westernblotting).

- 2.1. Preparación de los extractos proteicos.
- 2.2. Preparación de extractos proteicos nucleares.
- 2.3. Medida de la concentración de proteína.
- **2.4.** Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y transferencia a membranas de nitrocelulosa.

3. Inmunoprecipitación de proteínas.

- 4. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).
- 5. Doble ChIP consecutivo (Re-ChIP).
- 6. Análisis de la expresión génica mediante PCR en tiempo real (qPCR).

7. Transfección de células en cultivo.

8. Chromosome Conformation Capture (3C).

- 8.1. Cross-linking y digestión celular.
- 8.2. Digestión enzimática.
- **8.3.** Ligación de la cromatina digerida.
- 8.4. Revertir cross-linking y purificación del DNA.
- 8.5. PCR cuantitativa de los productos de ligación.
- 8.6. Preparación del BAC.

9. Engineered Chromatin Immunoprecipitation (enChIP) mediante CRISPR.

- 9.1. Cultivo, tratamientos y transfección.
- 9.2. Fijación y sonicación de la cromatina.
- 9.3. Incubación con anticuerpos y lavados.
- 9.4. Elución y purificación de las muestras.
- 9.5. Separación en gel de acrilamida.
- 9.4. Análisis por espectrometría de masas: proteómica.
- 10. Inmunofluorescencia de células.

11. Inmunofluorescencia de tejidos e inmunohistoquímica.

- 12. Extracción de fragmentos de mononucleosoma de células N-TERA2.
 - 12.1. Extracción de núcleos.
 - 12.2. Digestión nuclear con MNase (Nucleasa Micrococal).
- 13. Hibridación in situ.
- 14. Ensayos de fertilidad y obtención de esperma del epidídimo.
- 15. Caracterización funcional de los espermatozoides de los epidídimos.

- 16. Medida de la actividad esteroidogénica.
- 17. Citometría de flujo.
- 18. Medida de la motilidad espermática y parámetros cinéticos.
- 19. Aislamiento de folículos, vesículas germinales y oocitos MII.
- 20. Análisis estadístico.

Objetivos (Capítulo I)

Resultados (Capítulo I).

- 1. Detección bioinformática de los elementos x14s, x36s y x45s.
- 2. Búsqueda por homología y caracterización de las secuencias X14S, X36S y X45S.
- 3. Alineamiento de secuencias XS-Alu.
- 4. Expresión de genes de pluripotencia.
- 5. Expresión de AhR en las células N-TERA2.
- 6. Expresión de genes de diferenciación en presencia/ausencia de AhR.
- 7. Unión de AhR a elementos Alu de OCT4 y NANOG.
- 8. Actividad insulator de los elementos Alu de OCT4 y NANOG.
- 9. Análisis de las marcas de histonas en NANOG y OCT4.

10. Análisis de la estructura de la cromatina mediante el método 3C (Chromosome Conformation Capture).

11. Experimentos de Engineered Chromatin Immunoprecipitation (enChIP Cas9).

12. Estudio de la estructura de los nucleosomas.

Conclusiones (Capítulo I).

Objetivos (Capítulo II).

Resultados (Capítulo II).

- 1. Análisis de testículos de ratón AhR+/+ y AhR-/-.
- 2. Expresión de retrotransposones en el nuage.
- 3. Análisis de las características y viabilidad espermática.
- 4. Análisis de ovarios de ratón AhR+/+ y AhR-/-.

Conclusiones (Capítulo II).

Discusión.

Conclusión final del estudio.

Bibliografía.

Introducción

1. El receptor de dioxina (AhR): toxicología.

A finales de los años 70 se consigue con éxito el descubrimiento y la caracterización bioquímica del receptor de dioxina (AhR, Aryl hydrocarbon Receptor) en el citosol de células de hígado de ratón (Poland et al, 1976). Fue descrito como una proteína implicada en la destoxificación de xenobióticos y, además, en el mecanismo de inducción de enzimas destoxificantes, como por ejemplo el citocromo P450 CYP1A1 (Okey et al, 1979; Poland and Knutson, 1982). Hasta ese momento, únicamente se conocía que el mecanismo de activación de AhR requería la unión de un ligando exógeno, es decir, que en ausencia de xenobióticos no se producía ninguna actividad transcripcional dependiente de AhR. No fue hasta mediados de los años 90 con la producción de modelos animales deficientes en la expresión de AhR generados por técnicas de gene knock-out cuando se confirmó el papel toxicológico del receptor, ya que se comprobó que los ratones carentes de AhR (AhR -/-) eran resistentes a los efectos tóxicos y carcinogénicos de compuestos xenobióticos tales como la dioxina TCDD (2,3,7,8-tetracloro-dibenzo-p-dioxina) y benzo-[a]-pireno (BP) (Fernández-Salguero et al., 1996a; Mimura et al., 1997; Shimizu et al., 2000). Numerosos estudios moleculares in vitro posteriores permitieron definir a AhR como un factor de transcripción que se activaba por la unión a un ligando y que mediaba los efectos tóxicos y carcinogénicos de gran número de compuestos xenobióticos tales como hidrocarburos aromáticos halogenados (HAHs), compuestos policíclicos aromáticos (PAHs, Policyclic Aromatic Hydrocarbons) y bifenilos policlorinados (PCBs, Polichlorinated Biphenyls). Por tanto, se estableció el precepto de que AhR era responsable de gran parte de los efectos tóxicos y carcinogénicos inducidos por xenobióticos, en buena medida como resultado de la inducción transcripcional de enzimas destoxificantes hepáticas de las fases I y II (Fernández-Salguero et al., 1996a; Fernández-Salguero et al., 1996b; Pohjanvirta and Tuomisto, 1994; Shimizu et al., 2000). Debido a la importancia en los campos toxicológicos y cancerígenos de estos xenobióticos, se potenció una exhaustiva investigación para dilucidar el mecanismo molecular por el que actuaba AhR, para definir su ruta de señalización intracelular, así como identificar los intermediarios que regulan su compartimentalización núcleo-citoplasmática y comprender su función como regulador transcripcional de los genes diana de la superfamilia CYP450s como el CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1 y CYP1S1. Estos estudios, además, pusieron de manifiesto que AhR poseía funciones fisiológicas relevantes en la célula, debido a que

los ratones *knock-out* presentaban múltiples cambios fenotípicos que incluían alteraciones reproductoras, patologías hepáticas, defectos en los sistemas vascular e inmune y problemas cardíacos (Abbott *et al.*, 1999a; Benedict *et al.*, 2000; Fernández-Salguero *et al.*, 1995; Fernández-Salguero *et al.*, 1997; Mimura *et al.*, 1997).

Desde el punto de vista evolutivo, se comprobó que AhR poseía una secuencia altamente conservada entre diferentes especies (Hahn, 2002) y un patrón de expresión constitutivo durante el desarrollo y en los tejidos adultos (Abbott et al., 1995), además de que el gen que lo codifica estaba presente en todo el rango de Metazoos, los cuales surgieron evolutivamente millones de años antes de la existencia de dioxinas en la Biosfera. Por tanto, actualmente está ampliamente aceptado que AhR cumple una función en la biología, el desarrollo y la fisiología celular (Baba et al., 2005; Elizondo et al., 2000a; Fernández-Salguero et al., 1995; Puga et al., 2005). Parecía claro que la modulación de procesos toxicológicos por AhR era un mecanismo adaptativo a la aparición de xenobióticos en la Biosfera, de tal manera que su función toxicológica representaba una versión exacerbada de su verdadera función fisiológica. Así, por ejemplo, la activación de AhR por ligandos como TCDD o BP provoca la parada del ciclo celular en G0/G1 y G2/M, la disminución de la replicación del DNA y la inhibición de la proliferación celular (Puga et al., 2002). Por el contrario, en ausencia de estos compuestos, AhR tiene capacidad para promover la progresión del ciclo celular ya que los fibroblastos embrionarios $AhR^{-/-}$ presentan menor proliferación y mayor tasa apoptótica que las células procedentes de ratones silvestres $(AhR^{+/+})$ (Elizondo et al., 2000a; Fernández-Salguero et al., 1995).

Por tanto, debido a la actividad transcripcional que posee AhR en respuesta a xenobióticos, lo lógico era pensar que dentro de sus funciones fisiológicas estaría la de actuar como factor de transcripción que regula la expresión de genes implicados en homeostasis y fisiología celular. Así, se demostró que AhR regulaba la expresión de genes tales como la DNA polimerasa kappa (Ogi *et al.*, 2001), *N*-miristoil-transferasa 2 (Kolluri *et al.*, 2001), p27^{*Kip1*} (Kolluri *et al.*, 1999), Bax (Matikainen *et al.*, 2001), T-cadherina (Niermann *et al.*, 2003), c-myc (Yang *et al.*, 2005), Slug/SNAI2 (Ikuta and Kawajiri, 2006), Vav3 (Carvajal-Gonzalez *et al.*, 2009a), la proteína de unión a TGFβ latente LTBP-1 (Gómez-Duran *et al.*, 2008a) y la proteína de maduración de linfocitos B (Ikuta *et al.*, 2010). Para esta actividad transcripcional de AhR siempre era necesaria la formación de un heterodímero con ARNT (*Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear*)

Translocator). Posteriormente, se hicieron estudios en los que se utilizaron *microarrays* de expresión en condiciones de presencia/ausencia de xenobióticos, en los cuales se identificaron un número relevante de genes potencialmente regulados por AhR, algunos de los cuales estaban relacionados con funciones endógenas y con la homeostasis celular, pero no con el metabolismo de xenobióticos (Boverhof *et al.*, 2005; Frericks *et al.*, 2007; Tijet *et al.*, 2006). Además, se hicieron estudios que mostraban que AhR podía actuar como cofactor y modulador de la actividad de importantes reguladores transcripcionales en la fisiología celular; entre los que se encontraban NF-κβ (mediador de estrés oxidativo y reacciones inflamatorias (Tian *et al.*, 1999), pRb (proteína retinoblastoma) hipofosforilada (Huang and Elferink, 2005; Marlowe *et al.*, 2004) o ERα (receptor de estrógenos α) (Klinge *et al.*, 1999; Klinge *et al.*, 2000; Wormke *et al.*, 2000).

Por último, también se describió cómo AhR, además de su relevante función como factor de transcripción, participaba directamente en rutas activadas por mitógenos (MAPK) (Tan *et al.*, 2002; Tan *et al.*, 2004), por estrógenos (Ohtake *et al.*,2003; Wormke *et al*, 2003) o por la proteína quinasa c-Src (Blankenship and Matsumura, 1997; Dong and Matsumura, 2008; Vogel and Matsumura, 2003). De esta manera, AhR era capaz de modular la disponibilidad y/o el estado de activación de estas proteínas.

2. Estructura proteica de AhR

La clonación y secuenciación del gen que codifica para AhR reveló que es un miembro de la superfamilia de factores de transcripción con un dominio del tipo *basic-Helix-Loop-Helix* (bHLH), cuya característica diferencial es su activación por la unión de ciertos ligandos exógenos. Dentro de esta superfamilia de proteínas se ha definido una subfamilia para aquellos factores que incluyen dominios del tipo PAS: Per (*Period*, proteína que mantiene el ritmo circadiano en *Drosophila melanogaster*), ARNT y Sim (*Single Minded*, proteína reguladora del desarrollo del sistema nervioso central de *Drosophila melanogaster*). Por ello, a esta familia de factores de transcripción se la denomina bHLH/PAS (*Basic Helix-Loop-Helix*/Per-ARNT-Sim). En términos generales, las proteínas bHLH/PAS están implicadas en el control de un amplio abanico de procesos fisiológicos tales como embriogénesis, desarrollo neuronal, ritmo circadiano, angiogénesis, metabolismo y respuesta a hipoxia (Fernández-Salguero *et al.*,

1995; Fukunaga et al., 1995; Sonnenfeld et al., 1997; Alexander et al., 1998; Chan et al., 1999; Whitlock, 1999).

El dominio bHLH se localiza en el extremo N-terminal de la proteína (Figura **I1**), de tal modo que mientras que la región básica media la unión al DNA, el dominio HLH es necesario para la heterodimerización con ARNT. Siguiendo hacia el extremo Cterminal se localiza el dominio PAS, que está formado por dos copias de una repetición degenerada de unos 50 aminoácidos denominados PAS-A y PAS-B, separadas entre sí por otros 110 aminoácidos. La región PAS-B contiene parte del dominio de unión al ligando y un dominio necesario para la interacción de AhR con el chaperón Hsp90 (Heat Shock Protein 90 kDa) (Procopio et al., 2002). El extremo C-terminal de AhR, ARNT y Sim contiene una región rica en glutamina (Q), similar a los dominios de transactivación presentes en otros factores de transcripción y, consecuentemente, la pérdida del dominio C-terminal no afecta la unión al DNA ni al ligando (Fukunaga et al., 1995). Esta región C-terminal permitiría a AhR interactuar con diversos coactivadores, no caracterizados completamente, que determinarían la tasa final de transcripción. De manera adicional, se consiguió identificar en el extremo amino terminal de AhR una región NLS (Nuclear Localization Signal) capaz de ser reconocida por dos componentes del complejo que forma el poro nuclear. Por último, AhR presenta dos regiones NES (Nuclear Export Signal) en el dominio bHLH y PAS-A, respectivamente, ricas en el aminoácido leucina, que son reconocidas por la proteína CRM1 (Chromosome Region Maintenance 1) (Berg and Pongratz, 2001; Ikuta et al., 1998).



Figura I1. Estructura de varios miembros de la familia de reguladores transcripcionales bHLH/PAS: AhR y ARNT de ratón y SIM y PER de Drosophila melanogaster. Se indican las regiones de homología y los dominios funcionales de cada proteína.

3. Mecanismo de activación y localización intracelular de AhR.

Existen múltiples factores que pueden modificar la actividad transcripcional de AhR, y entre ellos se incluyen agentes químicos y factores biológicos. Sin embargo, la mayor parte de los estudios realizados se han centrado en el proceso de activación de AhR por la unión de ligandos exógenos, así como en el mecanismo de inducción de genes diana, clásicamente *Cyp1a1*. La regulación de la actividad transcripcional de AhR en ausencia de xenobióticos es uno de los aspectos peor conocidos de la funcionalidad de este receptor. En la **Figura I2** se muestra un esquema del mecanismo de acción propuesto para la activación transcripcional de genes dependientes de AhR tras la unión del xenobiótico TCDD.

En ausencia de xenobióticos, la forma inactiva de AhR se encuentra predominantemente en el citosol asociada a un complejo de chaperones moleculares que al menos incluye dos moléculas de Hsp90, (Heat Shock Protein 90) (Perdew, 1988; Wilhelmsson et al., 1990), una molécula de la proteína p23 (Kazlauskas et al., 1999) y una de la inmunofilina XAP2 (Hepatitis B virus X-Associated Protein 2) (Meyer et al., 1998), también conocida como ARA9 (AhR-Associated protein 9) (Carver and Bradfield, 1997) o AIP (AhR-Interacting Protein) (Ma and Whitlock, 1997). Hsp90 mantiene a AhR en una conformación proclive a la unión de ligando y, al mismo tiempo, previene la dimerización prematura con ARNT. p23 ayuda a liberar a AhR de su unión con Hsp90 en presencia de ligando. XAP2 es necesaria para el mantenimiento citoplasmático y la estabilidad de AhR (Kazlauskas et al., 2001). La interacción entre AhR y Hsp90 requiere de dos dominios estructurales del receptor, la región bHLH y el dominio PAS-B (Antonsson et al., 1995), el cual media también la interacción con XAP2 (Carver and Bradfield, 1997). Adicionalmente, dicha interacción protege al receptor de su degradación por el proteosoma en ausencia de ligando exógeno (Davarinos and Pollenz, 1999; Roberts and Whitelaw, 1999). Cuando AhR es activado por la unión del xenobiótico, este receptor de transloca y se acumula en el núcleo, con lo que se favorece la formación de heterodímeros activos AhR/ARNT en una relación molecular 1:1; al mismo tiempo, se liberan del receptor Hsp90 y las demás proteínas chaperonas asociadas (Kazlauskas et al., 1999; Kazlauskas et al., 2001; Lees and Whitelaw, 1999). Una vez translocado al núcleo, el complejo heterodimérico AhR/ARNT se une al DNA en secuencias consenso denominadas XREs o DREs (Xenobiotic/Dioxin Response Elements) situadas en regiones promotoras de genes

diana, lo que incrementa la tasa de transcripción de los mismos (Rowlands and Gustafsson, 1997). La secuencia consenso establecida para XRE es 5['] -GCGTG- 3['] (Rowlands and Gustaffson, 1997).



Figura I2. Modelo de transactivación de AhR mediada por xenobióticos.

De manera clásica, se ha pensado que la funcionalidad de AhR está ligada a su localización nuclear como factor de transcripción, habiéndose propuesto que el receptor citosólico es inactivo hasta tanto no se produzca su unión al ligando exógeno. Sin embargo, en ausencia de ligando, si bien la mayor parte de AhR se localiza en el citoplasma celular, una fracción apreciable de receptor es activamente transportada desde el citosol hasta el núcleo en un flujo constante (Ikuta et al., 2000; Richter et al., 2001). Así, parece existir un transporte mantenido de AhR del citoplasma al núcleo que es independiente de la presencia de xenobiótico. El ligando exógeno afectaría este incrementando significativamente la fracción de receptor proceso nuclear. Concretamente, en células HeLa se ha observado que el 15-20% del total de AhR se encuentra localizado en el núcleo en ausencia de xenobióticos, y que este AhR nuclear dimeriza con ARNT y es transcripcionalmente activo (Singh et al., 1996). Por otra parte, más recientemente, se ha puesto de manifiesto que en células de fenotipo epitelial HaCaT la localización celular de AhR depende de la densidad del cultivo, siendo mayoritariamente nuclear a baja densidad y citoplasmática a confluencia (Ikuta et al.,

2004). Otros mecanismos de activación han sido descritos, y así: (i) la expresión del coactivador RIP140 aumenta la actividad de promotores regulados por AhR, tanto en presencia como en ausencia de ligando (Kumar et al., 1999); (ii) en cultivos de queratinocitos creciendo en monocapa AhR es activado transcripcionalmente al inducir la suspensión de estas células (Sadek and Allen-Hoffmann, 1994); (iii) el estado de fosforilación de AhR influye en su distribución celular, siendo potenciales candidatos de fosforilación por proteína quinasa C (PKC) los residuos Ser¹² y Ser³⁶ (Singh *et al.*, 1996) y (iv) la unión de XAP2 a AhR previene su translocación al núcleo (Pollenz et al., 2006) por reclutamiento de la fosfodiesterasa 2A (PDE2A) y por reducción de los niveles locales de cAMP (de Oliveira et al., 2007), los cuales no sólo alteran el nivel de expresión de genes diana sino que también incrementan notablemente la localización nuclear del receptor (Oesch-Bartlomowicz et al., 2005; Oesch-Bartlomowicz and Oesch, 2005). En la mayoría de estos mecanismos de activación no mediados por ligando, una vez que AhR tiene localización nuclear es transcripcionalmente activo en la mayoría de los tipos celulares ensayados. Otros estudios han sugerido una función reguladora negativa para AhR, de tal modo que su unión a las secuencias XRE podría impedir estéricamente el acceso de otros factores de transcripción al promotor (Gillesby et al., 1997; Porter et al., 2001; Wang et al., 2001).

Estudios de nuestro y de otros laboratorios han mostrado que la actividad transcripcional de AhR puede estar regulada por la inhibición del proteosoma tanto en fibroblastos embrionarios (MEF) como en células de hepatoma de ratón Hepa-1 (Santiago-Josefat *et al.*, 2001; Song and Pollenz, 2002). Nuestro grupo ha sugerido además que el mecanismo implica la activación del regulador transcripcional Sp1 a través de su fosforilación por PKC (Santiago-Josefat and Fernandez-Salguero, 2003). En los últimos años, se ha identificado y caracterizado un gen que se regula positivamente por AhR y que codifica una proteína denominada represor de AhR (AhRR, *AhR Repressor*) (Mimura *et al.*, 1999). Esta proteína, con estructura del tipo bHLH, inhibe la actividad transcripcional de AhR compitiendo con éste por la formación de heterodímeros con ARNT, de tal manera que los complejos AhRR/ARNT son transcripcionalmente inactivos. La activación de AhR por unión de ligando exógeno aumenta la expresión de AhRR, y en ratones $AhR^{+/+}$ la expresión de dicho represor es dos veces mayor que en ratones $AhR^{-/-}$ (Bernshausen *et al.*, 2006). Por tanto, la

regulación de AhRR por AhR constituye un bucle de retroalimentación negativa mediante el cual se controlaría la actividad de AhR en ausencia de ligando exógeno.

En relación con ARNT, estudios inmunohistoquímicos han mostrado que esta proteína reside mayoritariamente en el núcleo y que la exposición de las células a TCDD no modifica su distribución celular ni su nivel de expresión (Pollenz, 1996). Además, al contrario de lo que se pensó inicialmente y por lo que se le dio nombre, ARNT no interviene en el proceso de translocación nuclear de AhR (Pollenz *et al.*, 1994).

4. Papel de AhR en la fisiología celular.

La aparición de AhR en la escala evolutiva mucho antes de la presencia de compuestos policíclicos aromáticos en la atmósfera resulta interesante. Su expresión constitutiva en la mayoría de los tipos celulares, así como su grado de conservación de secuencia entre diversos grupos de vertebrados (Hahn et al., 1997), tanto acuáticos como terrestres, apoyan aún más un papel relevante para AhR en la fisiología celular. A pesar de ello, AhR es considerado un receptor "huérfano" ya que no se conocen con suficiente detalle ni su ligando endógeno ni su función fisiológica. Adicionalmente a la activación mediada por inhibición del proteosoma (Santiago-Josefat and Fernandez-Salguero, 2003; Santiago-Josefat et al., 2001), otras evidencias experimentales también parecen sugerir que AhR podría activarse en ausencia de ligando exógeno (Chang and Puga, 1998; Ma and Whitlock, 1996; Weiss et al., 1996), tal vez por un mecanismo que podría requerir su interacción con un ligando(-s) endógeno(-s) aún no identificado(-s). En este sentido, diversos laboratorios han puesto de manifiesto que metabolitos del triptófano y otros compuestos con grupos indol (Chen et al., 1995; Wei et al., 1998), metabolitos del ácido araquidónico como la lipoxina A4 (Ciolino et al., 1998; Schaldach et al., 1999), la bilirrubina (Sinal and Bend, 1997), el 7-ceto-colesterol (Savouret et al., 2001), algunos flavonoides (Cunningham et al., 1996) y ciertas moléculas presentes en la orina (Adachi et al., 2001) interaccionan con AhR induciendo la transcripción del gen diana Cyp1A1. Sin embargo, sus bajos niveles, la poca potencia inductora y la distribución restringida de estos compuestos los hacen candidatos poco probables a ser reguladores endógenos de AhR en la mayoría de los tejidos. Dentro de este contexto, se ha propuesto que AhR pudiera haber evolucionado como parte de un sistema inducible que estuviera encargado de metabolizar sustancias lipofílicas presentes en la dieta y que la dioxina podría estar mimetizando la unión de esas moléculas al receptor. La dioxina induce cambios en proliferación y diferenciación de una gran variedad de tipos celulares (Blankenship *et al.*, 1993; Knutson and Poland, 1980) por lo que, alternativamente, otras posibilidades son que esta molécula mimetice la acción de un ligando endógeno involucrado en la regulación de estos procesos celulares, o que "secuestre" al AhR, impidiendo su participación en funciones fisiológicas.

El papel endógeno de AhR se encuentra apoyado por numerosas observaciones experimentales, entre las que cabe destacar: (i) su implicación en el desarrollo del hígado y del sistema vascular (Gonzalez and Fernandez-Salguero, 1998; Lahvis et al., 2000; Schmidt et al., 1996; Zaher et al., 1998); (ii) las diversas alteraciones patológicas que sufren los ratones knock-out para este receptor (Abbott et al., 1999b; Benedict et al., 2000; Fernandez-Salguero et al., 1995; Fernandez-Salguero et al., 1997; Lund et al., 2003; Thackaberry et al., 2002); (iii) la existencia de secuencias consenso XRE altamente conservadas y localizadas en regiones promotoras de genes que regulan procesos celulares (Klinge et al., 1999; Safe et al., 1998), (iv) las alteraciones en la señalización mediada por TGFB y ácido retinoico observadas in vitro en cultivos de fibroblastos embrionarios y hepatocitos primarios e in vivo en hígado (Andreola et al., 2004; Andreola et al., 1997; Corchero et al., 2004; Elizondo et al., 2000a; Gomez-Duran et al., 2006; Santiago-Josefat et al., 2004b) y (iv) la interacción directa o indirecta de AhR con el control del ciclo celular y con otras rutas moleculares de señalización (Elferink et al., 2001; Nebert et al., 2000; Phelan et al., 1998; Puga et al., 2002; Weiss et al., 1996). Este conjunto de observaciones sugieren que AhR juega un papel relevante en procesos fisiológicos y organogénicos.

La interacción de AhR con rutas que regulan proliferación celular es un punto controvertido ya que este receptor induce o reprime proliferación celular dependiendo del fenotipo de la célula diana. Varios estudios apoyan la función de AhR como una proteína oncogénica: (i) células de hepatoma deficientes en la expresión de AhR (AhR-D) tienen un tiempo de replicación alargado por el bloqueo de la transición G₁/S (Ma and Whitlock, 1996); (ii) los fibroblastos embrionarios $AhR^{-/-}$ tienen un mayor tiempo de duplicación (Elizondo *et al.*, 2000a), entran antes en fase de senescencia (Alexander *et al.*, 1998) y tienen niveles más elevados de TGF β (Alexander *et al.*, 1998; Gomez-Duran *et al.*, 2006; Santiago-Josefat *et al.*, 2004b) que las células control $AhR^{+/+}$; (iii) AhR es relevante para la síntesis de DNA mediada por la proteína p300 y por el

adenovirus E1A (Tohkin et al., 2000); (iv) AhR se encuentra sobre-activado en células T de leucemia adulta humana (Hayashibara et al., 2003) y (v) la activación constitutiva de este receptor incrementa la frecuencia de hepatocarcinogénesis en ratones transgénicos B6C3F1 (Moennikes et al., 2004). AhR tiene también actividad supresora de desarrollo tumoral: (i) su activación induce arresto celular en la transición G₁/S en células 5L de hepatoma de rata (Ge and Elferink, 1998; Kolluri et al., 1999; Puga et al., 2002); (ii) en células de hepatoma de ratón Hepa-1 y en células tumorales de glándula mamaria humana MCF-7, la dioxina induce la liberación del co-activador transcripcional p300 del promotor de genes dependientes de E2F (Marlowe et al., 2004); (iii) una forma constitutivamente activa de AhR induce apoptosis en células Jurkat bloqueando el ciclo celular en G₁ (Ito et al., 2004); (iv) la activación de AhR por unión de ligando provoca la disminución de la capacidad proliferativa de células de páncreas (Koliopanos et al., 2002) y de próstata (Jana et al., 1999) y bloquea el ciclo celular induciendo la expresión de p27^{Kip1} (Kolluri *et al.*, 1999); y (y) la expresión de AhR se encuentra reprimida epigenéticamente por hipermetilación de su promotor en células de leucemia linfoblástica aguda (ALL) y de leucemia mieloide crónica (CML) (Mulero-Navarro et al., 2006). Más aún, la inhibición de la expresión de AhR por RNA interferente (RNAi) produce tanto un aumento de la proliferación de células de hepatoma humano HepG2 como una disminución del crecimiento de células tumorales de glándula mamaria humana MCF-7 (Abdelrahim et al., 2003). También en consonancia con estos resultados, estudios recientes han mostrado que AhR reprime de manera constitutiva la expresión del oncogén c-MYC en líneas celulares tumorales de glándula mamaria humana (Yang et al., 2005).

5. Control de la expresión génica.

De manera tradicional, está aceptada la premisa de que la regulación transcripcional de los genes se ejecuta mediante la unión de Factores de Transcripción (FT) a sus respectivos sitios de unión (suFTs), proceso que finalmente facilita o impide la transcripción por las RNA Polimerasas. Los FTs, por lo tanto, tienen un dominio con capacidad de unirse específicamente a una secuencia de DNA, en forma de monómeros o dímeros, y otro dominio con capacidad de activar o reprimir la transcripción (Latchman, 1997). La secuenciación de diferentes genomas de mamíferos (Lander *et al.*, 2001; Waterston *et al.*, 2002) ha mostrado que la maquinaria nuclear controla el patrón

transcripcional de una célula a través del reconocimiento de elementos reguladores localizados en *cis* (es decir, en la secuencia primaria de DNA), y siempre dentro del contexto de la estructura de la cromatina. Además, los elementos cis reguladores (y dentro de ellos, los suFTs) suelen estar agrupados en regiones pequeñas de DNA (menor de 200 pares de bases) (Jegga et al., 2002; Narlikar and Ovcharenko, 2009), de tal forma que la diferentes combinaciones de FTs unidos al elemento puedan producir diferentes respuestas transcripcionales dependiendo del contexto celular. Finalmente, estas regiones no sólo están conservadas entre diferentes especies (Pennacchio et al., 2006) sino que también se encuentran conservadas entre diferentes genes que tienen un patrón de expresión común (Jegga et al., 2002). Las regiones no codificantes, entre las que se encuentran algunas de estas regiones cis, representan el 98 % del genoma humano. La función que se le presupone a esta alta proporción es la de contener una fuente de elementos reguladores que controlan la expresión génica, tales como promotores, enhancers, potenciadores de la regulación transcripcional, insulators, boundaries y elementos de control postranscripcional. Entre este último tipo de modificaciones podemos encontrar la metilación de RNA, el procesamiento de mRNA y miRNAs, así como el splicing alternativo. Todos estos mecanismos de regulación, en conjunto, permiten que la región no codificante del genoma mantenga un balance adecuado de la expresión génica que permitiría a la célula una respuesta adaptativa a los estímulos ambientales y del desarrollo (Ule, 2013).

6. Elementos repetitivos: retrotransposones.

El genoma humano posee aproximadamente un 40% de elementos retrotransponibles (*retrotransposable elements*, RTEs), transposones de DNA y elementos de origen retroviral. Entre ellos, se incluyen los SINE (*Short Interspersed Nuclear Elements*), LINE (*Long Interspersed Nuclear Elements*) y LTR (*Long Terminal Repeat*) (Deininger and Batzer, 2002: Deininger *et al.*, 2003). A pesar de que estos elementos fueron descritos hace tiempo (Kondo-Iida *et al.*, 1999; Turner *et al.*, 2001; Vasicek *et al.*, 1997), su papel en desarrollo y fisiopatología se ha descubierto hace apenas una década (Gogvadze and Buzdin, 2009). Inicialmente, ya se barajaba la hipótesis de que estos elementos repetitivos, al estar situados en numerosas ocasiones cerca de secuencias codificantes y de promotores, podrían colaborar en el control de la expresión génica (Britten and Davidson, 1969). Con ello, las especies tendrían un

mecanismo de evolución acelerada que le permitiera responder a cambios bruscos gracias a la capacidad de multiplicación e inserción de los retrotransposones presentes en sus genomas (McClintock, 1984). Posteriores análisis bioinformáticos consiguieron afianzar esta idea, ya que se comprobó que un alto porcentaje de los suFTs en los genomas de mamíferos residen en elementos repetitivos, y que, adicionalmente, se agrupaban en pequeñas regiones, formando estructuras similares a los elementos *cis* que regulan genes que tienen un patrón de expresión común (Jordan *et al.*, 2003; Polak and Domany, 2006).

Los retrotransposones son responsables de cambios profundos en el genoma, tanto estructurales como de recombinación de DNA. Además, pueden actuar como potenciadores o silenciadores de la transcripción de genes en los que se encuentran integrados. Por tanto, los elementos retrotransponibles poseen una clara importancia evolutiva mediante su influencia en los procesos transcripcionales del genoma humano (Cowley and Oakey, 2013; Jacques et al., 2013). Los SINEs son un grupo de elementos conocidos por sus secuencias altamente interactivas, con un tamaño entre 100 y 500 pares de bases de longitud (Singer, 1982). Estos elementos retrotransponibles tienen su origen en el 7SL RNA (Signal Recognition Particle RNA) (Weiner, 1980; Ullu and Tschudi, 1984). Dentro de este grupo se incluyen los elementos Alu humanos, que reciben su denominación por la presencia de un sitio de corte para la enzima de restricción AluI (Rubin et al., 1980; Deninger et al., 1981), así como los elementos B1 y B2 del genoma de ratón, llamados así por su homología con regiones de doble cadena de los pre-mRNAs nucleares dsRNA-B (Kramerov et al., 1979). En el grupo de los SINE, únicamente un pequeño porcentaje mantiene un potencial transcripcional, ya que la mayoría de copias de estos elementos repetitivos han quedado inactivadas por mutaciones en sus regiones promotoras. Debido a ello, los transcritos derivados de los SINE apenas son detectables en tejidos desarrollados y adultos. En cambio, en células embrionarias, espermatogénicas y oocitos su nivel de transcripción es elevado. En esta represión transcripcional de los transposones juegan un papel muy importante las modificaciones en la cromatina y en las histonas, de tal forma que los cambios epigenéticos en el DNA regulen las funciones de los SINE (Adeniyi-Jones and Zasloff, 1985; Kaplan et al., 1985; Paulson and Schmid, 1986; Bachvarova, 1988; Ichiyanagi et al., 2011).

Dentro de los SINE, en el genoma humano los elementos *Alu* son los más abundantes, ya que estos elementos móviles cuentan con más de un millón de copias (Lander *et al.*, 2001). Además, el hecho de que el 7SL RNA sea su precursor indica que su aparición evolutiva en los supraprimates tuvo lugar de forma temprana (Kriegs *et al.*, 2007). La familia de los Alu humanos está compuesta por varias subfamilias de distinta edad genética caracterizadas por poseer mutaciones jerárquicas (Deininger and Batzer, 1993).

7. Modificación de la arquitectura de la cromatina.

En los últimos cinco años, han cobrado importancia los estudios sobre la posición que ocupan en el genoma los elementos reguladores de los genes (promotores, elementos represores, potenciadores, aisladores,...). Por tanto, la cromatina no se posiciona de forma aleatoria dentro del núcleo, sino que cada cromosoma posee su sitio establecido. Los cromosomas que son ricos en genes tienden a agruparse en el centro del núcleo, debido a que en esta zona las posibilidades de expresión son mayores que en la periferia. Aun así, esto no quiere decir que en esta última zona haya una ausencia total de transcripción (Finlan et al., 2008). Los cromosomas tienen la capacidad de organizarse en dominios topológicos, con un tamaño de mega bases, llamados TADs. Las interacciones *long-range* entre elementos reguladores y promotores en estos dominios es elevada (Dixon et al., 2012).

Por tanto, la relación entre la posición nuclear y la expresión génica está ampliamente aceptada (Gibkus & Dekker, 2013). En estas interacciones de largo alcance, participa activamente la proteína CTCF. Originalmente fue descrito como un represor de la proteína c-myc en pollo (Filipova et al., 1996), pero posteriormente se comprobó que poseía una actividad de *enhancer-blocking* en su locus (Recillas-Targa et al., 2002). CTCF es considerado el *insulator* por excelencia, y su función más investigada es la de atraer loci que estén distantes en el espacio, incluso en cromosomas diferentes (Phillips-Cremins & Corces, 2013). En ratones, se ha descrito también como elemento *insulator* al B1x35s, de la familia de los SINE-B1 (Román et al., 2011), cuyo equivalente en el genoma humano serían los elementos Alu. Concretamente, este

B1x35s posee un sitio de unión XRE para la proteína AhR separado 35 pares de bases del elemento de unión de las proteínas Slug y Snail (Román et al., 2008).

Además, actualmente se conocen regiones de DNA de alta accesibilidad entre nucleosomas que son usadas como plataformas de aterrizaje de otras proteínas encargadas de prevenir el esparcimiento de la cromatina, entre las cuales está CTCF, lo cual podría estar estableciendo indirectamente barreras *genome-wide* (Fu et al., 2008).

Por todo ello, cabe destacar el reciente interés en estudiar la posible relación entre la accesibilidad de la cromatina y la regulación de la expresión génica por parte de elementos potenciadores (*enhancers*) y aisladores (*insulators*).

8. Diferenciación celular y pluripotencia.

La capacidad que poseen las células iniciales embrionarias de diferenciarse hacia cualquier tipo de linaje celular se denomina totipotencia. Tras la fecundación, el zigoto dará lugar a una mórula la cual, tras diferenciarse, formará un blastocisto, el cual se compone de masa celular interna (ICM, *Inner Cell Mass*) y trofoectodermo. Ya en este estadio temprano del desarrollo, las células del trofoectodermo son incapaces de recuperar el potencial de diferenciación que poseían inicialmente. Por su lado, la ICM sí mantiene parte de la capacidad para desarrollar distintos tipos celulares, aunque no todos, por lo que se considera que a partir de esta fase las células son pluripotentes. A partir de la gastrulación, únicamente las células germinales mantendrán la capacidad de producir una célula totipotente tras la fecundación (Jared *et al.*, 2012).

En el proceso de diferenciación, una célula madre sufre una reprogramación genética, en la cual se reprimen ciertos patrones de expresión que darán lugar a una célula completamente diferenciada. Debido al establecimiento en los laboratorios de cultivos de células madre embrionarias, han sido identificados los genes responsables del mantenimiento de la pluripotencia, la mayoría de los cuales codifican para factores de transcripción. Cuando varios de ellos se combinan (NANOG, OCT4, SOX2, KLF4 y c-MYC) son capaces de convertir fibroblastos embrionarios y adultos en células madre

pluripotentes (iPS, *induced Pluripotent Stem cells*) (Takahashi and Yamanaka, 2006; Radzisheuskaya and Silva, 2014).

El mantenimiento de la pluripotencia en las células madre embrionarias (*Embrionary Stem Cells, ESCs*) lo lleva a cabo la red transcripcional formada por NANOG, OCT4 y SOX2 (Jaenisch and Young, 2008; Young, 2011). Mientras que OCT4 y SOX2 pueden co-regularse a sí mismos, a su vez modifican la expresión de NANOG, FGF4 y UTF1 (Nishimoto *et al.*, 1999; Ambrosetti *et al.*, 2000; Catena *et al.*, 2004; Chew *et al.*, 2005; Koruda *et al.*, 2005; Okumura-Nakanishi *et al.*, 2005; Rodda *et al.*, 2005). Todos estos genes componen una red transcripcional que incluye bucles de retroalimentación positiva que la mantienen estable, proporcionándole una rápida velocidad de respuesta ante la persistencia de una señal activadora (Shen-Orr *et al.*, 2002). Incluso se han llegado a caracterizar redes reguladoras entre estos factores de transcripción y microRNAs (miRNAs), tales como el miR-145, el cual opera en un bucle de retroalimentación negativa junto con OCT4, SOX2 y KLF4 reprimiendo la translación de sus propios mRNAs (Xu *et al.*, 2009).

9. NANOG.

NANOG es uno de los factores de transcripción más importantes implicado en pluripotencia y mantenimiento del estado indiferenciado de las ESCs (Mitsui *et al.*, 2003; Chambers *et al.*, 2003; Hyslop *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006; Kashyap *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2008; Pan and Thomson, 2007). La proteína NANOG, en humanos, estructuralmente posee un extremo amino, un dominio *homeobox* y un extremo carboxilo (Mitsui *et al.*, 2003; Oh *et al.*, 2005). Este último es rico en serina, prolina y treonina, siendo el responsable de la actividad transcripcional de NANOG. El dominio central *homeobox* contiene un motivo de unión al DNA, mientras que el extremo carboxilo posee dos subdominios de transactivación (Oh *et al.*, 2009; Do *et al.*, 2007). Adicionalmente, en las regiones amino y carboxilo están presentes secuencias de localización nuclear, junto con un potente sitio de exportación nuclear que permite el transporte de la proteína dentro y fuera del núcleo (Do et al., 2007; Park et al, 2012). Por su parte, el mRNA de NANOG está presente en las células madre pluripotentes del genoma humano y de ratón, siendo ausente en células diferenciadas. Esta expresión de NANOG es necesaria para el mantenimiento de la identidad de las ESCs (Chambers et

al., 2003). Actualmente se conoce que heterodímeros de OCT4/SOX2 son capaces de regular transcripcionalmente a NANOG mediante su unión a la región proximal del promotor (Kuroda et al., 2005; Do et al., 2009). A pesar de ello, a NANOG no se le considera en un escalón inferior que a OCT4 y SOX2, ya que posee una serie de propiedades únicas y diferenciadoras del resto, tales como su capacidad de sobreexpresarse para mantener la pluripotencia de las ESCs de manera independiente a la ruta STAT3-LIF (*Leukemia Inhibitor Factor*), la cual es imprescindible para que otros factores mantengan el estado de indiferenciación celular (Mitsui et al., 2003; Niwa et al., 2000).

Con respecto al desarrollo y a la progresión tumoral, NANOG participa en procesos de proliferación, movilidad, apoptosis y comunicación entre las células tumorales y el tejido sano que las rodea. En algunos casos, la sola expresión ectópica de NANOG es suficiente para inducir una transformación maligna (Piestun et al., 2006; Lin et al., 2011). Una expresión anómala de NANOG en células tumorales se traduce en un incremento de proliferación celular *in vitro* y en una mayor tumorigénesis primaria in vivo. Además, la sobreexpresión conjunta de NANOG y OCT4 aumenta el crecimiento clonogénico y la formación de cuerpos esféricos en células de adenocarcinoma pulmonar (Chiou et al., 2010). En cambio, si se suprime la expresión de ambos en células de pulmón, o únicamente NANOG en células de cáncer de mama, el crecimiento clonogénico y la proliferación desaparecen (Chiou et al., 2010; Han et al., 2012). Por su parte, se ha encontrado un nivel de expresión importante de NANOG en multitud de tumores de diferentes tejidos, que incluyen cáncer de mama, boca, riñón, cuello uterino, próstata, cerebro, pulmón, estómago y ovario (Bussolati et al., 2008; Chiou et al., 2010; Amsterdam et al., 2013; Ezeh et al., 2005; Hart et al., 2005; Hoei-Hansen et al., 2005; Lin et al., 2012; Guo et al., 2011; Pan et al., 2010; Wen et al., 2010; Chiou et al., 2008; Gillis et al., 2011; Zhou et al., 2011). En cáncer de mama, cáncer colorectal y cáncer de ovario, NANOG puede utilizarse como indicador diagnóstico de mal pronóstico si está sobreexpresado (Nagata et al., 2012; Lee et al., 2012; Meng et al., 2010), mientras que si se combina además con una alta expresión de OCT4 en adenocarcinoma pulmonar está asociado a estados avanzados de la enfermedad, con un corto índice de supervivencia (Chiou et al., 2010; Chiou et al., 2008).

Adicionalmente, se ha comprobado *in vitro* que, en procesos de diferenciación celular, la represión de NANOG y OCT4 está mediada por AhR. Este proceso ocurre a

través de la expresión de un elemento Alu de NANOG (NANOGx45sAlu) mediada por la interacción de sus transcritos con regiones homólogas presentes en los mRNAs de NANOG y OCT4 (Morales-Hernández et al., 2016).

10. OCT4.

El gen que codifica para OCT4 es POU5F1, miembro de la familia de factores de transcripción POU, llamados así por su capacidad de unión al DNA a través de secuencias nucleotídicas octaméricas (dominios POU) (Tantin, 2013., Zhao, 2013). OCT4, al ser uno de los principales factores de transcripción implicados en reprogramación celular, ha recibido bastante atención con respecto a la inducción del estado de pluripotencia de la célula. Gracias a ello, se ha descubierto que OCT4 reconoce y se une a regiones reguladoras sólo o en cooperación con otros factores de transcripción (Ambrosetti et al., 1997; Botquin et al., 1998; Boyer et al., 2008; Chen et al., 2008; Kim et al., 2008; Loh et al., 2006; Nishimoto et al., 1999; Ouyang et al., 2009). Además, OCT4 juega un papel relevante en el proceso de diferenciación celular inducida por ácido retinoico (RA), ya que su promotor incluye elementos de respuesta activados por receptores inducidos por el mismo, así como un sitio de unión para la proteína de especificidad 1 (SP1) (Minucci et al., 1996; Sylvester and Schöler, 1994). Durante este proceso, el gen POU5F1 es silenciado debido a una unión conjunta del factor de célula germinal (GCNF) y otros factores huérfanos de la familia esteroidetiroidea a su promotor proximal (Sylvester and Schöler, 1994; Ben-Shushan et al., 1995; Pikarsky et al., 1994; Schoorlemmer et al., 1994).

Los niveles de expresión de OCT4 marcan su actividad biológica: una reducción en ESCs humanas conduce a la inducción de marcadores de endodermo y mesodermo, mientras que un aumento tiene efecto únicamente en los de endodermo (Rodríguez et al., 2007). OCT4 tiene la capacidad de unirse al DNA en forma de monómero, de homodímero o bien como heterodímero con SOX2. En cualquiera de estas configuraciones, las interacciones de DNA-proteína son idénticas, mientras que las interacciones proteína-proteína dependen de la composición específica de cada sitio de unión (Ambrosetti et al., 1997; Botquin et al., 1998; Boyer et al., 2008; Chen et al., 2008; Kim et al., 2008; Loh et al., 2006; Nishimoto et al., 1999). Por un lado, OCT4 reconoce y se une a regiones reguladoras del DNA en diferentes estados de la cromatina, y, por otro, tiene la capacidad de reclutar a otros factores para establecer mecanismos de regulación de la expresión génica, llegando a interactuar con más de 50 factores de transcripción en ESCs (van der Berg et al., 2010). Este complejo mecanismo de regulación transcripcional orquestado por OCT4 sugiere que, dependiendo del nivel de expresión de OCT4, éste formará parte de nuevos complejos que modularían nuevos grupos de genes (Sieweke and Graf, 1988). Además, tiene la capacidad de unirse al DNA en estado de cromatina condensada, actuando en ese caso como un factor de transcripción temprano en el inicio del proceso de diferenciación (Soufi et al., 2012).

Por otra parte, a OCT4 se le pueden atribuir funciones sobre el mantenimiento de la viabilidad de la línea germinal en mamíferos, debido a que actúa como un factor de supervivencia de células madre (Nichols et al., 1998; Gidekel et al., 2003). Además, cuando las células germinales primordiales (Primordial Germ Cells, PGCs) dejan de expresar OCT4, en lugar de diferenciarse inician un proceso apoptótico (Kehler et al., 2004). Por su parte, en las células somáticas, la mayoría de los fallos que se producen durante la clonación se deben a variaciones en los niveles de expresión de OCT4 (Donovan et al., 2001; Boiani et al., 2002). Estos últimos datos concluyen en la idea de que OCT4 contribuye con una función diferencial en ESCs con respecto a PGCs, por lo que es necesario comprender su mecanismo de actuación en la patogénesis de tumores de células germinales (Germ Cells Tumors, GCTs), de tal manera que una expresión aberrante de OCT4 puede contribuir a la tumorigénesis de las GCTs (Gidekel et al., 2003). De hecho, en ratón se ha podido corroborar cómo altos niveles de expresión de OCT4 aumentan la malignidad en tumores derivados de ESCs, mientras que si se inhibe, la malignidad desciende. Por todas estas razones, OCT4 ha sido propuesto como un marcador interesante para el diagnóstico de GCTs, entre los que podemos incluir carcinoma embrioide, germinoma, disgerminoma y seminoma. Estas neoplasias, así como su capacidad oncogénica, han podido ser evaluadas debido a la utilidad de estas investigaciones entre la relación de OCT4 con las GCTs (Cheng et al., 2007). Concretamente, en células de carcinoma embrioide se ha visto que un retrotransposón Alu de OCT4 (OCT4x36sAlu) posee actividad promotora en dichas células gracias a que en su secuencia posee los componentes necesarios para interaccionar con AhR y ser posteriormente transcrito por la RNA Polimerasa III. Se ha demostrado además que

estos transcritos aumentan considerablemente sus niveles durante la diferenciación celular mediada por AhR (Morales-Hernández et al., 2016).

11. Gametogénesis.

Se ha descrito que variaciones en el nivel de expresión o activación de AhR pueden alterar la función del sistema reproductor, tanto femenino como masculino (Bell 2012; Karman 2012). De esta manera, la activación de AhR por el carcinógeno TCDD parece afectar a la calidad espermática del sistema reproductor masculino de rata (Mably et al. 1992;Wilker et al. 1996; Faqi et al. 1998). Además, se ha comprobado que, en ratones machos, la administración gestacional de TCDD disminuye el tamaño de los testículos y de los epidídimos en ratones *wild type* (*AhR*+/+), pero no en ratones *knock-out* (*AhR-/-*) (Lin et al. 2001), lo cual apoyaría la función del receptor en su capacidad de respuesta ante un estímulo carcinogénico. A su vez, en el desarrollo de los ovarios en neonatos, el ligando de AhR DMBA (dimethilbenz[*a*]antraceno) acelera los procesos apoptóticos en los folículos primordiales de ratonas *AhR*+/+, no siendo así en *AhR-/-* (Matikainen et al. 2001; Matikainen et al. 2002).

En condiciones fisiológicas, AhR posee funciones pleiotrópicas en los sistemas reproductores femeninos y masculinos. Así, en machos, se requiere la participación de AhR en el eje hipotálamo-pituitaria-testículos para un correcto desarrollo testicular (Karman 2012). El nivel de expresión de AhR en el hipotálamo de rata es superior en machos con respecto a las hembras, lo cual podría influir en la diferenciación sexual de género (Petersen et al. 2000; Pravettoni et al. 2005). Además, la inactivación genética de AhR en ratones de avanzada edad provoca una reducción de los niveles de testosterona y una regresión de la vesícula seminal (Baba et al. 2008). En cambio, en ratones envejecidos AhR-/-, no se producen cambios significativos a este respecto en el número de espermatozoides (Baba et al. 2008) o en la producción espermática diaria (Lin et al. 2001). En ovario, la falta de AhR reduce tanto el número total de folículos (Benedict et al. 2000) como su tasa de crecimiento (Barnett et al. 2007), por lo que en ratonas AhR-/- la baja capacidad de ovulación afecta negativamente a la fertilidad y podría estar asociada a la senescencia del aparato reproductor (Hernandez-Ochoa et al. 2009; Karman 2012). Por tanto, existe una clara relación entre AhR y el correcto desarrollo y posterior funcionamiento de ovarios y testículos.

Se sabe además que, durante los procesos de oogénesis y espermatogénesis, el silenciamiento de elementos transponibles es particularmente importante para una correcta maduración de las células germinales (Khurana and Theurkauf 2010). Este procesamiento de transposones tiene lugar en una estructura celular única conocida como nuage (nube), la cual se compone por un lado de piRNAs (Piwi-interacting RNAs), los cuales protegen a las células germinales de los transcritos derivados de transposones (Brennecke et al. 2007; Khurana and Theurkauf 2010; Siomi et al. 2011) y, por otro lado, de proteínas asociadas, entre las que se encuentran Miwi, Mili y Miwi2 (Deng and Lin 2002; Kuramochi-Miyagawa et al. 2004; Carmell et al. 2007). Adicionalmente, formando parte del nuage también encontramos la DEAD-box RNA helicasa MVH (mouse vasa homolog) (Toyooka et al. 2000), la cual es específica de células germinales. De hecho, se ha descrito su expresión tanto en espermatocitos (Pillai and Chuma 2012) como en oocitos (Shoji et al. 2009). Por tanto, todos estos estudios sugieren que las proteínas del nuage contribuyen a la producción de piRNAs cuya función sería silenciar o destruir los transcritos derivados de los transposones durante el proceso de maduración de células germinales (Khurana and Theurkauf 2010).

Adicionalmente, estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado la participación de AhR en la regulación de la expresión de ciertas formas de *short interspersed nuclear elements* (SINE) de la familia de los retrotransposones B1 de ratón (Roman et al. 2008). De hecho, se ha descrito cómo la transcripción de un transposón B1-SINE dependiente de AhR reprime la expresión de genes objetivo que contienen tal elemento en sus promotores, revelando una interacción funcional entre AhR, la activación de elementos transponibles y el control de la expresión génica (Roman et al. 2011b).

Materiales y métodos

1. Cultivo de líneas celulares.

La línea celular mayoritariamente utilizada ha sido la línea NTERA-2 cl.D1 de carcinoma embrioide testicular humano, la cual tiene la capacidad de diferenciarse en presencia de ácido retinoico (RA), dando lugar a neuronas. Esta línea de carcinoma embrioide humano se cultivó en medio de cultivo D-MEM (*BioWhittaker, Lonza*) completo¹, a una temperatura de 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂. El medio de cultivo fue reemplazado cada 48-72 horas. Cuando las células alcanzaron un 90% de confluencia, el cultivo se tripsinizó y se sembró en nuevas placas a una dilución 1:4. Para la tripsinización, el medio de cultivo fue aspirado con una bomba de vacío y las células se lavaron con 2 ml de PBS. Tras aspirar el PBS, se añadió 1 ml de tripsina al 0,05% y se incubó durante 5 minutos a 37°C, produciéndose la digestión proteolítica. La acción de la tripsina se detuvo añadiendo 1 ml de medio de cultivo completo precalentado a 37°C. Las células fueron centrifugadas 5 minutos a 200g y se descartó el sobrenadante, resuspendiendo el nuevo precipitado celular en medio de cultivo nuevo. Las células fueron sembradas en placas individuales de 35, 60 ó 100 mm o en placas multipocillos de 6, 12 o 24 pocillos dependiendo de las características de los ensayos.

1.1.Tratamientos.

Todos los compuestos utilizados para tratar los cultivos celulares se disolvieron en dimetil-sulfóxido (DMSO) o en solución acuosa tamponada estéril. Los cultivos celulares control se trataron con un volumen equivalente del solvente. Los reactivos químicos empleados se prepararon siguiendo las instrucciones del fabricante. El isómero de TCDD 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina se adquirió de *AccuStandard*. El ácido retinoico (RA) se obtuvo de *Sigma*. El 3-Deazaneplanocin A, el 5-Azacytidine y la Chaetocin se obtuvieron de *Calbiochem (Millipore)*. El 6-Formylindolo(3,2b)carbazole (FICZ) se obtuvo de *Enzo*.

¹ **Medio DMEM completo:** medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (v/v), penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 μ g/ml y 2mM de L-Glutamina (*BioWhittaker, Lonza*).

1.2.Vectores.

Las transfecciones transientes se realizaron empleando Lipofectamine 3000/2000 (ThermoFischer) y mediante electroporación con MicroPorator MP-100 (Digital Bio), siguiendo las indicaciones del fabricante; las condiciones de transfección se optimizaron previamente para cada vector transfectado. A continuación se detallan los principales vectores y las construcciones genéticas utilizadas en este estudio.

- LMP-shAhR: secuencia correspondiente a un *short hairpin* (sh) diseñado frente a la parte codificante del mRNA de AhR, clonada en el vector retroviral LMP.
- siRNA anti
- BAC NANOG.
- BAC ENr313.
- 3xFLAGdCas9/pCMV7.1: enzima Cas9 catalíticamente inactiva unida a la proteína de fusión 3xFLAG, clonadas en el vector pCMV7.1.

2. Análisis de niveles proteicos mediante immunoblotting (western-blotting)

2.1. Preparación de los extractos proteicos.

Los extractos proteicos se obtuvieron a partir de cultivos celulares en placas de 35, 60 o 100 mm. Se retiró el medio de cultivo y la monocapa de células se lavó dos veces con PBS frío, despegando las células de forma mecánica con 1 ml de PBS y centrifugándose a 2000 x g durante 2 minutos. Posteriormente, el pellet de células se resuspendió en 200 μ l de tampón de lisis² durante 20 minutos a 4°C con agitación, para luego centrifugarlos 10 minutos a 13200 r.p.m. a 4°C. Se recuperaron los sobrenadantes con los extractos proteicos y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

2.2. Preparación de extractos proteicos nucleares.

² **Tampón de lisis para extractos proteicos totales:** Tris-HCl 50 mM pH 7.5, EDTA 2 mM, EGTA 2 mM, sacarosa 270 mM, β-glicerol-fosfato 10 mM, pirofosfato sódico 5 mM, fluoruro sódico 50 mM, Tritón X-100 1%, ortovanadato sódico 0.1 mM, β-mercaptoetanol 1%, inhibidor de proteasas COMPLETE 4 μ g/ μ l.

Las células se lavaron como se ha indicado en el apartado anterior. El pellet celular se lisó con tampón de lisis A^3 (150 µl por condición) durante 10 minutos a 4°C. Se centrifugó durante 15 segundos a 12.000 x g y se retiró el sobrenadante (fracción citosólica). Al precipitado se le añadió tampón de lisis B^4 (50 µl) y se incubó durante 20 minutos a 4°C. Tras una centrifugación a 14.000 x g durante 5 minutos, se recuperó el sobrenadante y se midió la cantidad de proteína presente en el extracto.

2.3. Medida de la concentración de proteína.

La concentración de proteína de los extractos celulares se determinó mediante el método colorimétrico de Bradford, utilizando el reactivo *Coomassie plus protein assay reagent (Pierce)* y albúmina de suero bovino (BSA) como estándar. Tras desarrollar la reacción colorimétrica, se midió la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 595 nm, y los valores obtenidos se interpolaron en una recta patrón construida con cantidades conocidas de BSA.

2.4. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y transferencia a membranas de nitrocelulosa.

Para la realización de electroforesis de proteínas en geles desnaturalizantes de poliacrilamida se ha utilizado el sistema de tampón discontinuo descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). Alícuotas conteniendo entre 10 y 30 μ g de los correspondientes extractos proteicos se mezclaron con el volumen adecuado de tampón de carga para proteínas⁵ y se desnaturalizaron por incubación a 95°C durante 5 minutos. Las proteínas se separaron en función de su peso molecular sometiéndolas a electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes por la presencia del detergente iónico SDS (SDS-PAGE⁶). Se emplearon geles de poliacrilamida a concentraciones finales del 7,5%, 10% ó 12%, dependiendo del peso molecular de la proteína en estudio.

Una vez realizada la electroforesis, las proteínas presentes en el gel fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (*Bio-Rad Laboratories*) mediante la aplicación de un campo eléctrico en una cubeta conteniendo una solución de

³ **Tampón de lisis A:** Hepes 10 mM pH 7.9, MgCl₂ 1.5 mM, KCl 10 mM, DTT 0.5 mM, PMSF 0.2 mM, inhibidor de proteasas COMPLETE 4 μ g/ μ l.

⁴ **Tampón de lisis B:** Hepes 20 mM pH 7.9, MgCl₂ 1.5 mM, NaCl 420 mM, EDTA 0.2 mM, DTT 0.5 mM, PMSF 0.2 mM, Glicerol 25%, inhibidor de proteasas COMPLETE 4 μ g/ μ l.

⁵ **5 x tampón de carga para proteínas:** Tris-HCl 62.2 mM pH 6.8, SDS 10% (p/v), glicerol 50% (v/v), azul de bromofenol 0.025% (p/v), β-ME 20% (v/v).

⁶ Tampón de electroforesis: Tris 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0.1% (p/v).

transferencia de composición iónica definida⁷. La transferencia se realizó a 4°C durante 16 horas a 77 mA, o bien durante 2 horas a 400 mA cuando se transfirieron proteínas de bajo peso molecular. Después de la transferencia, las membranas fueron teñidas con el colorante reversible Ponceau S^8 , el cual nos permite comprobar la eficacia del proceso así como la homogeneidad de carga para las diferentes muestras. Posteriormente, las membranas fueron bloqueadas durante 2 horas a temperatura ambiente en solución de bloqueo para Western blot⁹ e incubadas con el correspondiente anticuerpo primario empleando la dilución y las condiciones indicadas en el Anexo II: Tabla de Anticuerpos. Tras 4 lavados de 10 minutos cada uno en TBS-T¹⁰, las membranas se hibridaron durante 45 minutos a temperatura ambiente con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con la enzima peroxidasa de rábano (HRP). A continuación, las membranas fueron sometidas a 5 lavados adicionales de 10 minutos cada uno en TBS-T y a un lavado final de 5 minutos en TBS (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 75 mM). Finalmente, se añadió el sustrato quimioluminescente SuperSignal Chemiluminescent Substrate (Pierce) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las membranas se revelaron con películas KodaK BioMax light film (Sigma-Aldrich) y posteriormente escaneadas para su análisis por densiometría, o utilizando directamente el Molecular Imager ChemiDoc XRS+ (*Bio-Rad*) con el software Image Lab 5.1.

Anticuerpo	Dilución	Casa	Anticuerpo	Tiempo
primario		comercial	secundario	incubación
AhR	1:1000	Pierce	Conejo	2 h
β-IIITubulina	1:200	Santa Cruz	Ratón	2 h
α-Actina	1:1000	Sigma-Aldrich	Conejo	2 h
FLAG	1:1000	Millipore	Conejo	2 h
NANOG	1:600	Abcam	Ratón	2 h
OCT4	1:100	Santa Cruz	Ratón	Overnight

⁷ **Tampón de transferencia:** Tris 25 mM, glicina 190 mM, metanol 20% (v/v).

⁸ Ponceau S: Ponceau S 0.5% (p/v), ácido acético 5% (v/v).

⁹ Solución de bloqueo para Western blot: leche desnatada en polvo al 5% (p/v) disuelta en TBS-T.

¹⁰ **TBS-T:** Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 75 mM, Tween-20 0.2% (v/v).

				(o/n)
CAF1	1:1000	Novus Bio	Conejo	2 h
PRMT1	1:200	Santa Cruz	Conejo	Overnight (o/n)

Figura M.1.

3. Inmunoprecipitación de proteínas.

Se prepararon extractos celulares y se determinó su concentración de proteína. Alícuotas conteniendo 0.8-1 mg de proteína se inmunoprecipitaron con 1-3 µg de anticuerpo específico frente a la proteína de interés durante 16 horas a 4°C con rotación. Posteriormente, se añadieron a los inmunoprecipitados 25 µl de proteína A/G Plus agarosa (*SantaCruz*) y se incubó durante dos horas más. Los inmunoprecipitados se lavaron entonces cuatro veces con tampón de lavado A (Tris-HCl 20 mM pH 8, EGTA 1 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM NaCl 100 mM). Las proteínas inmunoprecipitadas, así como los extractos nucleares totales, fueron analizados mediante Western Blot empleando los anticuerpos y las condiciones indicadas en el **anexo II: Tabla de anticuerpos.**

4. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).

Con el fin de determinar la unión directa de una proteína a una región de DNA *in vivo*, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP). Para cada experimento se necesitaron (5-10) x 10^6 células. Con el fin de estabilizar las uniones de las proteínas al DNA se añadió formaldehído (*Sigma Aldrich*) directamente al medio de cultivo, a una concentración final del 1% durante 15 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. La reacción de entrecruzamiento proteína-DNA se detuvo añadiendo glicina 0.125M (*Panreac*) durante 5 minutos. A continuación, se retiró el medio de reacción y las células se lavaron dos veces con PBS frío, para posteriormente recogerse las suspensiones celulares en tubos conteniendo 400 µg/ml de inhibidores de proteasas (Complete, Roche). Las suspensiones celulares se centrifugaron a 500 x g durante 5 minutos a 4°C para eliminar el PBS y las células se resuspendieron en tampón de lisis-SDS²⁴ conteniendo inhibidores de proteasas (200 µl por condición), y se incubaron durante 10 minutos a 4°C. Los lisados celulares resultantes fueron sonicados durante 20-30 minutos en un equipo Bioruptor (Diagenode) a máxima potencia con ciclos de 0.5 minutos de sonicación/reposo. Los fragmentos de DNA obtenidos (de un tamaño comprendido entre 200 y 1000 pares de bases) se centrifugaron a 4 °C durante 10 minutos a 13000 x g. Se midió la concentración de DNA del sobrenadante (100-150 µg de cromatina por IP) y éste se diluyó diez veces en tampón de dilución de ChIP²⁵ conteniendo inhibidores de proteasas. Para reducir las uniones inespecíficas, las muestras se incubaron durante 45 minutos a 4ºC con agitación suave en presencia de proteína A/G Plus agarosa. Tras centrifugar durante 5 minutos a 200 x g, se añadió a los sobrenadantes el anticuerpo específico $(2-3 \mu g)$ y se incubaron durante toda la noche a 4°C con rotación suave. Como control negativo se realizaron incubaciones en ausencia de anticuerpo primario, y como control positivo se utilizaron partes alícuotas de los extractos previas a su incubación con el anticuerpo primario (DNA total o input). Tras añadir una nueva alícuota de A/G Plus agarosa, se realizó una incubación adicional de 1 hora a 4°C con agitación. Las muestras fueron centrifugadas a 2000 x g durante 1 minuto a 4°C. Posteriormente, los precipitados conteniendo los complejos anticuerpoproteína-DNA se lavaron durante 5 minutos con los siguientes tampones: tampón de lavado de baja fuerza iónica (SDS 0.1%, Triton X-100 1%, EDTA 2 mM, Tris-HCl 120 mM pH 8, NaCl 150 mM), tampón de lavado de alta fuerza iónica (SDS 0.1%, Triton X-100 1%, EDTA 2 mM, Tris-HCl 120 mM pH 8, NaCl 500 mM), tampón de lavado conteniendo LiCl (LiCl 0.25 M, NP40 1%, deoxicolato 1%, EDTA 1 mM, Tris-HCl pH 10 mM 8.1) y dos lavados con tampón TE (Tris-HCl 10 mM pH8.0, EDTA 1 mM). Tras estos lavados, los complejos se extrajeron con tampón de elución (SDS 1%, NaHCO3 0.1 M, 200 µl por condición) durante 15 min con agitación y fueron posteriormente centrifugados a 2.000 x g durante 1 min. El proceso se repitió una vez más y todos los eluados se combinaron en un mismo tubo. A continuación se incubaron durante 4 h a 65°C en NaCl 200 mM para romper los entrecruzamientos DNA-proteína y liberar el DNA, incorporándose también en este paso los DNA inputs. Para eliminar las proteínas, las muestras se incubaron durante 1 h a 45°C en una solución conteniendo EDTA 10 mM, Tris HCl 40 mM pH 6.5 y 40 µg/ml de Proteinase K (Roche). Finalmente, el DNA fue purificado usando columnas ChIP DNA Clean & Concentrator (Zymo Research) diseñado para la purificación de muestras conteniendo SDS. La cuantificación de la unión se hizo mediante PCR en tiempo real (*StepOne, Applied Biosystems*) usando cebadores específicos para cada región analizada (figura **M.1**.). Los datos se muestran como: porcentaje respecto al input de DNA de la inmunoprecipitación *menos* porcentaje respecto al input de DNA del control sin anticuerpo.

Cones	Secuend	Ta		
Genes .	Hebra líder (Fw)	Hebra retrasada (Rv)	ľ	
OCT4 x36s	5'-GCTGACTTCATCCCTATTCT-3'	5'-GCTCCAGGAGATAGCAGTTG-3'	59 °C	
OCT4 x14s	5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'	5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3'	59 °C	
NANOG x45s	5'-CAAAAGGAAAGAGCATGCAGAA-3'	5'-ATGATCTAGACCTCCAGAGTTGTAGC-3'	59 °C	
NANOG x14s	5'- GGCCCTGGGTCCATCTTCC-3'	5'- ACCCGGGAGCCATCTTTACC-3'	59 °C	
NANOG 1	5'- GCTTATCAGACTGATGTTGACTG-3'	5'- CAGCCCATCGACTGGTG-3'	59 °C	
NANOG 2	5'- AGCTGAGGCGCTGCTTCT-3'	5'- CCTCGGGCACTTACAGACA-3'	59 °C	
NANOG 3	5'- GTGGCACTCAAACTGTGG-3'	5'- GTAACACTCAAAAGATGGCGG-3'	59 °C	
NANOG 4	5'- GGGGATACAGCAGCAATTC-3'	5'- CCACCTTCTACCTTCCCC-3'	59 °C	
NANOG 5	5'- GGGATGAGGTAGTAGGTTG-3'	5'- GGAAAGACAGTAGATTGTATAG-3'	59 °C	
NANOG 6	5'-CAAAAGGAAAGAGCATGCAGAA-3'	5'-ATGATCTAGACCTCCAGAGTTGTAGC-3'	59 °C	
enChIP 1	5'-GATTTGTGGGGCCTGAAGAAA-3'	5'-AAGTGGGTTGTTTGCCTTTG-3'	59 °C	
enChIP 2	5'-CGCCTGTAATCCCAACACTT-3'	5'-CGCCTGTAATCCCAACACTT-3'	58 °C	
CAF 1	5'-CCTGTAATCCCAGCTACTC-3'	5'-GCAATCTTGGCTCACTGC-3'	58 °C	
PRMT 1	5'-TGCCAGACCAACATCAAC-3'	5'-CTCATAGTCCTCGGATTGC-3'	59 °C	

Figura M.2.

Anticuerpo	Dilución	Casa	Anticuerpo	Tiempo
primario	Diración	comercial	secundario	incubación
AhR	1:1000	Pierce	Conejo	2 h
RPC32	1:200	Santa Cruz	Ratón	2 h
CTCF	1:200	BD	Ratón	Overnight (o/n)
RNA Pol II	1.200	Invitrogen	Rata	Overnight (o/n)
PARP 1	1:1000	Millipore	Conejo	2 h
NANOG	1:600	Abcam	Ratón	2 h
-------	--------	------------	--------	--------------------
OCT4	1:100	Santa Cruz	Ratón	Overnight (o/n)
H3K4	1:1000		Conejo	2 h
Н3К9	1:200	Santa Cruz	Conejo	Overnight (o/n)
H3K27	1:200	Santa Cruz	Conejo	Overnight (o/n)

Figura M.3.

5. Doble ChIP consecutivo (Re-ChIP).

El doble ChIP consecutivo (Re-ChIP) se realizó para detectar la unión simultánea de dos proteínas a la misma región de DNA. El protocolo es similar al empleado para qChIP, con las siguientes diferencias: (i) el material de partida (células) tiene que ser entre dos y tres veces mayor en el caso de Re-ChIP (para una cantidad final de cromatina entre 200 y 400 µg por condición); (ii) después de los lavados con los tampones de baja y alta fuerza iónica se extraen los complejos DNA-proteína retirando la proteína A/G Plus agarosa por elución con 25 µl de DTT 10 mM durante 20 min a 37 °C en agitación intensa (x2). Este eluado se diluye diez veces en el tampón de dilución ChIP, y se vuelve a incubar con el segundo anticuerpo de interés; (iii) se lleva a cabo una segunda inmunoprecipitación con anti-GAPDH como control negativo del experimento.

6. Análisis de la expresión génica mediante PCR en tiempo real (qPCR).

El RNA celular fue extraído usando el kit comercial RNeasy (*Qiagen*) (1-2 x 10^6 células por experimento) y su concentración y pureza cuantificadas por espectrofotometría con el BioPhotometer D30 Eppendorf (A₂₆₀ y A₂₆₀/A₂₈₀). La transcripción reversa se realizó usando el kit comercial iScript cDNA (*BioRad*) empleando 100pg - 1µg de RNA por condición. La cuantificación de la expresión de los

genes de interés se realizó mediante PCR en tiempo real (*StepOne, Applied Biosystems*) usando cebadores específicos para cada gen analizado y los cDNAs sintetizados. La expresión de cada gen se normalizó por la de los controles constitutivos *GAPDH* y β -*ACTINA* (ver anexo I: Tabla de Primers).

7. Transfección de células en cultivo.

Para las transfecciones transientes se usó el nucleoporador MicroPorator MP-100 (*Digital-Bio*). Como paso previo, las células fueron transferidas a medio completo sin antibiótico 12-24 h antes de la transfección. En el momento de la electroporación, las células se tripsinizaron (*Life Technologies*), se lavaron y se resuspendieron en medio Opti-MEM (*Gibco*). A esta solución se le añadió el DNA correspondiente (cDNA y shRNA para AhR generados en nuestro laboratorio y siRNA comercial anti-AhR (*Dharmacon*). Los cDNAs se emplearon a una concentración de 5 μ g / 10⁶ células mientras que los siRNA y shRNA frente a AhR se añadieron a 100 nM. Las condiciones de electroporación fueron: un pulso de 1400 V durante 30 ms (NTERA-2). Transcurridas 24 h desde la transfección, las células se cambiaron a medio completo y se crecieron durante 48-60 h adicionales.

8. Chromosome Conformation Capture (3C).

El 3C es una técnica de biología molecular que permite revelar las interacciones entre fragmentos de cromatina situados a una larga distancia entre sí.

8.1. Cross-linking y digestión celular.

Las células N-TERA2 se sembraron en placas de 100 mm, tal y como se describe en la sección 1. Una vez terminados los tratamientos correspondientes, las células se lavaron una vez con PBS para eliminar los restos de medio de cultivo para, posteriormente, fijarlas en 10 ml de PBS con PFA (a una concentración final del 2%) durante 10 minutos con agitación suave. A continuación, para detener la reacción de fijación, se le añadió glicina (125 mM) durante 5 minutos, también con agitación suave.

Utilizando un *scrapper* o rascador, las células ya fijadas fueron despegadas de la placa en PBS y centrifugadas a 2000 rpm a 4°C durante 5 minutos, y el sobrenadante fue retirado. A continuación, los *pellets* se resuspendieron en 5 ml de buffer de lisis frío (50mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% NP-40, 1% Triton X-100, 1x *complete protease inhibitors* de Roche) y se dejaron reposar en hielo durante 10 minutos. Posteriormente, se transfirieron las células a un homogeneizador de tejidos, con movimientos suaves cada 10 minutos, hasta que las células se lisaron por completo, dejando los núcleos intactos. Una vez comprobada la correcta lisis celular, las células se centrifugaron 5 minutos a 4 °C y 2000 rpm, y los pellets resultantes resuspendieron en 450 µl de agua mili-Q.

8.2. Digestión enzimática.

Tras la adición de 60 µl de tampón de digestión B 10x y de 15 µl de SDS al 10%, las muestras se incubaron durante una hora a 37°C con agitación fuerte a 900 rpm. Después, se le añadieron 75 µl de Triton x-100 para contrarrestar el SDS, y se incubó durante una hora más, también a 900 rpm y 37°C de temperatura. Como control sin digerir, se tomó una muestra de 10 µl de cada tubo, y se guardaron a 4°C hasta su posterior incorporación. Para la digestión enzimática, se añadieron 200 U de HindIII y se incubaron las muestras durante toda la noche a 37°C y 900 rpm. Tras esas 12 horas, se añadieron otras 200 U de enzima extra durante 4 horas. Tras ello, se tomaron nuevamente otros 10 µl como control de la digestión, y se corrieron en un gel de todos esos controles incubándolos con 5 µl de *Proteinase K* 10 mg/ml (Roche) en 95 µl de Tris-HCl 10mM pH 7,5 durante una hora a 65°C para revertir la fijación. En el caso de que la digestión no hubiese funcionado, se volvería a añadir enzima y tampón nuevo, y se incubarían las muestras otras 12 horas. Una vez que se haya producido la correcta digestión, continuamos con el siguiente paso.

8.3. Ligación de la cromatina digerida.

Con el fin de inactivar la enzima de restricción, las muestras se calentaron a 65°C durante 20 minutos, y fueron transferidas a un tubo Falcon de 50 ml. Se les añadió un volumen de 5,7 ml de agua mili-Q, junto con 700 µl de tampón de ligación 10x (300mM Tris-HCl pH 7.8, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 10 mM ATP) y 30 U de T4 DNA *Ligase (New England Biolabs)*, para su posterior incubación a 16°C durante toda

la noche. Al día siguiente, se comprobó la eficiencia de la ligación mediante la toma de partes alícuotas de 100 μ l que fueron procesadas de la misma manera que en la sección anterior. A continuación, tanto las muestras ligadas como las muestras digeridas se compararon tras correr en un gel de agarosa. Si la ligación había ocurrido de forma correcta, las muestras se procesaron como se indica a continuación. En caso contrario, se añadiría de nuevo la T4 DNA *Ligase* con su correspondiente tampón.

8.4. Revertir cross-linking y purificación del DNA.

Las muestras fueron incubadas con 30 µl de Proteinase K (10 mg/ml, Roche) a 65°C durante toda la noche para revertir la fijación. Al día siguiente, los restos de RNA se retiraron mediante la adición de RNAse A (10 mg/ml, Roche) durante 45 minutos a 37°C. Finalmente, el DNA se purificó mediante una extracción fenol/cloroformo seguida de una precipitación en etanol. Para ello, se añaden a las muestras 1/10 de volumen de acetato sódico 3M a pH 5,2. A continuación, se le añade 1 volumen de fenol y se mezcla bien por inversión. Los tubos se centrifugaron 5 minutos a máxima velocidad, y la fase superior acuosa resultante fue transferida a un tubo limpio. En él, se añade 1 volumen de fenol/cloroformo 50/50, y se repite el paso anterior. De nuevo recuperamos la fase acuosa, a la cual añadimos por último 1 volumen de cloroformo, y se centrifuga de nuevo. Se recupera la fase acuosa y , para precipitar el DNA, se añaden dos volúmenes de etanol 100% frío, y se incuba al menos durante una hora a -80°C. Posteriormente, centrifugamos las muestras durante 15 minutos a máxima velocidad y a temperatura ambiente. Se retiró el sobrenadante y el DNA se lavó con 1 ml de etanol 70% en las mismas condiciones que la centrifugación anterior. Finalmente, dejamos secar los tubos y los *pellets* se resuspendieron en 150 µl de Tris-HCl 10 mM pH 7,5 a 37°C durante 30 minutos y, posteriormente, el DNA se hidrató durante 14-16 horas a 4°C. Posteriormente, las muestras se guardaron a -20°C hasta su uso en PCR cuantitativa.

8.5. PCR cuantitativa de los productos de ligación.

Se diseñó un grupo de *primers* específico para las zonas de corte de HindIII contenidas en la región de 88 kb en la que se encuentra NANOG y sus elementos Alu. El rango lineal de amplificación fue determinado mediante la qPCR de diluciones seriadas del BAC de control y las muestras obtenidas del 3C, con diferentes parejas de *primers*. Una vez establecida la concentración de trabajo para el DNA, se realizaron

qPCRs por duplicado en las que se fijó como gancho el primer **número 3** (correspondiente al Alu x45s) y se combinó con el resto de *primers* de la región (3+1, 3+2, 3+4,...). Posteriormente se realizó el mismo proceso estableciendo esta vez como gancho el *primer* **número 6** (correspondiente al Alu x14s). Para calcular la frecuencia de interacción relativa, se utilizó como *standard* una curva generada de la dilución serial de muestras del BAC (sección 8.6), la cual contenía todos los posibles productos de ligación en la misma proporción. Con el objeto de poder comparar distintos experimentos de 3C, las interacciones observadas en cada caso fueron normalizadas con el control interno ERCC3-BAC (sección 8.6), un locus del genoma cuya distribución espacial permanece inalterable en las distintas condiciones experimentales (De Laat & Grosveld, 2003; Palstra et al., 2003; Drissen et al., 2004). Para la qPCR se utilizó como fluoróforo una *MasterMix* de SYBR-Green de *Applied Biosystems*.

8.6. Preparación del BAC.

Para poder normalizar la eficiencia de la qPCR con las diferentes parejas de *primers*, era necesario un control positivo. Se preparó una plantilla con todos los posibles productos de ligación posibles en idéntica proporción, la cual fue generada mediante digestión aleatoria y posterior ligación de un cromosoma artificial bacteriano (*Bacterial Artificial Chromosome*, BAC) que cubría la región de interés del cromosoma 6 en la que se encuentra NANOG. El BAC fue obtenido del BACPAC *Resources Center* del *Children's Hospital Oakland Research Institute* de Oakland (California, USA). Adicionalmente, se utilizó otro BAC que contenía el locus de normalización ERCC3 para poder comparar las distintas muestras.

Una vez recibidos, los clones del BAC fueron restriados en placas de LB Agar suplementadas con 30 mg/ml de cloranfenicol (Sigma-Aldrich) e incubadas toda la noche a 37°C. Por cada construcción, se picaron un mínimo de 3 colonias, las cuales se crecieron durante toda la noche en un cultivo de 3 ml de medio de cultivo LB con la misma concentración de cloranfenicol, con una agitación de 210 rpm. Al día siguiente, las *minipreparations* de los BACs se centrifugaron a 10000 g durante 1 minuto, y los *pellets* se resuspendieron en 100 µl de Solución I (50 mM glucosa, 25 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EDTA pH 8). Para la lisis, se añadieron 200 µl de Solución II (0,2 M de NaOH, 1% de SDS) y se incubaron las muestras durante 5 minutos a temperatura

ambiente. La lisis fue neutralizada añadiendo 150 µl de Solución III (AcK 3M, 11,5 % v/v de ácido acético glacial) durante 10 minutos en hielo. Posteriormente se centrifugaron los tubos 5 minutos a 4°C con velocidad máxima, y el DNA resultante fue precipitado con etanol. Finalmente, los *pellets* se resuspendieron en 30-50 µl en TE. A continuación, comprobamos mediante amplificación por PCR si los clones presentaban las secuencias esperadas.

El BAC purificado fue cuantificado en un gel por densitometría y se digirieron 5 μ l de DNA total en un volumen final de 500 μ l con 200 U de HindIII durante toda la noche a 37°C. En paralelo, se tomó 1 μ l del BAC del ERCC3 para una digestión en las mismas condiciones. Tras confirmar en un gel de agarosa que las digestiones habían funcionado, el DNA se purificó mediante una extracción fenol/cloroformo seguida de una precipitación en etanol, para posteriormente poner una ligación en un volumen final de 100 μ l con 6 U de T4 DNA *Ligase* (New England Biolabs) durante toda la noche a 16°C. La eficiencia de la ligación se comprueba nuevamente en un gel de agarosa y las muestras se purifican finalmente de la misma manera que en el apartado anterior. Los *pellets* resultantes se resuspenden en 100 μ l de TE.

9. Engineered Chromatin Immunoprecipitation (enChIP) mediante CRISPR.

El enChIP es un novedoso método de biología molecular basado en CRISPR-Cas9 que se utiliza para capturar una región concreta de cromatina junto con todas las proteínas que interactúan con la misma. Para ello disponemos de una enzima Cas9 catalíticamente inactiva (no corta DNA) a la cual se le ha unido un *tag* de FLAG, el cual nos va a permitir posteriormente hacer un ChIP usando un anticuerpo anti-FLAG. A continuación podemos observar un esquema de la técnica (figura **M.2**.)



Figura M.4.:

9.1 Cultivo, tratamientos y transfección.

Por cada condición experimental, se utilizaron 5 x 10^6 células N-TERA2. Se mantuvo un grupo de células control y otro tratado con ácido retinoico (RA) 1 μ M durante 48 horas. Cuando comenzó el tratamiento de RA, además, las células fueron transfectadas con 2 μ g de 3xFLAGdCas9/pCMV-7.1 (Addgene) utilizando *Lipofectamine 3000* (Invitrogen).

9.2. Fijación y sonicación de la cromatina.

48 horas post-transfección y post-tratamiento, las células se fijaron en una solución de PBS que contenía un 1% de PFA, durante 15 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. A continuación, para detener la reacción de fijación, se le añadió glicina (125 mM) durante 5 minutos, también con agitación suave.

Posteriormente, la cromatina fue sonicada del mismo modo que en el protocolo de ChIP (apartado 4). La cantidad de DNA total resultante es medida en el BioPhotometer d30 (Eppendorf), con el objetivo de continuar el experimento con cantidades equimoleculares entre las distintas muestras.

9.3. Incubación con anticuerpos y lavados.

Para reducir las uniones inespecíficas, las muestras se incubaron durante 45 minutos a 4 °C con agitación suave en presencia de proteína A/G Plus agarosa, del mismo modo que en el ChIP convencional explicado anteriormente. Las muestras resultantes tras este proceso de *pre-clear* se incubaron con 10 µg de anticuerpo anti-FLAG M2 (Sigma-Aldrich) conjugado con bolas de A/G Plus agarosa durante toda la noche a 4°C con agitación suave. Al día siguiente, se hicieron lavados del mismo modo que en el ChIP convencional (apartado 4), con la excepción de que, en lugar de los dos últimos lavados con TE, en este caso se utilizó tampón TBS (50 mM de Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl) con un 0,1% de IGEPAL CA-630 (Sigma-Aldrich).

9.4. Elución y purificación de las muestras.

Los inmunoprecipitados se eluyeron incubando cada muestra con 200 μ l del péptido de 3xFLAG (Sigma-Aldrich), a una concentración de 500 μ g/ml, en TBS con un 0,1% de IGEPAL CA-630 durante 20 minutos a 37°C. Tras la elución, las muestras fueron precipitadas con isopropanol, para su posterior resuspensión en 40 μ l de *simple buffer* 2x e incubación a 95°C durante 30 minutos para revertir la fijación inicial con PFA, así como desnaturalizar las proteínas para el siguiente paso.

9.5. Separación en gel de acrilamida.

Las muestras, ya desnaturalizadas, se cargaron en un gel de acrilamida para una electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), como se explica en el apartado 2.4. La principal modificación es que en el gel únicamente se dejan correr las muestras una distancia de 1 o 2 cm (lo mínimo para que se separen), y se procede a realizar una tinción de plata, que nos dará una buena resolución de las proteínas. Para ello, primero fijamos el gel durante 30 minutos en una solución con 40% de etanol y 10% de ácido acético. A continuación, incubamos el gel durante otros 30 minutos con un tampón de sensibilización (30% etanol, 0,2% p/v tiosulfato sódico, 6,8% p/v acetato sódico). Lavamos el gel 3 veces durante 5 minutos con agua mili-Q y

posteriormente lo teñimos con una solución de nitrato de plata 0,25% p/v durante 20 minutos con agitación lenta. Después, lavamos el exceso de tampón con agua mili-Q durante 5 minutos (x2) y revelamos durante 2-5 minutos en una solución de revelado (2,5% carbonato sódico, 0,04% formaldehído). Cuando las bandas comienzan a hacerse visibles, el gel se coloca en tampón de parada (1,46% p/v EDTA-Na₂-2H₂O) durante 10 minutos. Por último, lavamos el gel en agua mili-Q durante 5 minutos (x3).

9.4. Análisis por espectrometría de masas: proteómica.

Para el análisis de las muestras, tomamos el gel de acrilamida teñido con nitrato de plata y escindimos las bandas correspondientes. Posteriormente, las bandas fueron enviadas en tubos Falcon de 15 ml para el análisis de proteómica mediante espectrometría de masas en el Servicio de Proteómica del Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca (CIC).

10. Inmunofluorescencia de células.

Las células se sembraron en cristales de 13 mm de diámetro. Tras un lavado en PBS, las células se fijaron en paraformaldehído al 3,5 % durante 10-15 min a temperatura ambiente. Tras lavar el exceso de paraformaldehído, se procedió a la permeabilización de la membrana celular durante 10 min en PBS conteniendo Triton X-100 al 0,1 % y BSA al 0,2 %. Las muestras se lavaron dos veces con PBS para eliminar el exceso de detergente y los epítopos inespecíficos se bloquearon durante 30 min en PBS+BSA al 2%. A continuación, se añadió el anticuerpo específico diluido en solución de bloqueo durante al menos 2 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C en cámara húmeda. Los anticuerpos primarios empleados se indican en la tabla M.III. Para los experimentos de co-localización de proteínas se realizaron incubaciones múltiples empleando el mismo protocolo. Tras tres lavados con PBS, se llevaron a cabo las incubaciones con los anticuerpos secundarios marcados con diferentes fluoróforos durante aproximadamente 1 h en cámara húmeda a una dilución 1:500. Tras varios lavados adicionales con PBS, los cristales se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente con DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol) 2 µM disuelto en PBS. Tras eliminar el exceso de DAPI, se realizó el montaje de los cubreobjetos utilizando una solución de PBS y glicerol (1:1). Una vez montadas, las preparaciones se analizaron por microscopía confocal de fluorescencia empleando un equipo Olympus FV1000 en la unidad de microscopía del Servicio de Técnicas Aplicadas a las Biociencias (STAB) de la Universidad de Extremadura.

11. Inmunofluorescencia de tejidos e inmunohistoquímica.

Las secciones de tejidos, previamente fijadas e incluidas en parafina, fueron desparafinadas en xilol y rehidratadas gradualmente hasta PBS. Una vez hidratadas, se inactivó la peroxidasa endógena durante 45 min por incubación en PBS-Tritón X100 (PBS-T) conteniendo H₂O₂. Tras lavar con PBS-T, se llevó a cabo el bloqueo de los epítopos inespecíficos en la misma solución conteniendo gelatina 2 g/l y lisina 0,1 M (PBS-T-G-Lys). A continuación, las secciones se incubaron durante 16-18 h con el anticuerpo primario diluido en PBS-T-G en las condiciones indicadas en la tabla M.IV. Acabada la incubación, las secciones se lavaron varias veces con PBS-T-G y se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado durante 1 h a temperatura ambiente. Tras lavar el exceso de anticuerpo secundario, las secciones se incubaron con estreptavidina-peroxidasa y se revelaron empleando una solución de diaminobencidina (DAB). El revelado se detuvo con PBS y realizó una tinción con hematoxilina. Finalmente, las muestras se deshidrataron empleando alcoholes de concentraciones crecientes y se montaron empleando Eukitt (Kindler GmBH). Las secciones se visualizaron y fotografiaron en un microscopio Zeiss.

Para los ensayos de inmunofluorescencia, el proceso fue el mismo salvo que se eliminaron la inactivación de la peroxidasa endógena y el revelado con estreptavidinaperoxidasa y DAB ya que los anticuerpos secundarios que se emplean en esta técnica estaban conjugados con moléculas fluorescentes. Además, la tinción con hematoxilina se sustituyó por una incubación con DAPI y la visualización de las secciones se realizó en un microscopio confocal Olympus FV1000 en la unidad de microscopía del Servicio de Técnicas Aplicadas a las Biociencias (STAB) de la Universidad de Extremadura.

Anticuerpo	Dilución	Casa	Anticuerpo	Tiempo
primario		comercial	secundario	incubación
AhR	1:1000	Pierce	Conejo	2 h
NANOG	1:600	Abcam	Ratón	2 h
OCT4	1:100	Santa Cruz	Ratón	Overnight (o/n)

Figura M.5.

12. Extracción de fragmentos de mononucleosoma de células N-TERA2.

12.1. Extracción de núcleos.

Después de los tratamientos correspondientes, las células se extrajeron de la placa con un rascador o *scrapper*, y fueron centrifugadas en PBS frío durante 5 minutos a 2000 rpm. A continuación, se añadieron a los *pellets* 2 ml de tampón A frío (15 mM HEPES pH 7,5, 60 mM KCl, 15 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0,34 M sacarosa, 1x *Protease Inhibitor Cocktail* EDTA-free, 0,15 mM 2-mercaptoetanol, 0,15 mM Spermidine), y se homogeneizaron las células con un *potter* de cristal al menos 30 veces de manera suave. A continuación, se añadió a las muestras 1 ml de tampón B (15 mM HEPES pH 7,5, 60 mM KCl, 15 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 1,1 M sacarosa, 1x *Protease Inhibitor Cocktail* EDTA-free, 0,15 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 1,1 M sacarosa, 1x *Protease Inhibitor Cocktail* EDTA-free, 0,15 mM 2-mercaptoetanol, 0,15 mM Spermine y 0,5 mM Spermidine), el cual actuará como colchón de sacarosa. Con cuidado, se mantuvieron las fases separadas y se centrifugaron los tubos a 800 g durante 5 minutos. Posteriormente, retiramos el sobrenadante y resuspendimos el resto en otros 2 ml de tampón A, repitiendo la operación anterior una vez más. Tras centrifugar de nuevo otros 5 minutos a 800 g, los núcleos fueron resuspendidos en 1 ml de *Nuclei Freezing Buffer* (50 % glicerol, 0,15 M NaCl, 5mM MgCL₂, 10 mM Tris-HCl pH 8, 0,1

mM EDTA, 1 mM DTT), para luego hacer partes alícuotas de 100 µl y congelarlas a -80°C hasta su uso.

12.2. Digestión nuclear con MNase (Nucleasa Micrococal).

Se descongelaron los tubos necesarios y se resuspendieron en 1 ml de tampón de digestión de MNase (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 15 mM NaCl, 60 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 0,15 mM Spermine y 0,5 mM Spermidine). A continuación, se centrifugaron durante 15 minutos a 3000 rpm a 4^aC. Se retiró el sobrenadante y se resuspendieron los núcleos en 5 ml de tampón de digestión, repartiéndolos en 5 tubos Falcon de 15 ml cada uno. Posteriormente, se añadieron a cada tubo 6 unidades de MNase (Sigma-Aldrich) por cada µg de DNA, y se hizo una corta incubación de 30 segundos a 37°C. A continuación, paramos la reacción incubando los tubos en hielo y añadimos 20 µl de EDTA 0,5 M, 200 µl de SDS 10% y 40 µl de NaCl a cada uno de ellos. Posteriormente, se adicionaron a cada tubo 5 µl de *Proteinase K* (20 µg/µl) y se incubaron durante una hora a 37°C. Finalmente, se realizó una extracción fenol/cloroformo y una posterior precipitación con etanol, del mismo modo que se explica en el apartado 8.4. El DNA resultante fue resuspendido en 20 µl de tampón TE.

Las diferentes muestras fueron analizadas en un gel de agarosa al 1%, en el cual se compararon las bandas correspondientes a los distintos patrones de corte de la MNase según el tratamiento inicial.

13. Hibridación in situ.

La expresión de los retrotransposones B1-SINE fue analizada en criosecciones de testículos de ratones AhR+/+ y AhR-/- de 12 o 14 días de edad mediante la técnica de hibridación *in situ*. En primer lugar, los testículos fueron extraídos, congelados y fijados en paraformaldehido 4% para, posteriormente, obtener secciones de tejido. Tras la acetilación, permeabilización y lavados, las secciones de tejido fueron pre-hibridadas durante 2 horas a temperatura ambiente en un tampón compuesto por 50% formamida, 5mM EDTA, 50µg ml⁻¹ tRNA, 0,2% tween-20 y 0,2% CHAPS. Las sondas de RNA marcadas con digoxigenina se diluyeron previamente en solución de pre-hibridación a una concentración de 200-300 ng ml⁻¹, se calentaron a 80°C durante 5 minutos, se enfriaron en hielo y se añadieron a las secciones de tejido. La hibridación se llevó a cabo durante toda la noche a 72°C en una cámara húmeda. Al día siguiente, las secciones se lavaron secuencialmente en tampón SSC 0,2X a 72°C durante una hora y

posteriormente en tampón 100mM Tris-HCL (ph 7,5), 100mM NaCL, 0,1% Triton X-100. Posteriormente, las secciones se bloquearon en monocloruro de lisina 0,1M con 10% de suero de cabra y se incubaron durante toda la noche con anticuerpo anti digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina. A la mañana siguiente, después de lavar las secciones como se indica anteriormente, las secciones se incubaron con *Nitroblue Tetrazolium* (NBT) y con 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) como sustratos (*Roche*). Finalmente, las muestras se lavaron con PBS y se utilizó Mowiol como medio de montaje.

Para preparar las sondas sentido (SE) y antisentido (AS) que nos permitieran detectar los transcritos B1-SINE, en primer lugar amplificamos mediante PCR la secuencia B1-SINE utilizando los oligonucleótidos indicados en la tabla suplementaria. Después, el producto de PCR fue clonado en el vector pGEM-T *easy* para la síntesis de la sonda. La sonda AS fue sintetizada utilizando la T7 RNA polimerasa en un vector pGEM-T digerido con la enzima de restricción PstI, mientras que la sonda SE se produjo usando la SP6 RNA polimerasa en un vector pGEM-T digerido con ApaI.

En los experimentos combinados de inmunofluorescencia (MVH, Mili y Miwi) y posterior hibridación *in situ*, los anticuerpos primarios fueron añadidos previamente al montaje de las secciones histológicas.

14. Ensayos de fertilidad y obtención de esperma del epidídimo.

Para la realización de este experimento, se extrajeron los epidídidmos de 10 ratones AhR+/+ y AhR-/- de 8-10 semanas de edad. A continuación, se aplicó presión sobre los mismos en una placa de Petri que contenía 1 ml de medio *Pure Sperm Wash* (Nidacon) para obtener el esperma. La suspensión se homogeneizó vigorosamente y el número de espermatozoides se obtuvo mediante contaje con una cámara de Neubauer, realizando al menos 8 medidas por duplicado en cada uno de los campos. En el contaje, únicamente se tuvieron en cuenta los espermatozoides móviles.

La capacidad fértil de ratones machos AhR+/+ y AhR-/- fue estudiada mediante experimentos de apareamiento con hembras fértiles ICR de 6 a 8 semanas de edad (Harlan). Se utilizaron grupos de 20 hembras ICR y 4 machos por cada genotipo de AhR. El número de embriones viables recuperados se obtuvo a 18 días post-coito.

15. Caracterización funcional de los espermatozoides de los epidídimos.

Para realizar un análisis funcional, se extrajeron los epidídimos de 8 ratones AhR+/+ y AhR-/- y se realizó una preparación de esperma en medio TNE. A continuación, esas suspensiones se dividieron en dos fracciones, una para el análisis mediante citometría de flujo de la actividad mitocondrial y la integridad de la membrana, y la otra para un análisis de motilidad espermática y parámetros cinéticos.

16. Medida de la actividad esteroidogénica.

Los niveles de SF-1 fueron cuantificados en ratones machos AhR+/+ y AhR-/- a partir del suero sanguíneo utilizando un kit comercial de ELISA (*MyBiosource*). Para ello, se obtuvo la sangre de los ratones en tubos pre-tratados con EDTA y, tras homogeneizar la solución, se centrifugó a 5000g durante 5 minutos a 4°C. Tras una segunda centrifugación en las mismas condiciones, el sobrenadante se guardó a -80°C hasta su uso. En la placa de ELISA, se repartieron partes alícuotas de 50 µl de suero de cada uno de los ratones por triplicado, y se midió la densidad óptica a 450 nm en el luminómetro Varioskan Flash (*Thermo Scientific*). La concentración de SF-1 en el suero fue determinada mediante una curva estándar preparada a partir de concentraciones conocidas de SF-1 purificado.

17. Citometría de flujo.

Inicialmente, se prepararon las siguientes soluciones madre: *LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain k*it (50 µl de DMSO en el vial *LIVE/DEAD*) y *MitoTracker Deep Red* (500 µM en DMSO). A continuación, las muestras de 1 ml que contenían 1 x 10⁶ espermatozoides ml⁻¹ en PBS fueron teñidas con 1 µl de solución *LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell* y con 0,3 µl de *MitoTracker Deep Red*. Tras una agitación vigorosa, las muestras se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Posteriormente, los espermatozoides se lavaron en PBS previamente al análisis por citometría de flujo. El citómetro utilizado fue el *MACSQuant Analyser 10 (Miltenyi Biotech*), equipado con 3 láseres emitiendo a 405, 488 y 635 nm respectivamente, y 10 tubos fotomultiplicadores (PMTs). El *software* utilizado fue el *MACSQuantify* versión 2.6. Las subpoblaciones de espermatozoides fueron evaluadas mediante histogramas o divididas en cuadrantes con el objetivo de cuantificar la frecuencia de cada una de ellas. Por cada una de las muestras se analizaron un total de 40.000 eventos. Para compensar el posible solapamiento espectral, se utilizaron muestras sin teñir (control negativo) y teñidas (control positivo) por cada una de las muestras estudiadas. Finalmente, los datos fueron analizados utilizando el programa informático *FlowJo v.10* (LLC).

18. Medida de la motilidad espermática y parámetros cinéticos.

La fracción de esperma previamente preparada fue centrifugada y resuspendida en medio HBSS suplementado con 2% de BSA, y se incubó durante 30 minutos a 37°C. Estas muestras se utilizaron para medir la velocidad circular (VCL), velocidad lineal (VSL) y velocidad media (VAP) de los espermatozoides. La motilidad espermática y los parámetros cinéticos fueron analizados utilizando el *software* CASA (*computer-assisted sperm analysis*) (ISAS Proiser). Para ello, se cargaron 3 µl de esperma en una cámara Leja de 20 µm de profundidad, y se colocó en una placa calefactada a 37°C. El análisis se realizó tras la evaluación de 60 imágenes digitalizadas consecutivas por segundo, utilizando un objetivo 10x de contraste de fase negativo (*Olympus CX41*). Al menos tres campos fueron grabados para asegurar que al menos 200 espermatozoides fueran analizados por cada muestra. Los espermatozoides cuya VAP fuese menor que 10 µm s⁻¹ se consideraron inmóviles, mientras que los que presentaban una VAP superior a 15 µm s⁻¹ se consideraron móviles. Los espermatozoides que poseían una desviación menor al 75% de movimiento en línea recta fueron catalogados como linealmente móviles, mientras que los que poseían una VCL mayor a 45 µm s⁻¹ fueron considerados rápidos.

19. Aislamiento de folículos, vesículas germinales y oocitos MII.

En primer lugar, se extrajeron los ovarios de hembras de ratones AhR+/+ y AhR-/- con edades comprendidas entre las 8 y las 12 semanas. Para cada uno de los experimentos, se utilizaron 14 hembras de cada genotipo, de las cuales se aislaron los oocitos en estadio de folículo, vesícula germinal (GV) y MII. Para ello, los ovarios fueron disgregados con pinzas en medio MEM suplementado con 25 mM HEPES, 0,23 mM de piruvato de sodio, 3 mg ml⁻¹ de BSA y 1% de penicilina/estreptomicina. Los

folículos se separaron de las GV utilizando un stripper (Origio), y cada grupo independiente fue fijado en paraformaldehido 3,5% durante 15 minutos a temperatura ambiente. Para retirar la zona pelúcida y facilitar así la entrada de los anticuerpos, los oocitos se incubaron en una solución de ácido Tyrode's durante 15-20 segundos a 37°C. Para el posterior análisis mediante inmunofluorescencia, los oocitos se incubaron en solución de bloqueo con PBS-BSA 1% y 0,1M de glicina durante una hora. Posteriormente, se realizó la incubación con los anticuerpos frente a MVH, Mili y Miwi en solución de bloqueo durante toda la noche. Al día siguiente, tras los lavados de los oocitos, se incubó con un anticuerpo secundario fluorescente Alexa-633 durante dos horas a 4°C. Finalmente, las muestras se lavaron y se incubaron con DAPI durante 5 minutos para teñir los núcleos. Los oocitos se transfirieron a cámaras Ibidi y analizados mediante el microscopio confocal Olympus FV1000. En el caso de oocitos en fase MII, la obtención de los mismos se realizó a partir de las ámpulas del oviducto y, posteriormente, separados de sus células foliculares utilizando el stripper (Origio). La posterior fijación y tinción para inmunofluorescencia se realizó tal y como se indica anteriormente.

20. Análisis estadístico.

Todos los experimentos descritos en esta Tesis Doctoral se han realizado al menos en tres réplicas biológicas, con al menos dos replicas experimentales de cada condición. Los datos se muestran como media ± desviación estándar (s.d.) y se han aplicado diferentes pruebas de significación estadística. El análisis aplicado por defecto fue el test T de Student para muestras no pareadas. La generación de gráficos y la significación estadística han sido obtenidas empleando el software GraphPad 6.0. Los datos de significancia estadística son referidos respecto a la condición basal de cada experimento, a no ser que se indique lo contrario.

Objetivos (capítulo I)

- Predecir *in silico* la interacción de AhR con factores de transcripción reguladores de la transición epitelio-mesénquima, como SLUG/SNAIL, a través de regiones genómicas con presencia simultánea de los sitios de unión a AhR (XRE) y SLUG en humanos.
- 2. Comprobar la capacidad *insulator in vitro* de los elementos Ax14s, Ax36s y Ax45s y demostrar la capacidad de bloqueo de *enhancer* y de barrera de heterocromatina.
- Demostrar la implicación de AhR y de los elementos Alu en los procesos de diferenciación celular.
- 4. Definir el mecanismo molecular por el cual los Alu regulan a los genes implicados en diferenciación celular OCT4 y NANOG

Resultados (capítulo I)

1. Detección bioinformática de los elementos x14s, x36s y x45s.

El interés en identificar una potencial co-regulación en la actividad transcripcional entre *AHR* y *SLUG* nos llevó a diseñar una estrategia bioinformática que pudiera detectar regiones promotoras en el genoma humano que pudieran co-localizar los sitios de unión de AHR (XRE) y SLUG (**figura RI.1**).



Figura RI.1: *Workflow* esquemático del análisis bioinformático diseñado para la detección de regiones significativas donde co-localizen XRE y el sitio de unión de SLUG.

A partir de este análisis, realizado mediante un *script* de Perl, se encontró que los sitios de unión XRE (5-3) y SLUG (5-3) co-localizaban en tres fragmentos de menos de 200 pares de bases (pb) en un total de 24000 regiones promotoras del genoma humano analizadas. Sorprendentemente, destacaron tres regiones de 2200, 4800 y 5900 pb, en las cuales la distancia entre los sitios de unión XRE y SLUG era de 36, 45 y 14 pb respectivamente (**figura RI.2**). Estos tres elementos se denominarán X14S (**X**RE-**14**pb-**S**LUG), X36S y X45S.



Figura RI.2: Análisis de la posición relativa entre XRE y el sitio de unión de SLUG en promotores del genoma humano. Ambos sitios muestran preferencia por co-localizar a exactamente 14, 36 o 45 pb de distancia. El perfil de distribución teórica se muestra con una línea azul punteada, mientras que la media de 200 parejas de motivos con distribución aleatoria se muestra con una línea roja continua.

2. Búsqueda por homología y caracterización de las secuencias X14S, X36S y X45S

Usando el algoritmo BLAST para buscar secuencias homólogas a X14S, X36S y X45S, se detectó que estos elementos y sus secuencias flanqueantes pertenecían a la familia de retrotransposones humanos Alu (**figura RI.3**). Un Alu es una secuencia retrotransponible de ADN de hasta 300 pb muy abundante en el genoma humano. Estos elementos característicos de primates tienen su origen en un gen ancestral del 7SL RNA.

Basándonos en estos cambios de secuencia con respecto al consenso Alu, propusimos que los tres elementos encontrados componen una nueva subfamilia de retrotransposones Alu que hemos denominado XS-Alu.

3. Alineamiento de secuencias XS-Alu

Con el propósito de encontrar una secuencia consenso para los tres elementos, se alinearon las tres secuencias X14S, X36S y X45S, sin obtener un resultado satisfactorio. Sabiendo por tanto que los tres retrotransposones debían ser estudiados por separado, se usó el mismo *script* de Perl inicial, buscando dentro de la base de datos del genoma humano la co-presencia de XRE y la secuencia nucleotídica del sitio SLUG (5'-3'). Así, se comprobó que, a nivel posicional, los tres elementos se localizaban preferentemente en regiones promotoras con respecto a regiones aleatorias (**figura RI.4**). Esto es una característica común a otros elementos repetitivos, que suelen localizarse en regiones del genoma ricas en genes. Además, se encontró que estos elementos estaban presentes en genes implicados en pluripotencia (stemness-relevant) (**figura RI.5**). Así, destacamos la presencia de elementos XS-Alu en los genes OCT4, NANOG, SOX2, WNT1, SHH, LIF, NOTCH1 y KLF4. Estos elementos se localizan en regiones flanqueantes a los genes, tanto en 5'como en 3', y además, en NOTCH1 y SHH, en el interior del propio gen.



Figura RI.5: Localización de elementos Alu x14s, x36s y x45s en genes implicados en pluripotencia.

4. Expresión de genes de pluripotencia

En primer lugar, debido a que los genes filtrados están implicados en procesos de pluripotencia, reprogramación celular y desarrollo, decidimos comprobar sus niveles de expresión en la línea celular de carcinoma embrioide humano NTERA-2, tanto en condiciones basales como en condiciones de diferenciación por ácido retinoico (RA). Para ello, inicialmente realizamos una titulación de concentración y tiempo: 1, 10 y 100 μ M de RA durante 24, 48 y 72 horas, para posteriormente hacer una medida de viabilidad por el método de MTT (**figura RI.6**). Como podemos observar, la concentración más elevada de RA (100 μ M) resultó ser mortal en cualquiera de los tiempos ensayados, por lo que rápidamente quedó descartada. En cambio, las concentraciones de 1 y 10 μ M resultaron ser viables en 24 y 48 horas. No obstante, a las 72 horas se empieza a notar una pérdida de viabilidad moderada con 1 μ M de RA, y 48 horas de tratamiento como condiciones estándar de experimentación.



Figura RI.6: Medida de la viabilidad celular mediante el método de reducción de MTT a formazán en células N-TERA2 tratadas con diferentes concentraciones y tiempos de RA.

Posteriormente, decidimos hacer un barrido para analizar la expresión de los genes mediante qPCR del panel **RI.5** en condiciones de diferenciación por RA a 24 y 48 horas de tratamiento (**figura RI.7**). Podemos observar que los niveles de expresión de todos los genes disminuyen con respecto al nivel basal tras 48 horas de tratamiento con RA, y siendo variable tras 24 horas, ya que en SOX2 obtenemos un aumento de la expresión.





Figura RI.7: Expresión de genes implicados en diferenciación con tratamientos de 24 y 48 horas de RA.

Tras analizar el comportamiento de los distintos genes, decidimos centrarnos en NANOG y en OCT4, ya que eran los que presentaban un nivel más bajo de expresión tras 48 horas de tratamiento con RA. Concretamente NANOG ya presenta una gran disminución con sólo 24 horas de tratamiento, manteniéndose a 48 horas, mientras que en OCT4 se observa una disminución progresiva a lo largo de todo el tratamiento.

5. Expresión de AhR en las células N-TERA2

Mediante la técnica de *Western Blotting* procedimos a analizar el nivel de expresión de proteína de AhR en condiciones basales y con tratamiento de 48 horas de RA (figura **RI.8**). Además, quisimos comprobar el efecto del RA en condiciones de silenciamiento de AhR mediante la transfección transiente del *hairpin* shAhR. Por ello, decidimos incluir también un tratamiento de RA de 72 horas, ya que el mayor efecto de silenciamiento del shAhR se observa tras las primeras 48 y 72 horas de transfección. Se aprecia que, tras las primeras 48 horas de tratamiento con RA, el nivel de expresión de AhR aumenta. Este efecto se observa también, aunque en menor medida, con 72 horas de tratamiento. Comprobamos además que el silenciamiento de AhR con el *hairpin* funciona correctamente disminuyendo los niveles de expresión en ambos tratamientos.



Figura RI.8: Nivel de expresión de proteína analizado mediante Western Blot en células N-TERA2 tratadas con RA 48 y 72 horas. (A) Expresión de AhR (proteína de interés) y Beta Actina (control de carga). Las líneas celulares HeLa y FGM AhR -/- se utilizaron como

control positivo y negativo de la expresión de AhR, respectivamente. (B) Cuantificación de la densidad integrada con el software ImageJ.

6. Expresión de genes de diferenciación en presencia/ausencia de AhR

Como hemos observado, cuando diferenciamos las N-TERA2 con RA, tenemos un aumento de la expresión de AhR y una disminución de expresión en genes implicados en diferenciación. El siguiente paso lógico era analizar de nuevo por qPCR los niveles de expresión de genes implicados en pluripotencia en células silenciadas para AhR con el *hairpin* (**figura RI.9**). De manera interesante, cabe destacar que la pérdida de AhR bloquea el descenso de la expresión de OCT4, NANOG, SOX2 y NOTCH1 en condiciones de diferenciación, sobre todo tras 48 horas de tratamiento. Este comportamiento es opuesto en condiciones basales, con una expresión normal de AhR. Por lo tanto, este comportamiento opuesto de AhR y los genes de diferenciación parece estar relacionado.



Figura RI.9: Tratamiento de N-TERA2 con RA durante 48 y 72 horas. (A, B, C, D) AhR fue silenciada mediante transfección transiente de shAhR. La expresión de NANOG, OCT4, NOTCH1 y SOX2 se comprobó mediante qPCR. (E) Control del silenciamiento correcto de AhR mediante Western Blot. LA cuantificación de la densidad integrada se hizo mediante el software ImageJ.

7. Unión de AhR a elementos Alu de OCT4 y NANOG

Como reseñamos anteriormente, vamos a centrar nuestro estudio en los dos genes de diferenciación que nos parecen más adecuados, NANOG y OCT4. Ambos están flanqueados por dos elementos Alu (cuatro en total), que son sitios potenciales de unión de AhR puesto que poseen la secuencia XRE. OCT4 tiene un elemento Alu x36s en 5'y un elemento Alu x14s en 3', mientras que NANOG presenta un Alu x45s en 5'y otro x14s en 3' (**figura RI.10**). Con el fin de comprobar si existe una unión real de AhR a los sitios XRE de los cuatro elementos Alu, decidimos hacer inmunoprecipitación de cromatina (ChIP). El anticuerpo utilizado en los ChIPs de los paneles A, B, C y D fue anti-AhR, y en la PCR se utilizaron los *primers* para los elementos Alu correspondientes (por un lado x14s y x36s de OCT4 y, por otro lado, x45s y x14s de NANOG).



Figura RI.10: Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) para AhR (A, B, C y D) en los elementos Alu de OCT4 (x14s y x36s) y NANOG (x45s y x14s). (E y F) ChIP para OCT4 en los elementos Alu de NANOG. En todos los casos los resultados fueron normalizados frente a un Input de DNA total. Como control negativo se utilizaron inmunoprecipitaciones sin anticuerpo (NoAb).

Los dos Alu de OCT4 presentan el mismo comportamiento: en condiciones basales, la proteína AhR está unida al Alu a través del sitio XRE, unión que se pierde cuando la célula se diferencia por RA 48 horas (paneles A y B). Esta misma tendencia se repite en el Alu x14s de NANOG (panel D). En cambio, en el Alu x45s de NANOG, la situación es la opuesta: en condiciones basales AhR no presenta unión, la cual sí que se observa tras el tratamiento de RA 48 horas (panel C). Por este motivo, decidimos hacer un ChIP adicional, utilizando en este caso un anticuerpo anti-OCT4 para la inmunoprecipitación (en lugar del anti-AhR), y comprobando por PCR los Alu de NANOG x45s y 14s (paneles E y F). En este caso, obtenemos un aumento considerable de la unión de OCT4 al Alu x45s de NANOG cuando la célula está diferenciada (panel E), y ningún tipo de unión para el Alu x14s de NANOG (panel F). De esta manera, en el Alu x45s de NANOG, tanto AhR como OCT4 presentan el mismo patrón de unión. Debido a esta peculiaridad, optamos por realizar un estudio en profundidad sobre este elemento x45s de NANOG. En primer lugar, para comprobar si la unión de OCT4 al x45 era dependiente de AhR, hicimos un ChIP con anti-OCT4 en células N-TERA2 con AhR silenciado. En este caso, utilizamos una línea estable N-TERA2 shAhR que se desarrolló en nuestro laboratorio a través de un protocolo de infección retroviral, con lo que de aquí en adelante no sería necesaria ninguna transfección transiente del hairpin de AhR (figura RI.11). Como podemos observar, en las N-TERA2 shAhR perdemos la unión de OCT4 con el tratamiento de RA 48 horas (panel A). Este resultado indica que la presencia de AhR es necesaria para que OCT4 se una al elemento Alu x45s de NANOG. A continuación, hicimos una doble inmunoprecipitación de cromatina (reChIP), utilizando primero un anticuerpo anti-OCT4 y, con la cromatina que se obtuvo, un anticuerpo anti-AhR (panel B).



Figura RI.11: ChIP para OCT4 en N-TERA2 shAhR (A). ReChIPs para OCT4-AhR (B) y CTCF-AhR (G). ChIPs para RPC32 (C), CTCF (D), Pol II € y PARP-1 (F). En todos los casos los resultados fueron normalizados frente a un Input de DNA total. Como control negativo se utilizaron inmunoprecipitaciones sin anticuerpo (NoAb).

Como podemos ver, volvemos a carecer de unión en situación basal, pero con la célula diferenciada obtenemos una banda muy clara, indicando que AhR y OCT4 se unen a la vez al Alu x45s de NANOG. Además, hicimos dos nuevos ChIPs para RPC32 (subunidad catalítica de la RNA Polimerasa III) y para Pol II (RNA Polimerasa II), en los paneles C y E, respectivamente. Esto estuvo motivado porque, por datos previos de nuestro laboratorio, sabíamos que, en ratón, el elemento B1x35s (cuyos equivalentes humanos serían los elementos Alu que estamos estudiando), aparecía un mecanismo de sustitución entre Pol II y Pol III en la transcripción de RNA. RPC32 aparece unida claramente en condiciones basales al x45s, desapareciendo con el tratamiento de RA 48 horas. En cambio, la unión de Pol II al elemento permanece casi invariable en ambos casos (C y E). Añadimos también un nuevo ChIP a este grupo, para la proteína PARP-1 (Poly ADP Ribose Polymerase 1), la cual tiene un papel relevante en procesos de diferenciación celular y cáncer (panel F). En este caso, presenta una unión leve al x45s en condiciones basales y desaparece en condiciones de diferenciación. Por último, quisimos comprobar la unión de CTCF, uno de los elementos insulator (aisladores) por excelencia muy implicado en la organización de la cromatina. El motivo fue porque, de

nuevo, el elemento B1x35s de ratón, ampliamente estudiado en nuestro laboratorio, presentaba capacidad *insulator*. En condiciones basales CTCF no está unido al x45s, pero cuando la célula comienza a diferenciarse, sí se aprecia claramente esa unión (panel D). Además, cuando hicimos un reChIP con anti-CTCF en primer lugar y, a continuación, con anti-AhR, vuelve a aparecer unión en la célula diferenciada (panel G), al igual que ocurría con los ChIPs individuales de AhR y CTCF por separado. Este resultado muestra que ambas proteínas se unen conjuntamente al elemento Alu x45s de NANOG.

8. Actividad insulator de los elementos Alu de OCT4 y NANOG

Debido a los indicios que teníamos por estos resultados iniciales, decidimos abordar la posible capacidad de los Alu x14s/x36s (OCT4) y x45s/x14s (NANOG). Para ello, realizamos unos experimentos de *Enhancer Blocking Assay* (EBA). Se hicieron diferentes construcciones para cada uno de los Alu, colocándolos en posición preenhancer o post-enhancer, tal y como se indica en la figura **RI.11**. La gráfica muestra como los cuatro elementos Alu presentan actividad insulator, siendo de nuevo el x45s de NANOG el más potente e interesante de ellos. En todos los casos, como control negativo, se colocaron los elementos en una posición *pre-enhancer*, perdiendo la actividad insulator en todos los casos.



Figure 7. Enhancer Blocking Assay (EBA) shows that A-X14S, A-X36S and A-X45S present insulator activity. In all three cases, if the construction is placed post-enhancer, the insulator activity is higher than if placed pre-enhancer.

9. Análisis de las marcas de histonas en NANOG y OCT4

Debido a los resultados del capítulo anterior, decidimos profundizar en el papel de los elementos Alu de OCT4 y NANOG en la arquitectura y organización de la cromatina. Para ello, diseñamos una estrategia de análisis de marcas de histonas en las regiones flanqueantes de ambos genes. Para cada uno de ellos, seleccionamos 6 zonas del genoma adyacente, 3 de ellas en 5'y otras 3 en 3', prestando especial atención en escoger una muy cercana a cada uno de los elementos Alu, como se muestra en el esquema (figura **RII.1**). Se diseñó una pareja de primers de ChIP para cada una de esas regiones (6 parejas flanqueando al gen NANOG y otras 6 al gen OCT4), con el objetivo de ver la unión de las marcas de histonas me3H3**K4**, me3H3**K9** y me3H3**K27** en las diferentes condiciones experimentales.



Figura RII.1: Posición de los primers (1-6) para el análisis de marcas de metilación de histonas me3H3K4, me3H3K9 y me3H3K27.

Todas las inmunoprecipitaciones de cromatina se realizaron en condiciones basales y en condiciones de diferenciación por RA durante 48 horas. Además de en la línea *wild type* de las N-TERA2, las marcas de histonas también fueron testadas en la línea N-TERA2 *shAhR* (con y sin RA 48 horas), con el objetivo de ver la posible implicación de AhR en el proceso.



Figura RII.2:

Si centramos nuestro análisis en NANOG, en la figura **RII.2** observamos que, en células *wild type*, la unión de H3K4 en condiciones basales es bastante inferior a la que presentan las células en condiciones de diferenciación por RA 48 horas, lo cual ocurre en los 6 puntos mapeados. Observamos que, además, el perfil obtenido en la línea *shAhR* es muy similar al anterior, variando únicamente en el *primer* número 1.

Si analizamos H3K9, observamos que, en células *wild type*, el perfil basal es totalmente opuesto al del tratamiento con RA, excepto en los extremos 1 y 6 (figura **RII.3**). Además, en las células *shAhR*, perdemos ese gran aumento de unión en el tratamiento con ácido retinoico, exceptuando el punto 2, que es el único que se mantiene un elevado nivel de unión.



Figura RII.3:

Por último, con H3K27, el comportamiento observado en células *wild type* es la pérdida de unión en todo el perfil cuando tratamos con RA, exceptuando el punto 5 (figura **RII.4**). En cambio, en la línea *shAhR*, observamos un aumento de unión al



diferenciar las células. A pesar de ello, sólo se consigue superar a la unión basal en los puntos 4, 5 y 6.



Figura RII.4:

Continuando con nuestro estudio, analizamos las mismas tres marcas de histonas en el gen OCT4. Para la marca H3K4, en células *wild type* obtenemos un cambio total de perfil de unión con el tratamiento de RA, aumentando considerablemente (figura **RII.5**). En la línea *shAhR*, llama la atención que el comportamiento es prácticamente idéntico, variando sólo levemente algún punto del perfil basal con respecto a la línea *wild type*.



Figura RII.4:

En la marca H3K9, el tratamiento con ácido retinoico aumenta la unión en todos los puntos analizados, exceptuando el 4, que es prácticamente idéntica, en las células
wild type. Precisamente este punto 4 es el que, en las células shAhR, presenta un mayor aumento del nivel de unión, siendo superior todo el perfil al completo menos el punto 6 (figura **RII.5**).





Finalmente, el resultado obtenido en H3K27 en OCT4 es interesante. Mientras que en la línea *wild type* el tratamiento con RA disminuye la unión en todos los puntos

analizados, en la línea shAhR la unión es exactamente igual en los puntos 4, 5 y 6, que son los puntos más cercanos al Alu x36s (figura **RII.6**).





Figura RII.6:

10. Análisis de la estructura de la cromatina mediante el método 3C (*Chromosome Conformation Capture*)

Los resultados obtenidos en el punto anterior nos llevaron a profundizar en el análisis de la estructura tridimensional de la cromatina. Debido a la extensión y complejidad del estudio, decidimos centrarnos en el gen NANOG. Para ello, diseñamos una estrategia basada en el método *Chromosome Conformation Capture* (3C). En ella, mapeamos una región de 88 kilobases (kb) que rodea e incluye a NANOG (figura **RII.7**). Los 8 puntos seleccionados están separados por una distancia de 8 a 10 kb. Los puntos 3 y 6 serán los dos ganchos (*hooks*) del experimento, debido a que cada uno de ellos está muy próximo los Alu x45s y x14s, respectivamente.



Figura RII.7:

En primer lugar, analizamos la combinación de el gancho número 3 con cada uno de los otros puntos mapeados (3+X). En condiciones basales, las células *wild type* presentan un nivel de interacción menor que en condiciones de diferenciación por RA en la mayoría de combinaciones (figura **RII.8**), siendo este cambio especialmente pronunciado en los puntos 3+2 y 3+6, lo cual indica un alto nivel de interacción entre esas zonas (las más próximas a los Alu). En cambio, en la línea shAhR podemos

observar que este aumento de interacción con RA se pierde totalmente, quedando prácticamente idéntico el perfil basal y el de RA48, lo cual indicaría que la presencia de AhR es necesaria para este aumento de interacción entre las zonas.



Figura RII.8:

Si continuamos el análisis centrándonos en las interacciones 6+X, el resultado es similar. En la línea N-TERA2 *wild type*, el tratamiento con ácido retinoico aumenta el nivel de interacción de manera significativa en los puntos 6+1, 6+2, 6+3 y 6+5, interacción que nuevamente se pierde en la línea celular *shAhR* (figura **RII.9**).



Figura RII.9:

Esta información nos sugiere que, en condiciones basales, los dos Alu x45s y x14s que flanquean a NANOG estarían alejados entre sí. En cambio, tras 48 horas de tratamiento con RA, las regiones que contienen a ambos Alu se acercarían entre sí, posiblemente debido a la formación de un bucle de cromatina. Además, la ausencia de AhR (línea *shAhR*) impediría la formación de dicho bucle, quedando alejados el x45s y el x14s.

Posteriormente, debido a los cambios que habíamos observado con anterioridad en los patrones de metilación de me3H3K4, me3H3K9 y me3H3K27, decidimos comprobar si, en presencia de inhibidores de metilación, la formación del bucle se veía afectada de alguna manera. De esta manera, para inhibir me3H3K9 se utilizó *Chaetocin* (Selleckchem), y para me3H3K27 se utilizó *3-Deazaneplanocin A – DZNEP* (Selleckchem). Además, utilizamos también el inhibidor de metiltransferasas *5-Aza-2deoxycytidine* (Selleckchem). En cambio, para me3H3K4 no se encontró ningún inhibidor específico en el mercado. Decidimos realizar experimentos de 3C en presencia/ausencia de estos inhibidores para comprobar el nivel de interacción entre las regiones (figuras **RII.10** y **RII.11**). Cuando analizamos la combinación 3+X, se observa que el aumento de interacción característico del RA 48 horas se pierde completamente con el uso de los tres inhibidores *Chaetocin*, Aza y DZNEP (**RII.10** A, B y C, respectivamente).



Figura RII.10:

Con la combinación de *primers* 6+X ocurre lo mismo: pérdida del aumento de interacción en el tratamiento de 48 horas de RA con los tres inhibidores de metilación (figura **RII.11**).



Figura RII.11:

Por tanto, en los tres casos y, con las dos combinaciones de *primers*, se observa que, inhibiendo me3H3K9, me3H3K27 o DNA metiltransferasas, la estructura de la cromatina cambia de manera drástica, especialmente mediante el bloqueo de la formación del bucle de DNA cuando la célula se diferencia por tratamiento de ácido retinoico 48 horas.

11. Experimentos de Engineered Chromatin Immunoprecipitation (enChIP Cas9)

Los interesantes datos anteriores nos llevaron a querer profundizar todo lo posible en la arquitectura del bucle de NANOG, concretamente en las diferentes proteínas que pudieran estar implicadas en la formación del mismo. Nuestro objetivo era capturar y aislar todas las proteínas que formaran parte del complejo, evitando contaminación de regiones adyacentes. Para ello, hemos utilizado una técnica basada en CRISPR Cas9 (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) denominada *Engineered Chromatin Immunoprecipitation* (enChIP) Cas9. La técnica se basa en diseñar unas guías de unión al DNA (en este caso, a las regiones flanqueantes de NANOG), a las cuales se va a unir a su vez una forma catalíticamente inactiva de la enzima Cas9, de tal forma que la nucleasa no va a producir ningún tipo de corte. Esta Cas9, a su vez, lleva incorporada una etiqueta de FLAG (3xFLAG-dCas9), la cual nos va a permitir hacer un ChIP utilizando un anticuerpo primario anti-FLAG, con el cual seremos capaces de arrastrar todo el complejo DNA-proteína y realizar análisis de proteómica por espectrometría de masas.

Así pues, el primer paso fue el diseño de las guías. Seleccionamos una de ellas cercana al Alu x45s y las llamamos gd71, y otra en la zona del Alu x14s, llamadas gd81 (figura **RII.12**).

A continuación, ambas guías fueron clonadas en bacterias para poder transfectarlas posteriormente de manera transiente junto con la forma inactiva de Cas9 (xFLAGdCas9). Como se observa en la figura **RII.13**, se obtuvieron varias colonias positivas que habían incorporado la guía correspondiente.





Figura RII.13:

Una vez clonadas las guías, realizamos un control de transfección de 3xFLAGdCas9, mediante la técnica de *western blot*, para comprobar que el sistema funcionaba correctamente (figura **RII.14 A**). Se aprecia claramente que obtenemos expresión de Cas9 únicamente en las células transfectadas. Además de este control, necesitábamos comprobar que esta forma inactiva de Cas9 se estaba uniendo correctamente a las dos guías transfectadas. Para ellos, llevamos a cabo un experimento de ChIP convencional, habiendo diseñado previamente dos *primers* que hibridaban con las regiones del Alu x45s y x14s (**figura RII.14 B**). Comprobamos por tanto que tenemos un nivel más alto de unión de ambos *primers* cuando transfectamos ambas guías frente a condiciones de no transfección.







Una vez comprobado el correcto funcionamiento de la estrategia de enChIP-Cas9, hicimos las transfecciones correspondientes, combinando la gd71, gd81 y la proteína 3xFLAG-dCas9, en células N-TERA2, en condiciones basales y de tratamiento con RA 48 horas. Posteriormente, realizamos el protocolo del enChIP con el objetivo final de aislar las proteínas asociadas las regiones flanqueantes del bucle de NANOG para su posterior análisis por espectrometría de masas. Previamente al envío de las muestras para su análisis de proteómica, decidimos separarlas en un gel de acrilamida teñido con nitrato de plata (**figura RII.15**). En él se puede observar que las proteínas quedan capturadas eficientemente por el anticuerpo anti-FLAG (calle IP FLAG).





Una vez analizadas las muestras por espectrometría de masas, obtuvimos un interesante número de proteínas que variaban su frecuencia de unión al DNA en función de las condiciones experimentales (**figura RII.16**). Después de una primera criba de los datos obtenidos, decidimos continuar nuestro estudio analizando distintas proteínas implicadas en la modificación de la arquitectura de la cromatina (metilación, estabilidad genómica, ensamblaje de la cromatina, etc).

H2A1B	Histone cluster 1 H2A family member e
H4	Histone cluster 4 H4
H13	Histone cluster 1 H1 family member d
H12	Histone cluster 1 H1 family member c
H2AV	H2A histone family member V
H2B1D	Histone cluster 1 H2B family member d
H2AX	H2A histone family member X
H31	Histone cluster 1 H3 family member a
H1X	H1 histone family member X

Figura RII.16: tabla INCOMPLETA de proteómica.

De esta manera, seleccionamos cinco proteínas objetivo: CHAF-1B, DDX5, KSRP, PRMT1 y LAMIN A/C. A pesar de tener ya el dato preliminar de proteómica de que la frecuencia de unión de estas proteínas al bucle variaba con las diferentes condiciones experimentales, para comprobarlo de manera cuantitativa decidimos hacer ChIP y qPCR para cada una de ellas. Como se aprecia en la figura RII.17, la unión de CHAF-1B se pierde con el tratamiento de RA 48 horas en la línea wild type. En cambio, en la línea shAhR el nivel es mayor, tanto en basal como con tratamiento de ácido retinoico, lo cual indicaría que en su regulación participa AhR. DDX5 tiene un comportamiento muy similar, bajando también el nivel de unión con RA 48 horas, y presentando un nivel superior de unión cuando no tenemos AhR en la célula. En cambio, KSRP presenta un aumento de unión en el ChIP cuando diferenciamos la célula con respecto a la condición basal. Además, este aumento desaparece en la línea shAhR. La proteína PRMT1 tiene un comportamiento similar, aumentando significativamente su nivel de unión en la condición RA 48 horas. En este caso, la falta de AhR únicamente afectaría mitigando ese aumento en la diferenciación. Por último, LAMIN A/C no presenta una variación de nivel de unión entre el estado basal y el estado diferenciado, pero sí presenta una disminución en la línea shAhR, lo cual demostraría que, a pesar de que AhR participa en su regulación, este proceso no se ve afectado por la diferenciación.



Figura RII.17:

Con todos estos datos, decidimos estudiar en profundidad dos proteínas de la lista. Por un lado escogimos CHAF1B, debido a que estaba implicada en el ensamblaje de la cromatina y en la formación de nucleosomas. Además, también decidimos analizar a fondo PRMT1, por estar asociada a procesos de metilación de histonas y a modificaciones de cromatina. Con el objetivo de silenciar ambas proteínas para comprobar su efecto en el bucle de NANOG, diseñamos dos *siRNA*, uno frente a CHAF1B y otro frente a PRMT1. Los *siRNA* fueron transfectados y su efecto se comprobó 48 horas después, tanto en células en condiciones basales como en células tratadas con RA 48 horas. Para comprobar el silenciamiento correcto de ambas proteínas, se hizo un *western blot* de control (**figura RII.18**). En ambos casos el nivel de silenciamiento resultaba satisfactorio.



Una vez comprobado el nivel de silenciamiento, decidimos hacer experimentos de 3C silenciando además CHAF1B o PRMT1 (en condiciones basales y de tratamiento con RA 48 horas). Se observa que, cuando silenciamos CHAF1B (**figura RII.19 A**), perdemos los picos de interacción del bucle que obteníamos en células no silenciadas. Cuando la proteína silenciada es PRMT1, también se pierde el aumento de interacción por RA en casi todos los puntos (**figura RII.19 B**). Este resultado indicaría que, tanto CHAF1B como PRMT1 son necesarias para la formación del bucle de cromatina que aparece cuando diferenciamos las células con RA.





Figura RII.19:

Además, debido a la implicación que tiene PRMT1 en metilación, decidimos también comprobar los patrones de metilación de H3K4, H3K9 y H3K27 cuando silenciamos PRMT1 con el *siRNA*. Nuevamente, las condiciones del experimento serían basales o con tratamiento de RA 48 horas. En el caso de H3K4 (**figura RII.20 A**) se observa que el silenciamiento de PRMT1 cambia por completo el patrón de unión en el ChIP, perdiéndose el aumento que aparecía en el tratamiento de RA. Cuando analizamos H3K9, el aumento de unión que se observaba en las células diferenciadas nuevamente se ve atenuado por el silenciamiento de PRMT1, mientras que en la condición basal sólo varía levemente (**figura RII20 B**). Por último, si analizamos la marca H3K27, el *siRNA* de PRMT1 produce un efecto significativo en condiciones basales, en las cuales el perfil de unión disminuye. En condiciones de diferenciación, también encontramos diferencias, principalmente en los tres primeros puntos, en los que la unión es menor (**figura RII20 C**). Por tanto, el silenciamiento de PRMT1 estaría modificando los patrones de metilación de histonas en el mapeo de todas las marcas analizadas.



Figura RII.19:

En último lugar, para ver la posible cooperación entre PRMT1 y AhR, decidimos hacer ChIPs convencionales y reChIPs en diferentes condiciones. Por un lado, hicimos un ChIP para AhR en células silenciadas con el *siRNA* de PRMT1. Por otro lado, hicimos otro ChIP para PRMT1 en la línea celular NTERA-2 *shAhR* (ausencia de AhR). Además de ello, llevamos a cabo un reChIP, primero con AhR y, secuencialmente, con PRMT1 (**figura RII.20**). Tras las inmunoprecipitaciones, se observa que, al utilizar los *primers* del experimento del enChIP-Cas9 (que se unían a las regiones de los elementos Alu x45s y x14s), obtenemos un alto nivel de unión de AhR y PRMT1 a la cromatina en el reChIP. Además, si eliminamos cualquiera de las dos proteínas de la célula, el nivel de unión es nulo, cayendo a niveles tan bajos como los de ambos controles negativos (condición sin anticuerpo en el ChIP y condición de GAPDH en el reChIP). Por tanto, parece claro que AhR y PRMT1 se están reclutando al mismo tiempo a la región del bucle en condiciones de diferenciación por ácido retinoico.

Figura RII.20:

12. Estudio de la estructura de los nucleosomas.

En el último apartado de este capítulo, queríamos analizar con detalle las posibles modificaciones en la estructura de los nucleosomas, debido a los datos obtenidos en los puntos anteriores. Además, estaba publicado que la proteína CHAF1B, diana positiva del análisis de proteómica de nuestro estudio, era un elemento necesario en la formación de nucleosomas. El experimento planteado para abordar este análisis se basaba en la enzima nucleasa micrococal (MNAse, Micrococcal Nuclease). Esta enzima es una endo-exonucleasa no específica derivada de *Staphylococcus aureus* que digiere el DNA en las regiones en que no está protegido por los nucleosomas. De esta forma, es posible comparar las regiones de DNA que quedan libres entre las diferentes condiciones experimentales.

Inicialmente, se hizo una extracción de DNA de células N-TERA2 en condiciones basales y en condiciones de diferenciación con RA 48 horas para, posteriormente, digerirlo con la MNAse a distintos tiempos y concentraciones. El DNA resultante de esas digestiones fue separado en un gel de agarosa en una electroforesis horizontal. Como podemos ver en la **figura RII.21 A**, el patrón de bandas entre ambas condiciones resultaba diferente, lo cual indicaría que la organización nucleosomal cambia con la diferenciación celular. A continuación, decidimos cortar las bandas diferenciales y secuenciarlas. En la tabla de la figura **RII.21 B** se muestra el listado de identidades de secuencias encontradas (en porcentaje), así como el número de apariciones en la secuenciación.

WT Basal				WT RA48h			
A	10 211	CII	ND	211 (11	Sequence	% Identities	N° of Times
ND	10 30	60	ND	30 60	POU4F1 (BRN3A)	100 %	4
	and the second second	The second second		and the second	TBC1D3	100%	4
	1.1.				Endothelin B	100%	4
		1	and the second		Ataxin-7 like protein	96%	1
					COUP-TFII (NR2F2)	95%	3
			- Inter		SOX-9	93%	1
	ini ini			and in the second	Cadherin 13	93%	1
					Arginine N- Methyltransferase	92%	1
					Alpha-Amylase 1 prec	92%	1
					INSL6 prec	89%	1
Pro in		The state of		The second second	Teneurin-3 (TENM3)	86%	1
					Cullin 2 Isoform X1	79%	1

Figura RII.21:

El siguiente paso consistió en validar si las dianas obtenidas en la secuenciación variaban realmente en condiciones de diferenciación. Para ello, decidimos comprobar

los niveles de expresión de los genes secuenciados en las diferentes condiciones experimentales, mediante la extracción de RNA de las células N-TERA2 y su posterior retro-transcripción a cDNA utilizando una enzima transcriptasa reversa. Finalmente, analizamos esos niveles de expresión mediante qPCR.

Hay un primer grupo de genes que disminuyen su nivel de expresión cuando la célula se diferencia, POU4F1, EDNRB, COUPTFII y SOX9 (figura RII.22). Además, cuando hacemos el experimento en la línea shAhR, los niveles de expresión siguen siendo muy bajos, excepto en el caso de SOX9, en el cual se mantienen similares al estado basal. Por otro lado, los genes PRMT6, INSL6, CDH13 y TENM3 aumentan su nivel de expresión con RA 48 horas. En este caso, en la línea shAhR se atenúa esta expresión en los dos primeros, siendo CDH13 el único que presenta mayores niveles que la línea wild type. Por tanto, en estos genes parece claro que la presencia de AhR es necesaria para su regulación. El caso de TENM3 es particular, ya que, a pesar de variar con la diferenciación, la ausencia de AhR no afecta en absoluto a sus niveles de expresión. En cambio, en los genes restantes, que serían ATXN7, CUL2, TBC1D3 y AMY1A, no hay una variación significativa entre las células en condiciones basales frente a las diferenciadas por ácido retinoico. Curiosamente, en estos dos últimos sí encontramos un nivel de expresión diferente cuando el ensayo se realiza en la línea shAhR, con lo cual parece que, a pesar de que la diferenciación no les afecte, sí que estarían regulados directa o indirectamente por AhR. ATXN7 y CUL2, en cambio, no se ven afectados ni por AhR ni por la diferenciación, siendo los genes de comportamiento más neutros entre los analizados.















Figura RII.22:

Conclusiones (capítulo I)

- Se han identificado y caracterizado tres nuevas subfamilia de retrotransposones Alu en el genoma humano. Se han denominado Ax14s, Ax36s y Ax45s, y tienen como característica principal la presencia de un sitio de unión a AhR (XRE) y uno de unión a SLUG/SNAIL separados por una secuencia conservada de 14, 36 o 45 pb, respectivamente.
- Los elementos Alu presentes en los genes implicados en diferenciación OCT4 y NANOG controlan en nivel de expresión de los mismos gracias a la unión de AhR al sitio XRE presente en estos retrotransposones.
- Los retrotransposones Ax14s, Ax36s y Ax45s poseen una actividad *insulator in vitro*, exhibiendo capacidad de bloqueo de *enhancer* y de barrera de heterocromatina.
- 4. La unión de AhR a los retrotransposones Alu presentes en NANOG establece modificaciones en la estructura tridimensional de la cromatina mediante la formación de un bucle de DNA, así como modificaciones en los patrones de metilación de OCT4 y NANOG.

Objetivos (capítulo II)

- 1. Analizar el efecto de los retrotransposones en células germinales utilizando como modelo *in vivo* ratones AhR+/+ y AhR-/-.
- 2. Definir si la maquinaria encargada de procesar los retrotransposones tiene efectos en la viabilidad espermática de ratones AhR+/+ y AhR-/-.
- 3. Comprobar el funcionamiento de las proteínas asociadas a piRNAs y de los retrotransposones en testículos, ovarios y oocitos de ratones AhR+/+ y AhR-/-.

Resultados (Capítulo II)

1. Análisis de testículos de ratón AhR+/+ y AhR-/-.

En primer lugar, decidimos realizar un análisis comparativo histológico y morfológico de los testículos de ratones AhR+/+ y AhR-/-. Para ello, se extrajeron testículos de ratones jóvenes (25 días) de los cuales se hicieron secciones histológicas para, posteriormente, teñirlas con hematoxilina-eosina (**figura RIII.1A**). Como podemos observar, no se aprecian diferencias significativas en la forma o el tamaño de los túbulos seminíferos. Además, cuando comparamos tanto el peso (**figura RIII.1B**) como el tamaño (**figura RIII.1C**) tampoco se aprecian grandes diferencias según el genotipo.



Figura RIII.1: AhR se expresa en testículos de ratón y no influye significativamente en el tamaño o peso de los mismos. (A) Tinción de hematoxilina-eosina de secciones de testículo. (B) Comparativa del peso testicular entre AhR+/+ y AhR-/-. (C) El tamaño de los testículos fue calculado utilizando la fórmula [largo x ancho² x 0,4).

El posterior análisis mediante inmunohistofluorescencia reveló que la expresión de AhR en los túbulos seminíferos de ratones AhR+/+ estaba ampliamente restringida a las capas internas celulares en edades entre 10 y 12 días, cambiando el patrón hacia una localización más generalizada a los 14 días post-parto (**figura RIII.2**). De manera opuesta, los testículos de ratones *AhR-/-* no presentaron nivel detectable alguno AhR.



Figura RIII.2: Análisis de inmunofluorescencia de la expresión de AhR en testículos de ratones AhR+/+ y AhR-/- de 10, 12 y 14 días post-parto. Las flechas marcan la presencia de AhR (fluorescencia roja) en los túbulos seminíferos. Como control negativo del experimento se utilizaron testículos de ratones AhR-/-. Los núcleos aparecen teñidos en azul con DAPI. Los recuadros muestran detalles de las imágenes. Al menos 4 ratones individuales de cada genotipo fueron utilizados para el experimento.

Una vez conocido el patrón de expresión de AhR, así como su localización en el tejido, decidimos analizar si la ausencia de AhR modificaba la distribución de MVH, Mili y Miwi en los túbulos seminíferos. En testículos *wild-type*, MVH presentaba expresión casi exclusivamente en el compartimento basal de los túbulos seminíferos en espermatogonias hasta el día 12 post-parto. En cambio, a los 14 días, aparece también la expresión de MVH en los espermatocitos (**figura RIII.3 superior**). Cuando observamos los testículos de ratones *knock-out*, la expresión de MVH se localiza de forma notoria en la capa exterior de las espermatogonias basales a los 8 días post-parto. En cambio, a la edad de 10 días ya se puede observar cómo MVH se tiñe también en los espermatocitos, tendencia que se mantiene hasta los 14 días post-parto (**figura RIII.3 inferior**).



Figura RIII.3: La falta de AhR parece acelerar el patrón temporal de expresión de MVH. Se extrajeron testículos de AhR+/+ y AhR-/- a 8, 10, 12 y 14 días post-parto para su posterior análisis inmunohistoquímico. Las secciones de testículo se tiñeron con un anticuerpo específico frente a MVH. Las flechas indican la expresión de la proteína. Los núcleos celulares fueron teñidos con DAPI. Para el experimento se utilizaron al menos ratones individuales de cada genotipo, analizando además diferentes secciones histológicas de cada uno de ellos.

La tinción posterior con el anticuerpo de Mili resultó ser menor tanto en intensidad como en número de células. A pesar de ello, nuevamente se puede observar que, al igual que con MVH, destaca su presencia en la capa de espermatogonias a 12 días post-parto, y en la región de los espermatocitos a 14 días en los testículos AhR+/+ (figura RIII.4 superior). En los testículos AhR-/-, la proteína Mili se localiza en el compartimento de los espermatocitos ya en el día 12 post-parto (figura RIII.4 inferior).



Figura RIII.4: La falta de AhR parece acelerar el patrón temporal de expresión de Mili. Se extrajeron testículos de AhR+/+ y AhR-/- a 8, 10, 12 y 14 días post-parto para su posterior análisis inmunohistoquímico. Las secciones de testículo se tiñeron con un anticuerpo específico frente a Mili. Las flechas indican la expresión de la proteína. Los núcleos celulares fueron teñidos con DAPI. Para el experimento se utilizaron al menos ratones individuales de cada genotipo, analizando además diferentes secciones histológicas de cada uno de ellos.

En último lugar analizamos la proteína Miwi. Se puede apreciar que, a 14 días post-parto, su presencia se localiza en el compartimento de los espermatocitos en ambos genotipos, siendo más abundante su nivel de expresión en AhR-/- frente a AhR+/+ (**figura RIII.5**). De esta forma, nuestros resultados sugerirían que una deficiencia en la expresión de AhR podría acelerar el perfil temporal de expresión de MVH, Mili y Miwi a lo largo del proceso de diferenciación de los testículos de ratón.



Figura RIII.5: La falta de AhR parece acelerar el patrón temporal de expresión de Miwi. Se extrajeron testículos de AhR+/+ y AhR-/- a 8, 10, 12 y 14 días post-parto para su posterior análisis inmunohistoquímico. Las secciones de testículo se tiñeron con un anticuerpo específico frente a Miwi. Las flechas indican la expresión de la proteína. Los núcleos celulares fueron teñidos con DAPI. Para el experimento se utilizaron al menos ratones individuales de cada genotipo, analizando además diferentes secciones histológicas de cada uno de ellos.

2. Expresión de retrotransposones en el nuage.

Se ha descrito que, de manera conjunta, el *nuage* y las proteínas asociadas a piRNAs regulan la producción de piRNAs, lo cual conduce al silenciamiento de transposones durante la maduración de células germinales. Debido a ello, decidimos estudiar si el patrón de expresión del *nuage* y las proteínas asociadas a piRNAs observado en *AhR-/-* correlacionaba con una alteración de la expresión de los retrotransposones. Para dilucidar esta posibilidad, combinamos la técnica de hibridación *in situ* para los retrotransposones B1-SINE (como una familia representativa de elementos repetitivos en testículos) con inmunofluorescencia para las proteínas MVH, Mili y Miwi.

En primer lugar clonamos una secuencia consenso para los retrotransposones B1-SINE, y a partir de ella se sintetizaron dos sondas, una sentido (SE) y otra antisentido (AS) (**figura RIII.6A**). La especificidad de la reacción de hibridación fue confirmada por la ausencia de señal en producida por la sonda SE en testículos de ratón de 12 días post-parto (**figura RIII.6B**).



Figura RIII.6: Síntesis de la sonda sentido (SE) y antisentido (AS) para la detección mediante hibridación *in situ* de los B1-SINE. (A) El retrotransposón B1-SINE fue clonado en el vector pGEM-T. Las sondas SE y AS se sintetizaron utilizando las RNA polimerasas SP6 y T7, respectivamente. (B) La especificidad de las sondas de hibridación fue confirmada mediante la ausencia de señal producida por la sonda SE en testículos de ratones *AhR*+/+ de 12 días de edad. Barra: 50 µm.

La hibridación *in situ* mostró que los testículos AhR+/+ expresaban transcritos de RNA no codificante derivados de los B1-SINE en la capa exterior de las espermatogonias en los túbulos seminíferos de ratones de 12 días post-parto. En cambio, a los 14 días esa expresión también se podía observar en el compartimento de los espermatocitos (**figura RIII.7**). Por el contrario, los túbulos seminíferos de los testículos AhR-/- ya presentaban expresión de transcritos derivados de los B1-SINE en la región de los espermatocitos a 12 días post-parto, la cual se trasladaba al compartimento de las espermatogonias a la edad de 14 días.



Figura RIII.7: Secciones de testículos de ratón AhR+/+ y AhR-/- obtenidas a 12 y 14 días postparto procesadas para hibridación *in situ*. El análisis de la expresión de los B1-SINE se realizó utilizando la sonda antisentido (AS).

combinando la hibridación El posterior análisis in situ la con inmunofluorescencia reveló que MVH se localizaba en las mismas células que expresaban los transcritos derivados de los B1-SINE, tanto en 12 como en 14 días postparto. Además, el patrón resultaba específico para cada genotipo (figura RIII.8A). Por su parte, el nivel de expresión de la proteína Mili se mostró inferior a MVH en testículos AhR+/+ y AhR-/-, lo cual no impidió que su patrón de expresión fuera coincidente con los retrotransposones B!-SINE (figura RIII.8B). En último lugar, únicamente se encontró expresión de Miwi a 14 días post-parto, con un patrón coincidente con los espermatocitos positivos para los B1-SINE en AhR+/+ y con las células positivas para los B1-SINE en la capa de espermatogonias en ratones AhR-/-(figura RIII.8.C).



Figura RIII.8: Combinación de la hibridación *in situ* de los B1-SINE con la inmunofluorescencia de las proteínas MVH (A), Mili (B) y Miwi (C) en secciones de testículo de

ratones AhR+/+ y AhR-/- a 12 y 14 días post-parto. La señal de la hibridación *in situ* se muestra en color negro para enfatizar la fluorescencia de MVH, Mili y Miwi. Al menos tres réplicas biológicas fueron usadas para cada experimento.

Este conjunto de datos indicaría que AhR participa de manera activa en el mecanismo de regulación de los niveles de expresión de retrotransposones y de proteínas asociadas a los piRNAs durante el proceso de espermatogénesis de ratón.

3. Análisis de las características y viabilidad espermática.

A continuación, decidimos estudiar si estos fenotipos producidos por la ausencia de AhR poseían además una relevancia funcional, considerando que fueron observados en ratones jóvenes fértiles. En primer lugar, se extrajeron los epidídimos de ratones jóvenes de edades comprendidas entre las 8 y 10 semanas con el objetivo de determinar su contenido en espermatozoides viables. Los resultados mostraron que los ratones *knock-out* para AhR presentaban de manera significativa un mayor número de espermatocitos viables que los ratones *wild-type* (figura RIII.9).



Figura RIII.9: Se obtuvieron los epidídimos de ratones entre 8 y 10 semanas de edad AhR+/+ y AhR-/-. El número de células espermáticas viables se midió en medio *Pure Sperm Wash*. Secciones representativas de testículos de ambos genotipos se tiñeron con hematoxilina-eosina.

Posteriormente, el análisis mediante citometría de flujo reveló que, dentro de la población de espermatozoides vivos con alto potencial de membrana mitocondrial

(figura RIII.10A), la actividad mitocondrial total era significativamente mayor en ratones AhR-/- frente a ratones AhR+/+ (figura RIII.10B y C).



Figura RIII.10: La integridad de la membrana y el potencial de membrana mitocondrial fueron analizados por citometría de flujo. (A) Citograma representativo mostrando tres poblaciones de espermatozoides muertos (a), espermatozoides vivos con un nivel bajo de potencial de membrana mitocondrial. (b) y espermatozoides vivos con alto nivel de potencial de membrana. (B) Comparativa entre el potencial de membrana mitocondrial de ratones AhR+/+ frente a ratones AhR-/-. (C) Normalización del potencial de membrana mitocondrial con respecto a los valores encontrados en ratones *wild-type*.

A continuación, se comprobó que la integridad de la membrana del esperma procedente de los epidídimos permanecía inalterable independientemente de la expresión de AhR (**figura RIII.11A**). Notablemente, el número de espermatozoides totales móviles (TM) y progresivamente móviles (PM) fue notoriamente superior en ratones *AhR-/-* frente a ratones *AhR+/+* (**figura RIII.12B**). Por último, la medida de los parámetros adicionales de motilidad espermática VCL (velocidad circular), VSL (velocidad en línea recta) y VAP (velocidad media) revelaron que los espermatozoides de ratones *knock-out* presentaban una mayor velocidad de movimiento que los ratones *wild-type* (**figura RIII.12C**).



Figura RIII.11: (A) Normalización de la medida de la integridad de membrana de espermatozoides en ambos genotipos. (B) Porcentaje de motilidad total (TM) y motilidad progresiva (PM) de espermatozoides normalizado con respecto a los valores encontrados en ratones AhR+/+. (C) Velocidad de los espermatozoides circular (VCL), en línea recta (VSL) y media (VAP) en ratones de ambos genotipos, medida en µm s⁻¹. La funcionalidad espermática fue analizada utilizando el *software* informático CASA (Computer-Assisted Sperm Analysis).

Para terminar de profundizar en el análisis espermático de los ratones, y, basándonos en los datos funcionales obtenidos hasta el momento, decidimos llevar a cabo experimentos de apareamiento de ratones AhR+/+ y AhR-/- machos con hembras ICR fértiles de 10 semanas de edad. Tras un primer análisis, no se encontraron diferencias significativas en el número de hembras ICR preñadas con machos tanto AhR+/+ como AhR-/- (figura RIII.12A). En cambio, sí pudimos observar que el número de embriones viables recuperados de hembras ICR preñadas a 18 días postcoito era significativamente más elevado si el apareamiento había tenido lugar con machos AhR-/- en lugar de machos AhR+/+ (figura RIII.12B). Por último, debido a la existente relación entre AhR y los procesos de esteroidogénesis en testículos de ratón, llevamos a cabo un experimento para analizar la actividad esteroidogénica en ratones de ambos genotipos, utilizando para ello el marcador SF-1 (steroidogenic factor 1) presente en el suero sanguíneo. Como podemos observar (figura RIII.12C), los niveles de SF-1 en sangre no son significativamente alterados por la ausencia de AhR, lo cual sugiere que la esteroidogénesis podría no tener un papel relevante en el aumento de la fertilidad encontrado en ratones AhR-/-.



Figura RIII.12: (A) Número de hembras ICR preñadas con machos AhR+/+ y AhR-/-. (B) Embriones viables recuperados a 18 días post-coito de hembras ICR apareadas con machos AhR+/+ y AhR-/-. (C) Análisis mediante el ensayo de ELISA de la presencia del marcador esteroidogénico SF-1 presente en el suero sanguíneo de ratones AhR+/+ y AhR-/-.

4. Análisis de ovarios de ratón AhR+/+ y AhR-/-.

Basándonos en los interesantes resultados obtenidos en el análisis de los testículos de ratón, decidimos investigar si la ausencia de AhR afectaba también a la expresión de transposones y de proteínas asociadas a los piRNAs en los ovarios. El análisis inmunohistoquímico inicial llevado a cabo en ovarios de hembras *wild-type* de 15 días de edad reveló que la expresión de AhR se localizaba casi de forma exclusiva en la zona periférica del oocito, muy cercana al folículo. En cambio, en hembras adultas AhR+/+, la expresión de AhR no sólo aparece rodeando a los oocitos, sino también en las capas de células granulosas que lo rodean (**figura RIII.13**). Como control negativo del experimento se utilizaron hembras AhR-/- de 15 días de edad, así como adultas, en las que no se observa expresión de la proteína AhR.



Figura RIII.13: Ovarios de hembras AhR+/+ y AhR-/- de 15 días post-parto y adultas procesados para inmunofluorescencia y teñidos con un anticuerpo frente a AhR. Los núcleos fueron marcados en color azul con DAPI. Las flechas indican la localización de la expresión de AhR.

A continuación, continuando con nuestro análisis comparativo entre ovarios AhR+/+ y AhR-/-, decidimos cuantificar el número de folículos pre-antrales (5 días post-parto) y antrales tempranos (15 días post-parto). Como podemos observar, la ausencia de AhR provoca una disminución significativa de ambos tipos de folículos (**figura RIII.14A y B**) cuando comparamos hembras *wild-type* frente a *knock-out*.



Figura RIII.14: Cuantificación del número de folículos en hembras AhR+/+ y AhR-/- de 5 (A) y 15 (B) días de edad.

Esta disminución del número de folículos también quedó corroborada tras una tinción con hematoxilina-eosina (**figura RIII.15A**) de secciones histológicas de ovarios AhR+/+ y AhR-/-. Además de ello, se realizó una extracción directa de folículos tanto del ovario (**figura RIII.15B**) como de la ámpula (**figura RIII.15C**) en hembras adultas de ambos genotipos. Nuevamente, en ambos casos el ratio es significativamente inferior en ausencia de AhR.



Figura RIII.15: (A) Tinción con hematoxilina-eosina de secciones histológicas de ovarios AhR+/+ y AhR-/- para analizar el número de folículos en cada genotipo. Ovocitos extraídos directamente del ovario (B) o de la ámpula del oviducto (C) en hembras de ratones de ambos genotipos. Se utilizaron al menos cinco réplicas biológicas por genotipo, por duplicado o triplicado.

Debido a que el sistema reproductor de las hembras también se ve expuesto a los efectos deletéreos de los retrotransposones, decidimos analizar el *nuage* y las proteínas asociadas a los piRNAs. Utilizando técnicas de inmunofluorescencia observamos que el número de folículos que expresan las proteínas del *nuage* MVH y Miwi en ovarios de hembras adultas es significativamente inferior en *AhR-/-* en comparación con *AhR+/+* (**figura RIII.16**). Por su parte, la expresión de Mili resultó ser indetectable en ovarios de cualquiera de los genotipos. De manera interesante, a pesar de este reducido número de folículos teñidos en ovarios *AhR-/-*, los niveles de expresión de MVH y Miwi en folículos individuales fueron similares en ambos genotipos, lo cual sugeriría que una formación deficiente de los folículos podría mantener unos niveles totales bajos de estas proteínas asociadas a piRNAs en el ovario.




Figura RIII.16: (A) Ovarios de hembras adultas AhR+/+ y AhR-/- procesados para la detección mediante inmunofluorescencia de MVH, Mili y Miwi. (B) Cuantificación del número de folículos positivos para cada ovario individual de cada uno de los genotipos.

Basándonos en los resultados anteriores de secciones histológicas de ovarios *wild-type* y *knock-out* para AhR, decidimos analizar la expresión de las tres proteínas del *nuage* MVH, Mili y Miwi en los diferentes estadios de la maduración oocitaria: folículo, vesícula germinal (GV) y meiosis II (MII). En primer lugar, cuando analizamos MVH observamos que su nivel de expresión en oocitos *AhR-/-* se mantiene bastante elevado en las 3 fases del desarrollo, incluyendo a las células foliculares del estadio de folículo (**figura RIII.17**). En cambio, en oocitos *AhR+/+*, la expresión de MVH es más reducida en folículos y en GV, llegando incluso a desaparecer en el estadio MII.



Figura RIII.17: Ovocitos extraídos en fase d folículo, vesícula germinal y MII. La expresión de MVH fue analizada por inmunofluorescencia untilizando un anticuerpo específco. Al menos 10 ratones de cada genotipo fueron utilizados para la extracción de los oocitos en los diferentes estadios.

El análisis de la proteína Mili mostró la casi total ausencia de expresión en oocitos AhR+/+ y AhR-/- en cualquiera de los estadios de maduración (**figura RIII.18**).



Figura RIII.18: Ovocitos extraídos en fase d folículo, vesícula germinal y MII. La expresión de Mili fue analizada por inmunofluorescencia untilizando un anticuerpo específco. Al menos 10 ratones de cada genotipo fueron utilizados para la extracción de los oocitos en los diferentes estadios.

Por último, decidimos estudiar también los niveles de expresión y localización de la proteína Miwi. A diferencia del caso anterior, en este caso la tinción resultó ser muy intensa en oocitos en estadio de folículo, GV y MII. Únicamente se aprecia una leve diferencia entre AhR+/+ y AhR-/- en la tinción del folículo, ya que las células foliculares del oocito *wild-type* presentan una intensidad algo mayor que las del oocito *knock-out* (**figura RIII.19**). Por el contrario, no se aprecian diferencias significativas entre genotipos en las fases de maduración de GV y MII, en las que el nivel de expresión se mantiene elevado de manera constante.



Figura RIII.19: Ovocitos extraídos en fase d folículo, vesícula germinal y MII. La expresión de Miwi fue analizada por inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo específico. Al menos 10 ratones de cada genotipo fueron utilizados para la extracción de los oocitos en los diferentes estadios.

Conclusiones (capítulo II)

- La expresión de AhR influye en el control de los piRNAs y de las proteínas asociadas a piRNAs presentes en testículos y ovarios de ratones, proceso que está relacionado con una expresión alterada de los retrotransposones.
- 2. La falta de AhR provoca un aumento de la expresión de retrotransposones, piRNAs y proteínas asociadas a piRNAs en testículo de ratón.
- 3. La des-regulación de este proceso produce una aceleración de la maduración espermática y un aumento en la capacidad de fertilidad de los ratones.
- 4. La ausencia de AhR impica una oogénesis ineficiente que se traduce en una reducción en el número de folículos viables en ovario de ratón.

Discusión

Originalmente, el receptor de dioxina (AHR) se descubrió debido a su capacidad de respuesta frente a efectos tóxicos y carcinogénicos provocados por xenobióticos (especialmente por dioxinas), por lo que los primeros estudios realizados fueron encaminados en este sentido (Poland et al., 1976; Okey et al., 1979; Poland and Knutson, 1982., Reyes et al., 1992). Sin embargo, una de las características que más llamaba la atención de los investigadores era que un receptor para las dioxinas, que son compuestos de reciente aparición en la biosfera, estuviese tan conservado evolutivamente en diferentes organismos. Debido a ello, se empezaron a realizar investigaciones en otras direcciones, centradas principalmente en su función como factor de transcripción relevante en multitud de procesos fisiológicos, sobre todo tras la aparición de ratones knock-out para AhR en los años 90 (Fernández-Salguero et al., 1995; Schmidt et al., 1996; Fernández-Salguero et al., 1997; González and Fernández-Salguero, 1998; Zaher et al., 1998; Abbot et al., 1999; Benedict et al., 2000; Lahvis et al., 2000; Thackelberry et al., 2002; Lund et al., 2003). Posteriormente, salieron a la luz nuevos trabajos que relacionaban AhR con procesos de ciclo celular y proliferación (Puga et al., 2002), procesos homeostáticos de diferentes órganos (Corchero et al., 2004; Lahvis et al., 2005; Harstad et al., 2006; Suzeau et al., 2011), migración y adhesión celular (Mimura et al., 1997, Carvajal-González et al., 2009; Rey-Barroso et al., 2014) y angiogénesis (Román et al., 2009; Choudhary et al., 2014). Todas estas nuevas implicaciones, así como el componente toxicológico del receptor, fueron recopiladas en una revisión por Pohjanvirta en 2012.

Con todo ello, todavía quedaba por salir a la luz la relación del receptor de dioxina con la regulación de la diferenciación celular, por lo que en los últimos cinco años se han realizado algunos trabajos al respecto. AHR ha sido descrito como un promotor (Hall et al., 2010; Wu et al., 2014) o un supresor de dicho proceso (Zhu et al., 2012; Yu et al., 2014; Ko et al., 2014., Morales-Hernández et al., 2016). Aun así, debido a que el número de estudios se antojaba todavía escaso, los mecanismos moleculares por los cuales AHR regula los procesos de diferenciación celular no se conocen en profundidad, motivo por el cual decidimos realizar el presente estudio.

Como modelo principal de estudio decidimos utilizar la línea celular N-TERA2D1, procedentes de carcinoma embrioide humano, debido a su capacidad de modificar su fenotipo indiferenciado hacia diferenciado en presencia de ácido retinoico (Paquet-Durand et al., 2003; Pewsey et al., 2009). Esta capacidad le otorga a la línea cierta semejanza con los procesos de diferenciación que ocurren en células madre, aunque en nuestro caso las N-TERA2 únicamente puedan diferenciarse a células neuronales. Por ello, son consideradas como un buen modelo alternativo de estudio. Además, se ha comprobado que AhR puede ser activado de manera indirecta a través del receptor de retinoides (RAR) (Soprano and Soprano, 2003; Jacob et al., 2011), el cual posee un papel importante en procesos de desarrollo y diferenciación celular (Hayashida et al., 2004; Bunaciu and Yen, 2011).

Un estudio previo de nuestro laboratorio, utilizando ratones como modelo de estudio, había revelado que AhR poseía la capacidad de unirse a elementos B1 a través del sitio de unión XRE presente en los mismos y que, más concretamente, este sitio estaba separado por 35 (B1x35s) pares de bases del sitio de unión de Slug/Snail en aproximadamente 1600 de estos elementos repetitivos (Román et al., 2008). Debido a ello, en nuestro trabajo hemos realizado un estudio bioinformático en el genoma humano analizando si los elementos Alu (equivalentes a los B1 de ratones) también poseían sitio de unión para XRE y si, además, había algún número específico de pares de bases de separación con el sitio SLUG/SNAIL. En nuestro caso, hallamos 3 elementos Alu relevantes que se repetían mucho más que el resto, a los cuales denominamos Ax14s, Ax36s y Ax45s. Más tarde, cuando realizamos un barrido de estos elementos Alu en los principales genes conocidos implicados en procesos de diferenciación y pluripotencia (NANOG, OCT4, SOX2, KLF4, SHH, WNT1, LIF y NOTCH1) descubrimos la presencia de varios Alu cercanos a los mismos, tanto flanqueándolos como dentro del propio gen. Este fue el motivo principal por el cual decidimos estudiar la posible relación de la unión de AHR a estos elementos Alu y su participación en la regulación de estos genes. Además pudimos comprobar que, cuando diferenciábamos las células, la expresión de AHR aumentaba a la vez que la de marcadores de des-diferenciación como NANOG y OCT4 disminuían, y que, en ausencia de AHR, esta bajada no se producía, lo cual nos indicaba que la relación entre AHR, NANOG y OCT4 debía ser estudiada. De hecho, varios trabajos ya apuntaban a

una colaboración directa entre NANOG y OCT4 en procesos de pluripotencia (Yuin-Han Loh et al., 2006; Liang et al., 2008; Marthaler et al., 2015; Olariu et al., 2016).

Nuestros experimentos de ChIP revelaron que, además de la unión de AHR a los Alu presentes en NANOG y OCT4, a estos transposones también se unían elementos relevantes en transcripción (RPC32 y RNA Pol II) y elementos importantes en la modificación de la estructura de la cromatina, como CTCF y PARP1. En todos los casos, el nivel de unión variaba según la célula estuviese en estado basal o diferenciado. Por este motivo, nos pareció interesante encaminar nuestro estudio hacia la vertiente de que AHR parecía estar regulando la expresión de estos genes a través de modificaciones en la arquitectura del DNA, y no a través del modelo clásico de activador/represor transcripcional directo. Se sabe que PARP1 está implicada en el mantenimiento de la estabilidad de la cromatina durante la división celular (Guetg et al., 2012), y que mediante procesos de parilación es capaz de modular que regiones de la cromatina que poseen locus silenciosos (silent rDNA regions) sean correctamente heredadas. Por su parte, CTCF es considerado como el tejedor maestro (master weaver) del genoma, va que posee la capacidad de bloquear la interacción entre un potenciador transcripcional (enhancer) y su promotor a través de la formación de una barrera física de cromatina (Bell et al., 1999). El papel de CTCF en la organización de la estructura nuclear es amplio, destacando la formación de bucles de DNA para controlar la accesibilidad de las RNA polimerasas a regiones reguladoras de genes (Phillips et al., 2009). Para este proceso, se sirve de la colaboración de proteínas estructurales como las cohesinas (Wendt et al., 2008; Parelho et al., 2008). La ausencia de una secuencia consenso de unión de CTCF nos hacía sospechar de la existencia de mecanismos adicionales encargados de controlar el reconocimiento de secuencias específicas de DNA por CTCF y, por tanto, de modificación de la arquitectura de la cromatina.

A este respecto, realizamos *Enhancer Blocking Assays* (EBAs) en los que comprobamos que los tres elementos (Ax14s, Ax36s y Ax45s) poseían una alta actividad *insulator* (aisladora), ocurriendo tanto en NANOG como en OCT4. Por tanto, conforme avanzaba nuestro estudio, las similitudes de comportamiento de nuestros Alu con otros elementos implicados en modificación de la cromatina eran evidentes. Decidimos, por tanto, explorar el campo de la metilación del DNA, ya que es una de las principales modificaciones directas de la cromatina. De esta manera, cuando mapeamos la región del genoma ocupada por NANOG (incluyendo sus regiones cercanas y sus

elementos Alu potencialmente reguladores), encontramos que distintas marcas de metilación como me3H3K4, me3H3K9 y me3H3K27 presentaban un patrón distinto en función de la diferenciación celular y que, además, este patrón cambiaba totalmente en casi todos los casos en ausencia de AHR, sugiriendo la implicación necesaria del receptor de dioxina en el proceso. Anteriormente, en un trabajo n células madre de ratones, se conocía que CTCF mediaba interacciones inter-cromosomales, de las cuales un 70% crean dominios en bucle que separan regiones con patrones opuestos de metilación de histonas (Handoko et al., 2011). Cabe destacar que, mientras que K4 es considerada una marca de activación por aparecer enriquecida en promotores transcripcionalmente activos, tanto K9 como K27 son consideradas marcas de represión, la primera por encontrarse en genes reprimidos constitutivamente y la segunda por su aparición en la formación de regiones de heterocromatina. Por lo tanto, nuestro trabajo sugiere que AHR podría modular la expresión génica de NANOG y OCT4 a través del establecimiento de patrones específicos de metilación de cromatina.

Estos interesantes datos nos llevaron a querer seguir profundizando en los mecanismos que intervenían en la modificación de la estructura y organización de la cromatina. Debido a la gran extensión que estaba cobrando el estudio, decidimos centrarnos en el gen NANOG, con el objetivo de mapear su estructura tridimensional, así como una amplia región circundante (un total de 88 kilobases). Para ello, decidimos utilizar la técnica de 3C (Chromosome Conformation Capture). Desde su aparición (Dekker et al., 2005), esta metodología nos permite explorar la organización genómica en una escala desde unas pocas decenas hasta cientos de kilobases (Hagège et al., 2007). La comprensión de los mecanismos de plegamiento del DNA resulta esencial en mamíferos, ya que el genoma se encuentra plagado de elementos reguladores tales como enhancers, insulators, y boundaries. El 3C, además, ha sido utilizado ya en diversos trabajos como método fiable para mapear la estructura tridimensional de la cromatina (Pink et al., 2010; Tena et al., 2011; Gómez-Marín et al., 2015). En nuestro estudio, hemos comprobado cómo la región de NANOG posee una configuración tridimensional en estado basal en la cual los elementos Ax45s y Ax14s que lo flanquean están alejados entre sí. En cambio, cuando la célula inicia un proceso de diferenciación por ácido retinoico, ambos elementos Alu se acercan notoriamente, sugiriendo la formación de un nuevo bucle de cromatina que contendría en su interior al gen NANOG. Adicionalmente, la formación de este nuevo bucle se pierde cuando utilizamos la línea celular N-TERA2-shAHR (ausencia de AHR), lo cual indicaría que el receptor de dioxina es necesario para la formación de dicho bucle. Concretamente, en estado basal, AHR estaría unido al sitio XRE del Ax14s únicamente, y, cuando diferenciamos la célula, se despegaría de ese Alu y se uniría al sitio XRE del Ax45s. A continuación podemos observar un esquema de esta interacción (figura **D.1**.).



Una vez establecida la idea de la formación del bucle en la región de NANOG en condiciones de diferenciación por ácido retinoico, debido a la proximidad física resultante entre los elementos Ax45s y Ax14s, decidimos intentar capturar el complejo de proteínas que estuviese unido al bucle en ese momento. Para ello, utilizamos una novedosa metodología basada en CRISPR-Cas9 denominada enChIP-dCas9 (Fujita et al., 2013). A diferencia de la técnica de CRISPR-Cas9 convencional (Jinek et al., 2012), el enChIP se basa en unir una enzima Cas9 catalíticamente inactiva a la zona objetivo del DNA, para, posteriormente, inmunoprecipitar la cromatina y las proteínas unidas al complejo, pudiendo purificar éstas últimas. En nuestro caso, el análisis posterior de proteómica mediante espectrometría de masas reveló un interesante número de proteínas unidas al bucle de NANOG, entre las cuales destacamos CHAF1B (implicada en el ensamblaje de la cromatina tras la replicación), PRMT1 (participa de forma activa en la metilación de la histona H4), DDX5 (helicasa de RNA implicada en proliferación y diferenciación celular), KSRP (activador de la expresión de C-MYC en células no diferenciadas) y LAMIN A/C (implicada en la reparación del DNA y en el control de la estabilidad del genoma). Como podemos observar, todas ellas presentan un papel importante en la remodelación de la estructura de la cromatina, lo cual apoyaría aún más el nuevo papel en el mantenimiento de la arquitectura del DNA que tienen AHR y los elementos Alu. Adicionalmente, pudimos comprobar que el silenciamiento de CHAF1B anularía la formación del bucle de cromatina de NANOG, lo cual sugiere su necesaria participación en el complejo. Por su parte, el silenciamiento de PRMT1 provoca un cambio total en los patrones de metilación de H3K4, H3K9 y H3K27, lo cual indicaría una acción conjunta de estas nuevas proteínas secuenciadas con AHR en el mantenimiento estructural de esta región de DNA.

Por otro lado, debido a las similitudes de comportamiento como elementos *insulator* entre nuestros elementos Alu y CTCF, y sabiendo que éste último tiene la capacidad de conferir protección contra los efectos de posicionamiento de cromosomas en ratones transgénicos, probablemente en colaboración con otros factores (Furlan-Margaril et al., 2011), así como el posicionamiento de nucleosomas (Kanduri et al., 2002; Fu et al., 2008; Teif et al., 2014) nos parecía interesante conocer posibles cambios en la estructura de los nucleosomas durante la diferenciación celular. Gracias al método de digestión del DNA mediante la nucleasa micrococal, pudimos comprobar que el patrón nucleosomal era diferente al comparar células en estado basal con células diferenciadas por ácido retinoico. Además, cuando secuenciamos los fragmentos de DNA resultantes de la digestión, hallamos un interesante grupo de proteínas compuesto por POU4F1, EDNRB, COUPTFII, SOX9, ATXN7, PRMT6, INSL6, CDH13, TBC1D3, AMY1A, CUL2 y TENM3. Todas estas proteínas están relacionadas de alguna manera con procesos de diferenciación y proliferación celular, metilación de cromatina o mantenimiento de la estabilidad genómica, incluso algunas de ellas

pertenecen a la misma familia de otras proteínas ya estudiadas en este trabajo (POUF4 a la familia de OCT4, SOX9 a la familia de SOX2 y PRMT6 a la familia de PRMT1). Incluso, en todas ellas (exceptuando CUL2 y TENM3), la ausencia de AHR modifica notablemente los patrones de expresión de estas proteínas, indicándonos nuevamente que el receptor de dioxina tendría un papel activo en la regulación de las mismas. Como hemos comprobado, el complejo de proteínas y elementos reguladores que intervienen en la regulación de la expresión de NANOG es casi inabarcable, como confirman nuestros resultados de proteómica y de secuenciación de DNA. A continuación resumimos de forma esquemática el conjunto de actores que intervienen en dicha regulación (figura **D.2.**).



AhR represses the expresion of NANOG through structural chromatin modifications

Figura D.2.

Gametogénesis.

Las proteínas Piwi fueron identificadas inicialmente en la línea germinal de Drosophila como un esencial intermediario molecular en el mantenimiento del proceso de diferenciación de células germinales presentes en ovarios y testículos. Estas proteínas se unen a pequeños piRNAs, los cuales son molecularmente diferentes a miRNAs y siRNAs. De hecho, se ha descrito cómo el complejo molecular que forman las proteínas Piwi y los piRNAs posee un papel fundamental en el silenciamiento de transposones durante el desarrollo de la línea germinal, con el objetivo de asegurar la integridad genómica y la estabilidad de espermatocitos y oocitos (Aravin et al. 2006; Brennecke et al. 2007; Yin and Lin 2007; Khurana and Theurkauf 2010; Le Thomas et al. 2013). Posteriormente, gracias al uso de ratones modificados genéticamente, se han encontrado homólogos de estas proteínas Piwi de Drosophila que comparten esta función crítica del metabolismo de los piRNAs y el silenciamiento de transposones en la línea germinal de mamíferos (Lin 2007; Peters and Meister 2007; Siomi and Kuramochi-Miyagawa 2009). Así, las proteínas Mili, Miwi y Miwi2 son necesarias en el proceso de espermatogénesis en ratón y, como consecuencia, la ausencia de Mili y de Miwi2 en ratones machos provoca infertilidad, además de aumentar los niveles de expresión de los retrotransposones en la línea germinal (Deng and Lin 2002; Kuramochi-Miyagawa et al. 2004; Carmell et al. 2007).

AhR posee efectos pleiotrópicos en la maduración de los sistemas reproductores de ratones machos y hembras, contribuyendo al desarrollo embrionario y post-natal, así como a una adecuada función fisiológica y comportamental (Karman 2012). Diversos estudios llevados a cabo en hembras de ratón indican que, de manera consistente, la ausencia total de AhR provoca un desarrollo deficiente del ovario y una alteración de la señalización hormonal y neuroendocrina, lo cual se traduce en una disfunción ovárica seguida de infertilidad ((Baba et al. 2005) y revisado en (Karman 2012)). En cambio, el papel de AhR en el sistema reproductor de ratones machos está mucho menos definido. Mientras que ratones *AhR-/-* de avanzada edad poseen un bajo número de espermatozoides en el epidídimo y una regresión de la vesícula seminal (Baba et al. 2008), ratones adultos (entre 8 y 12 semanas de edad) *AhR-/-* no presentaban diferencia en la producción diaria de esperma en testículo (Lin et al. 2001), ni tampoco un incremento en el número de espermátidas elongadas retenidas (Hansen et al. 2014). Además, se ha descrito también que AhR participa en la regulación de la expresión de

retrotransposones (Roman et al. 2008; Roman et al. 2011a; Roman et al. 2011b), cuya actividad debe ser bloqueada por el sistema de los piRNAs para permitir la maduración de células germinales de ratones machos y hembras. Basándonos en estos trabajos previos, hemos manejado la hipótesis de la existencia de un vínculo potencial entre el nivel de expresión de AhR y sus efectos sobre la transcripción de retrotransposones, proteínas asociadas a piRNAs y la maduración de las células germinales en ratones jóvenes de ambos géneros. Gracias a nuestro estudio hemos podido concluir que la ausencia de AhR posee efectos diferenciales en la interacción funcional entre la expresión de transposones, las proteínas asociadas a piRNAs y los piRNAs en testículos y ovarios, de tal manera que esas interacciones específicas de cada órgano pueden tener una influencia positiva o negativa en la fertilidad de ratones *AhR-/-* machos y hembras, respectivamente.

La implicación de AhR en el mecanismo de los piRNAs/proteínas asociadas a piRNAs que controlan la expresión de transposones en testículos fue apoyada en primer lugar por el patrón de la expresión del receptor en ratones machos jóvenes. Los niveles de la proteína AhR fueron elevados desde leptoteno (10 días post-parto) hasta paquiteno (14 días post-parto), una ventana de tiempo en la cual se concentra la mayoría de la actividad de los transpsones y en la que, además, los piRNAs de pre-paquiteno y paquiteno son fabricados para bloquear los efectos de los transposones (Aravin et al. 2006; Aravin and Hannon 2008; Li et al. 2013). AhR posee una actividad represora sobre el control de la expresión de transposones en estas fases críticas del desarrollo de las células germinales en ratones macho debido a una representación elevada de familias de retrotransposones de ratón que están bien conservadas evolutivamente los testículos de ratones AhR-/- durante las fases de pre-paquiteno y paquiteno, entre los cuales destacan los miembros de la familia B1-SINE conocidos por ser regulados por este receptor (Roman et al. 2008; Roman et al. 2011a; Roman et al. 2011b). De manera consistente, las cantidades de piRNAs expresados en los testículos durante estas fases del desarrollo fueron también más elevadas en ratones AhR-/- frente a ratones AhR+/+. Estos resultados sugieren que, en testículos de ratones *wild-type* que expresan AhR, los niveles basales de expresión de transposones son contrarrestados por las cantidades basales de piRNAs. Por el contrario, en ratones AhR-/-, la des-represión de transposones puede activar la síntesis de cantidades más elevadas de piRNAs cuya función sería bloquear sus efectos deletéreos durante el desarrollo. Nuestros datos sugieren, por tanto,

que el nivel de expresión de los transposones podría tener un papel causal y/o influencia sobre la manera en la que los piRNAs son producidos durante la maduración normal de los testículos.

La expresión de la proteína MVH aparece en ratones desde los 10,5 días postparto hasta el estadio de espermátida (Toyooka et al. 2000) y, junto con las proteínas específicas de células germinales Mili, Miwi y Miwi2, está implicada en las primeras fases del silenciamiento de transposones a través de la amplificación de piRNAs durante la maduración de espermatocitos y oocitos (Deng and Lin 2002; Kuramochi-Miyagawa et al. 2004; Carmell et al. 2007; Lim et al. 2013). MVH y Miwi (pero no Mili), aparecieron sobre-expresados en la fase de pre-paquiteno de los espermatocitos de testículos de ratones adultos AhR-/-, lo cual apoyaría la implicación de AhR en el control de la maquinaria dependiente de piRNAs durante el proceso de espermatogénesis. Curiosamente, MVH y Miwi presentaron una distribución inusual en los túbulos seminíferos en ausencia de AhR. Mientras que MVH y Miwi se localizaban en las capas externas de las células que contienen las espermatogonias en testículos AhR+/+ en leptoteno y pre-paquiteno, ambas proteínas se expresaban principalmente en el compartimento interior de espermatocitos diferenciados en los túbulos AhR-/-, sugiriendo que la ausencia de AhR podría anticipar, e incluso acelerar, el mecanismo dependiente de los piRNAs que contribuye a la maduración de células germinales en testículo. Este patrón temprano de proteínas asociadas a piRNAs en testículos de ratones AhR-/- es de hecho coincidente con los niveles mayores de expresión de retrotransposones. Notablemente, MVH, Mili y Miwi co-expresaban y co-localizaban con los transcritos de los retrotransposones B1-SINE regulados por AhR en la capa de células que contiene las espermatogonias en ratones AhR+/+, y en la capa de espermatocitos de los túbulos seminíferos en ratones AhR-/-. El presente trabajo propone que podría ayudar en el mantenimiento del equilibrio entre la transcripción de transposones, piRNAs y proteínas asociadas a piRNAs en testículos, y que, además, la ausencia de AhR afectaría a la expresión y localización de los transcritos derivados de retrotransposones y de las proteínas asociadas a piRNAs.

Las proteínas del *nuage* son esenciales para la fertilidad de ratones machos, debido a que mutaciones en sus genes codificantes provocan una pérdida de función que desemboca en la des-regulación de la espermatogénesis (Pillai and Chuma 2012). De manera opuesta al bajo número de espermatozoides descritos en ratones de avanzada edad (Baba et al. 2008) o al contenido normal en ratones adultos (Lin et al. 2001) AhR-/-, hemos encontrado que ratones jóvenes AhR-/- produjeron un número mayor de células espermáticas con una mayor actividad mitocondrial y una motilidad mejorada con respecto a ratones AhR+/+. Esta aparente mejora de la calidad espermática de los ratones AhR-/- fue consistente con la mayor capacidad de fertilidad observada en los apareamientos con hembras ICR. Un estudio previó demostraba que los ratones knockout C57BL/6-Ahr^{m1.2Arte} presentaban una acumulación de espermátidas elongadas y una fertilidad reducida en experimentos de fecundación in vitro (Hansen et al. 2014). Esta diferencia podría explicarse por el hecho de que los ensayos in vivo realizados en nuestro trabajo pueden suponer una mejor aproximación fisiológica para determinar las diferencias en la capacidad de fertilidad en ratones, debido al propio proceso de apareamiento y a las diferentes moléculas que acompañan a los espermatocitos durante la fecundación (Michaelis et al. 2013; Langhammer et al. 2014). Adicionalmente, en ese estudio previo se utilizaron como controles wild-type ratones C57BL/6JAhr^{b-1}, y su diferencia en el background genético con respecto a la cepa C57BL/6-Ahr^{m1.2Arte} de ratones AhR-/- podría haber influenciado en los fenotipos encontrados in vitro. Estudios recientes, a través de diferentes estrategias moleculares y fisiológicas, han puesto de manifiesto la existencia de fenotipos con alta capacidad fértil que podrían atribuirse a alteraciones endocrinas (niveles hormonales, por ejemplo la testosterona), fisiológicas (pubertad acelerada) y comportamentales (Michaelis et al. 2013; Langhammer et al. 2014). Por tanto, en nuestro trabajo sugerimos que la fertilidad de ratones machos AhR-/- podría depender de la funcionalidad mejorada de los espermatozoides, así como de las ventajas endocrinas, fisiológicas y comportamentales otorgadas por la ausencia de AhR. Adicionalmente, una expresión programada temprana de piRNAs y proteínas asociadas a piRNAs podría otorgar una ventaja a los ratones AhR-/- en el desarrollo de células espermáticas más competentes.

Por otra parte, los efectos de AhR observados sobre la expresión de retrotransposones y proteínas asociadas a piRNAs en ovarios de ratones fueron opuestos a los encontrados en testículos. Así, la ausencia de AhR afectó severamente al correcto desarrollo folicular y redujo el número de oocitos presentes en el ovario y en el ámpula del oviducto. Estas observaciones concuerdan con estudios previos en los que se describía una reducción del potencial ovulatorio y, por tanto, una mayor infertilidad en hembras *AhR-/-* (Abbott et al. 1999; Baba et al. 2005; Hernandez-Ochoa et al. 2009).

Las proteínas del nuage MVH, Mili y Miwi poseen también un papel relevante en el silenciamiento de transposones en ovario, aunque su des-represión no parece comprometer su fertilidad (Shoji et al. 2009; Lim et al. 2013). Los ovarios de ratones AhR-/- poseen una expresión reducida de MVH, Mili y Miwi, así como menores niveles de expresión de transcritos derivados de retrotransposones en ratones post-natales y adultos. La disminución de los niveles totales de MVH y Miwi en ovarios de ratones AhR-/- podría deberse a la disminución significativa en el número de folículos que expresaban estas proteínas. Una posible explicación sería que en los folículos en los que AhR está ausente aparezca una deficiencia en el silenciamiento de los retrotransposones cuando la expresión de las proteínas asociadas a piRNAs se antoja insuficiente. Esta hipótesis estaría en parte apoyada por los estudios que muestran que una deficiencia en MVH causa una des-represión de los transposones en los folículos primordiales, a pesar de que, como hemos indicado antes, no causa un efecto directo sobre la fertilidad en las hembras (Lim et al. 2013). Por lo tanto, el papel de las proteínas asociadas a piRNAs resulta complejo. Los ensayos de maduración in vitro revelaron que MVH estaba presente en oocitos AhR+/+ en los estadíos de folículo y vesícula germinal, desapareciendo en la fase MII. En cambio, en hembras AhR-/-, la expresión de MVH se mantuvo muy elevada desde folículo hasta MII, estando presente incluso en las células foliculares que rodean al oocito. Esta persistencia en la expresión de MVH podría ser indicativa de una expresión prolongada a los efectos deletéreos de los retrotransposones, lo cual estaría afectando a la maduración folicular. Desafortunadamente, los niveles de transposones (por ejemplo los B1-SINE) no han podido ser determinados por hibridación in situ durante el proceso de maduración in vitro de los folículos. Con todos estos datos, en este estudio proponemos que la ausencia de AhR podría comprometer la fertilidad de hembras de ratón mediante la reducción del número de folículos viables a través de un mecanismo que envolvería la alteración del equilibrio entre los retrotransposones y las proteínas asociadas a piRNAs.

En resumen, en este trabajo demostramos que AhR posee una función específica en testículos y ovarios de ratones jóvenes posiblemente a través del control sobre los piRNAs, proteínas asociadas a piRNAs y la expresión de transposones. Consecuentemente, la ausencia de AhR en testículo aumenta la expresión de retrotransposones, piRNAs y proteínas asociadas a piRNAs durante la meiosis de las células germinales, posiblemente acelerando la maduración de los espermatocitos e incrementando su capacidad de fertilidad. En el ovario, la ausencia de AhR desemboca en un fenotipo totalmente opuesto, reduciendo la expresión de retrotransposones y de proteínas asociadas a piRNAs en fases del desarrollo tanto tempranas como tardías, provocando la disminución del número de folículos viables. A pesar de que el mecanismo por el cual AhR interviene en este *cross-talk* entre retrotransposones, piRNAs y proteínas asociadas a piRNAs es aún desconocido, nuestros datos sugieren la implicación de esta ruta de señalización en la maduración de células germinales de ambos géneros.

Conclusión final del estudio

En los últimos años, se ha puesto de manifiesto la importancia de AHR en diversos procesos fisiológicos, que incluyen el desarrollo, la migración, la proliferación y la diferenciación celular. Nuestro estudio propone que AHR controla el proceso de diferenciación celular a través de su unión a elementos Alu del genoma humano. Esta regulación la lleva a cabo de una manera completamente novedosa: modulando la arquitectura de la cromatina y a través de modificaciones en la estructura del DNA. En este trabajo se han descubierto nuevas proteínas implicadas en dicho proceso, y se ha puesto de manifiesto el mecanismo de actuación desconocido de otras anteriormente estudiadas.

Bibliografía

Abbott, B. D., L. S. Birnbaum and G. H. Perdew (1995). "Developmental expression of two members of a new class of transcription factors: I. Expression of aryl hydrocarbon receptor in the C57BL/6N mouse embryo." <u>Dev Dyn</u> **204**(2): 133-43.

Abbott, B. D., J. E. Schmid, J. A. Pitt, A. R. Buckalew, C. R. Wood, G. A. Held and J. J. Diliberto (1999). "Adverse reproductive outcomes in the transgenic Ah receptordeficient mouse." <u>Toxicol Appl Pharmacol</u> **155**(1): 62-70.

Abdelrahim, M., R. Smith, 3rd and S. Safe (2003). "Aryl hydrocarbon receptor gene silencing with small inhibitory RNA differentially modulates Ah-responsiveness in MCF-7 and HepG2 cancer cells." <u>Mol Pharmacol</u> **63**(6): 1373-81.

Abranches, E., A. M. Guedes, M. Moravec, H. Maamar, P. Svoboda, A. Raj and D. Henrique(2014). "Stochastic NANOG fluctuations allow mouse embryonic stem cells to explore pluripotency." <u>Development</u> **141**(14):2770-9.

Adeniyi-Jones, S. and M. Zasloff (1985). "Transcription, processing and nuclear transport of a B1 Alu RNA species complementary to an intron of the murine alpha-fetoprotein gene." <u>Nature</u> **317**: 81-84.

Ambrosetti, D.C., C. Basilico and L. Dailey (1997). "Synergistic activation of the fibroblast growth factor 4 enhancer by Sox2 and Oct-3 depends on protein–protein interactions facilitated by a specific spatial arrangement of factor binding sites." <u>Mol.</u> <u>Cell. Biol.</u> **17:** 6321–6329.

Ambrosetti, D.C., H.R. Schöler, L. Dailey and C. Basilico (2000). "Modulation of the activity of multiple transcriptional activation domains by the DNA binding domains mediates the synergistic action of Sox2 and Oct-3 on the fibroblast growth factor-4 enhancer." J. Biol. Chem. **275**: 23387–23397.

Amsterdam, A., C. Raanan, L. Schreiber, O. Freyhan, L. Schechtman and D. Givol (2013). "Localization of the stem cell markers LGR5 and Nanog in the normal and the cancerous human ovary and their inter-relationship." <u>Acta Histochem</u>. **115**(4):330-338. Andreasen, E. A., L. K. Mathew, C. V. Löhr, R. Hasson and R. L. Tanguay (2007). "Aryl hydrocarbon receptor activation impairs extracellular matrix remodeling during zebra fish fin regeneration." Toxicol Sci **95**(1):215-26.

Andreola, F., P. M. Fernández-Salguero, M. V. Chiantore, M. P. Petkovich, F. J. González and L. M. De Luca (1997). "Aryl hydrocarbon receptor knockout mice (AHR-/-) exhibit liver retinoid accumulation and reduced retinoic acid metabolism." <u>Cancer</u> <u>Res</u> **57**(14): 2835-2838.

Andreola, F., D. F. Calvisi, G. Elizondo, S. B. Jakowlew, J. Mariano, F. J. González and L. M. de Luca (2004). "Reversal of liver fibrosis in aryl hydrocarbon receptor null mice by dietary vitamin A depletion." <u>Hepatology</u> **39**(1): 157-166.

Adachi, J., Y. Mori, S. Matsui, H. Takigami, J. Fujino, H. Kitagawa, C. A. Miller 3rd, T. Kato, K. Saeki and T.Matsuda (2001). "Indirubin and indigo are potent aryl hydrocarbon receptor ligands present in human urine." J Biol Chem **276**(34): 31475-31478.

Alexander, D. L., L. G. Ganem, P. Fernández-Salguero, F. González and C. R. Jefcoate (1998). "Aryl-hydrocarbon receptor is an inhibitory regulator of lipid synthesis and of commitment to adipogenesis." <u>J Cell Sci</u> **111**(22): 3311-22.

Aravin, A., D. Gaidatzis, S. Pfeffer, M. Lagos-Quintana, P. Landgra, N. Iovino, P. Morris, Brownstein M. J., S. Kuramochi-Miyagawa, T. Nakano, M. Chien, J. J. Russo, J. Ju, R. Sheridan, C. Sander, M. Zavolan and T. Tuschl (2006) "A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes." <u>Nature</u> **442**: 203-207.

Baba, T., J. Mimura, N. Nakamura, N. Harada, M. Yamamoto, K. Morohashi and Y. Fujii-Kuriyama (2005). "Intrinsic function of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor as a key factor in female reproduction." <u>Mol Cell Biol</u> **25**(22): 10040-51.

Bachvarova, R. (1988). "Small B2 RNAs in mouse oocytes, embryos, and somatic tissues." <u>Dev. Biol.</u> **130**: 513-523.

Barouki, R., X. Coumoul and P. M. Fernandez-Salguero (2007). "The aryl hydrocarbon receptor, more than a xenobiotic-interacting protein." <u>FEBS Lett</u> **581**(19): 3608-15.

Barry, E. R., T. Morikawa, B. L. Butler, K. Shrestha, R. de la Rosa, K. S. Yan, C. S. Fuchs, S. T. Magness, R. Smits, S. Ogino, C. J. Kuo, F. D. Camargo (2013).

"Restriction of intestinal stem cell expansion and the regenerative response by YAP." <u>Nature</u> **493**(7430):106-10.

Bartel, D. P. (2004). "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function." <u>Cell</u> **116**: 281-297.

Batzer, M. A. and P.L. Deininger (2002). "Alu repeats and human genomic diversity." Nat. Rev. Genet. **35**: 501–538.

Beck, C. R., J. L. García-Pérez, R. M. Badge and J. V. Moran. "LINE-1 elements in structural variation and disease." <u>Annual review of genomics and human genetics</u> **12**: 187-215.

Belancio, V. P., D. J. Hedges, and P. Deininger (2008). "Mammalian non-LTR retrotransposons: For better or worse, in sickness and in health." <u>Genome Res</u>. **18**: 343–358.

Ben-Shushan, E., H. Sharir, E. Pikarsky and Y. Bergman (1995). "A dynamic balance between ARP-1/COUP-TFII, EAR-3/COUP-TFI, and retinoic acid receptor: retinoid X receptor heterodimers regulates Oct-3/4 expression in embryonal carcinoma cells." <u>Mol.</u> <u>Cell. Biol.</u> **15:** 1034–1048.

Benedict, J. C., T. M. Lin, I. K. Loeffler, R. E. Peterson and J. A. Flaws (2000). "Physiological role of the aryl hydrocarbon receptor in mouse ovary development." <u>Toxicol Sci</u> **56**(2): 382-8.

Beníšek, M., P. Kubincová, L. Bláha and K. Hilscherová (2011). "The effects of PAHs and N-PAHs on retinoid signaling and Oct-4 expression in vitro." <u>Toxicol Lett</u> **200**(3):169-75.

Berg, P. and I. Pongratz (2001). "Differential usage of nuclear export sequences regulates intracellular localization of the dioxin (aryl hydrocarbon) receptor." J Biol Chem **276**(46): 43231-8.

Bernshausen, T., B. Jux, C. Esser, J. Abel and E. Fritsche (2006). "Tissue distribution and function of the Aryl hydrocarbon receptor repressor (AhRR) in C57BL/6 and Aryl hydrocarbon receptor deficient mice." <u>Arch Toxicol</u> **80**(4): 206-11.

Bernstein, E., A. A. Caudy, S. M. Hammond and G. J. Hannon (2001). "Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference." <u>Nature</u> **409**: 363-366. Bhaskaran, M. and M. Mohan (2013). "MicroRNAs: History, Biogenesis, and Their Evolving Role in Animal Development and Disease." <u>Vet Pathol.</u> **51**(4):759-774. Blankenship, A. L., M. C. Suffia, F. Matsumura, K. J. Walsh and L. M. Wiley (1993). "2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) accelerates differentiation of murine

preimplantation embryos in vitro." Reprod Toxicol 7(3): 255-261.

Boiani, M., S. Eckardt, H. R. Scholer and K. J. McLaughlin (2002). "Oct4 distribution and level in mouse clones: consequences for pluripotency." <u>Genes Dev</u> 16:1209-1219. Bortolin-Cavaillé, M. L., M. Dance, M. Weber and J. Cavaillé (2009). "C19MC microRNAs are processed from introns of large Pol-II, non-protein-coding transcripts." <u>Nucleic Acids Res</u> 37(10):3464-73. Botquin, V., H. Hess, G. Fuhrmann and C. Anastassiadis, M.K. Gross, G. Vriend, H.R. Schöler (1998). "New POU dimer configuration mediates antagonistic control of an osteopontin preimplantation enhancer by Oct-4 and Sox-2." <u>Genes Dev.</u> **12**: 2073–2090. Boverhof, D. R., L. D. Burgoon, C. Tashiro, B. Chittim, J. R. Harkema, D. B. Jump and T. R. Zacharewski (2005). "Temporal and dose-dependent hepatic gene expression patterns in mice provide new insights into TCDD-Mediated hepatotoxicity." <u>Toxicol Sci</u> 85(2): 1048-1063. Brakebusch, C. and R. Fassler (2003). "The integrin-actin connection, an eternal love affair." <u>EMBO J</u> **22**(10): 2324-2333.

Boyer, L.A., T.I. Lee, M.F. Cole, S.E. Johnstone, S.S. Levine, J.P. Zucker, M.G. Guenther, R.M. Kumar, H.L. Murray, R.G. Jenner, D.K. Gifford, D.A. Melton, R. Jaenisch and R.A. Young (2005). "Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells." <u>Cell</u> **122**: 947–956.

Briscoe, J., A. Pierani, T. M. Jessell and J. Ericson (2000). "A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube." <u>Cell</u> **101**: 435-445.

Bunaciu, R. P. and A. Yen (2011). "A ctivation of the aryl hydrocarbon receptor AhR Promotes retinoic acid-induced differentiation of myeloblastic leukemia cells by restricting expression of the stem cell transcription factor Oct4." <u>Cancer Res</u> **71**(6):2371-80.

Carmell, M. A., A. Girard, H. J. van de Kant, D. Bourc'his, T. H. Bestor, D. G. de Rooij and G. J. Hannon (2007). "MIWI2 is essential for spermatogenesis and repression of transposons in the mouse male germline." <u>Dev. Cell</u> **12:** 503-514.

Carvajal-González, J. M., S. Mulero-Navarro, A. C. Román, V. Sauzeau, J. M. Merino, X. R. Bustelo and P. M. Fernández-Salguero (2009). "The dioxin receptor regulates the constitutive expression of the vav3 proto-oncogene and modulates cell shape and adhesion." <u>Mol Biol Cell</u> **20**(6): 1715-27.

Carver, L. A. and C. A. Bradfield (1997). "Ligand-dependent interaction of the aryl hydrocarbon receptor with a novel immunophilin homolog in vivo." J Biol Chem **272**(17): 11452-6.

Castelnuovo, M., S. Massone, R. Tasso, G. Fiorino, M. Gatti, M. Robello, E. Gatta, A. Berger, K. Strub, T. Florio, G. Dieci, R. Cancedda and A. Pagano (2010). "An Alu-like RNA promotes cell differentiation and reduces malignancy of human neuroblastoma cells." <u>FASEB J</u> **24**(10):4033-46.

Catena, R., C. Tiveron, A. Ronchi, S. Porta, A. Ferri, L. Tatangelo, M. Cavallaro, R. Favaro, S. Ottolenghi, R. Reinbold, H. Schöler and S.K. Nicolis (2004). "Conserved POU binding DNA sites in the Sox2 upstream enhancer regulate gene expression in embryonic and neural stem cells." J. Biol. Chem. **279**: 41846–41857.

Ceteci, F., S. Ceteci, E. Zanucco, C. Thakur, M. Becker, N. El-Nikhely, L. Fink, W. Seeger, R. Savai and U. R. Rapp (2012). "E-cadherin controls bronchiolar progenitor cells and onset of preneoplastic lesions in mice." <u>Neoplasia</u> **14**(12):1164-77.

Chambers, I., D. Colby, M. Robertson, J. Nichols, S. Lee, S. Tweedie and A. Smith (2003). "Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells." <u>Cell</u> **113**(5):643–655.

Chan, W. K., G. Yao, Y. Z. Gu and C. A. Bradfield (1999). "Cross-talk between the aryl hydrocarbon receptor and hypoxia inducible factor signaling pathways. Demonstration of competition and compensation." J Biol Chem **274**(17): 12115-23.

Chang, C. Y. and A. Puga (1998). "Constitutive activation of the aromatic hydrocarbon receptor." <u>Mol Cell Biol</u> **18**(1): 525-535.

Chaulk, S. G., V. J. Lattanzi, S. E. Hiemer, R. P. Fahlman and X. Varelas (2014). "The Hippo pathway effectors TAZ/YAP regulate dicer expression and microRNA biogenesis through Let-7." J Biol Chem **289**(4):1886-91.

Chen, Y.-H., J. Riby, P. Srivastava, J. Bartholomew, M. Denison and L. Bjeldanes (1995). "Regulation of CYP1A1 by Indolo[3,2-b]carbazole in Murine Hepatoma Cells." J. Biol. Chem. **270**(38): 22548-22555.

Chen, X., H. Xu, P. Yuan, F. Fang, M. Huss, V.B. Vega, E.Wong, Y.L. Orlov, W. Zhang, J. Jiang, Y.H. Loh, H.C. Yeo, Z.X. Yeo, V. Narang, K.R. Govindarajan, B. Leong, A. Shahab, Y. Ruan, G. Bourque, W.K. Sung, N.D. Clarke, C.L. Wei and H.H. Ng (2008). "Integration of external signaling pathways with the core transcriptional network in embryonic stem cells." <u>Cell</u> **133**: 1106–1117.

Chen, H., K. Matsumoto, B. L. Brockway, C. R. Rackley, J. Liang, J. H. Lee, D. Jiang, P. W. Noble, S. H. Randell, C. F. Kim and B. R. Stripp (2012). "Airway epithelial progenitors are region specific and show differential responses to bleomycin-induced lung injury." <u>Stem Cells</u> **30**:1948-1960.

Chew, J.L., Y.H. Loh, W. Zhang, X. Chen, W.L. Tam, L.S. Yeap, P. Li, Y.S. Ang, B. Lim, P. Robson and H.H. Ng (2005). "Reciprocal transcriptional regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 complex in embryonic stem cells." <u>Mol. Cell. Biol.</u> **25**: 6031–6046.

Chiou, S. H., C. C. Yu, C. Y. Huang, S. C. Lin, C. J. Liu, T. H. Tsai, S. H. Chou, C. S. Chien, H. H. Ku and J. F. Lo (2008). "Positive correlations of Oct-4 and Nanog in oral cancer stem-like cells and high-grade oral squamous cell carcinoma." <u>Clin Cancer Res</u> **14**(13):4085-4095.

Chiou, S. H., M. L. Wang, Y. T. Chou, C. J. Chen, C. F. Hong, W. J. Hsieh, H. T. Chang, Y. S. Chen, T. W. Lin, H. S. Hsu and C. W. Wu (2010). "Coexpression of oct4 and nanog enhances malignancy in lung adenocarcinoma by inducing cancer stem cell-like properties and epithelial-mesenchymal transdifferentiation." <u>Cancer Res</u> **70**(24):10433–10444.

Choi, W. Y., A. J. Giraldez, and A. F. Schier (2007). "Target protectors reveal dampening and balancing of Nodal agonist and antagonist by miR-430." <u>Science</u> **318**: 271-274.

Choudhary, M., D. Kazmin, P. Hu, R. S. Thomas, D. P. McDonnell and G.Malek (2014). "Aryl hydrocarbon receptor knockout exacerbates choroidal neovascularization via multiple pathogenic pathways." <u>J Pathol</u> doi: 10.1002.

Ciolino, H. P., T. T. Wang and G. C. Yeh (1998). "Diosmin and diosmetin are agonists of the aryl hydrocarbon receptor that differentially affect cytochrome P450 1A1 activity." <u>Cancer Res</u> **58**(13): 2754-2760.

Contador-Troca, M., A. Álvarez-Barrientos, E. Barrasa, E. M. Rico-Leo, I. Catalina-Fernández, M. Menacho-Márquez, X. R. Bustelo, J. C. García-Borrón, A. Gómez-Durán, J. Sáenz-Santamaría and P. M. Fernández-Salguero (2013). "The Dioxin Receptor has Tumor Suppressor Activity in Melanoma Growth and Metastasis." Carcinogenesis **34**(12):2683-93.

Corchero, J., G. Martín-Partido, S. L. Dallas and P.M. Fernández-Salguero (2004). "Liver portal fibrosis in dioxin receptor-null mice that overexpress the latent transforming growth factor bats binding protein 1." Int J. Exp. Pathol **85**(5): 205–207

transforming growth factor-beta-binding protein-1." <u>Int J Exp Pathol</u> **85**(5): 295-302. Cordaux, R., D. J. Hedges, S. W. Herke and M. A. Batzer (2006). "Estimating the retrotransposition rate of human Alu elements." <u>Gene</u> **373**: 134–137.

Cost, G. J. and J. D. Boeke (1998). "Targeting of human retrotransposon integration is directed by the specificity of the L1 endonuclease for regions of unusual DNA structure." <u>Biochemistry</u> **37**: 18081-18093.

Couillard-Despres, S., E. Quehl, K. Altendorfer, C. Karl, S. Ploetz, U. Bogdahn, J. Winkler and L. Aigner (2008). "Human in vitro reporter model of neuronal development and early differentiation processes." BMC Neurosci **9**:31.

Cowley, M. and R.J. Oakey (2013). "Transposable elements re-wire and fine-tune the transcriptome." <u>PLoS Genet</u> **9**(1): e1003234.

Daniely, Y., G. Liao, D. Dixon, R. I. Linnoila, A. Lori, S. H. Randell, M. Oren and A. M. Jetten (2004) "Critical role of p63 in the development of a normal esophageal and tracheobronchial epithelium." <u>Am J Physiol Cell Physiol</u> **287**:C171-C181.

Davarinos, N. A. and R. S. Pollenz (1999). "Aryl hydrocarbon receptor imported into the nucleus following ligand binding is rapidly degraded via the cytosplasmic proteasome following nuclear export." J Biol Chem **274**(40): 28708-15.

de Oliveira, S. K., M. Hoffmeister, S. Gambaryan, W. Muller-Esterl, J. A. Guimaraes and A. P. Smolenski (2007). "Phosphodiesterase 2A forms a complex with the cochaperone XAP2 and regulates nuclear translocation of the aryl hydrocarbon receptor." J Biol Chem **282**(18): 13656-63.

Deininger, P. L., D. J. Jolly, C. M. Rubin, T. Friedmann and C. W. Schmid (1981). "Base sequence studies of 300 nucleotide renatured repeated human DNA clones." <u>J.</u> <u>Mol. Biol.</u> **151:** 17–33.

Deininger, P. L. and M. A. Batzer (1993). "Evolution of retroposons." <u>Evol. Biol.</u> 27: 157-196.

Deininger, P. L. and M. A. Batzer (2002). "Mammalian retroelements." <u>Genome Res.</u> **12**: 1455–1465.

Deininger, P. L., J. V. Moran, M. A. Batzer and H. H. Jr. Kazazian (2003). "Mobile elements and mammalian genome evolution." <u>Curr. Opin. Genet. Dev.</u> **13**: 651–658. Deng, W. and H. Lin (2002). "Miwi, a murine homolog of piwi, encodes a cytoplasmic protein essential for spermatogenesis." <u>Dev. Cell</u> **2**: 819-830.

Desai, T. J., D. G. Brownfield and M. A. Krasnow (2014). "Alveolar progenitor and stem cells in lung development, renewal and cancer." <u>Nature</u> **507**:190-194.

Dewannieux, M., C. Esnault and T. Heidmann (2003). "LINE-mediated retrotransposition of marked Alu sequences." <u>Nat. Genet.</u> **35**: 41-48.

Do, C. B., D. A. Woods and S. Batzoglou (2006). "CONTRAfold: RNA secondary structure prediction without physics-based models." <u>Bioinformatics</u> **22**(14):e90-8. Do, H. J., H. Y. Lim, J. H. Kim, H. Song and H. M. Chung (2007). "An intact

homeobox domain is required for complete nuclear localization of human Nanog." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> **353**(3):770–775.

Do, H.J., W.Y. Lee, H. Y. Lim, et al (2009). "Two potent transactivation domains in the C-terminal region of human NANOG mediate transcriptional activation in human embryonic carcinoma cells." J Cell Biochem **106**(6): 1079–1089.

Donovan, P. J. (2001). "High Oct-ane fuel powers the stem cell." <u>Nat Genet</u> **29**:246-247.

Eisenhauer, P., B. Earle, R. Loi, V. Sueblinvong, M. Goodwin, G. B. Allen, L. Lundblad, M. R. Mazan, A. M. Hoffman and D. J. Weiss (2013). "Endogenous distal airway progenitor cells, lung mechanics, and disproportionate lobar growth following long-term postpneumonectomy in mice." <u>Stem Cells</u> **31**:1330-1339.

Elferink, C. J., N. L. Ge and A. Levine (2001). "Maximal aryl hydrocarbon receptor activity depends on an interaction with the retinoblastoma protein." <u>Mol Pharmacol</u> **59**(4): 664-73.

Elizondo, G., P. Fernández-Salguero, M. S. Sheikh, G. Y. Kim, A. J. Fornace, K. S. Lee and F. J. González (2000). "Altered cell cycle control at the G(2)/M phases in aryl hydrocarbon receptor-null embryo fibroblast." <u>Mol Pharmacol</u> **57**(5): 1056-63.

Endo, M., M. A. Antonyak and R. A. (2009). "Cerione Cdc42-mTOR signaling pathway controls Hes5 and Pax6 expression in retinoic acid-dependent neural differentiation." J Biol Chem **284**(8):5107-18.

Ezeh, U. I., P. J. Turek, R. A. Reijo and A. T. (2005). "Clark Human embryonic stem cell genes OCT4, NANOG, STELLAR, and GDF3 are expressed in both seminoma and breast carcinoma." <u>Cancer</u> **104**(10):2255-2265.

Fernández-Salguero, P., T. Pineau, D. M. Hilbert, T. McPhail, S. S. Lee, S. Kimura, D. W. Nebert, S. Rudikoff, J. M. Ward and F. J. Gonzalez (1995). "Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor." <u>Science</u> **268**(5211): 722-6.

Fernández-Salguero, P. M., D. M. Hilbert, S. Rudikoff, J. M. Ward and F. J. Gonzalez (1996). "Aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice are resistant to 2,3,7,8-

tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced toxicity." <u>Toxicol Appl Pharmacol</u> **140**(1): 173-9. Fernández-Salguero, P. M., J. M. Ward, J. P. Sundberg and F. J. Gonzalez (1997).

"Lesions of aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice." <u>Vet Pathol</u> **34**(6): 605-14. Frericks, M., M. Meissner and C. Esser (2007). "Microarray analysis of the AHR system: tissue-specific flexibility in signal and target genes." <u>Toxicol Appl Pharmacol</u> **220**(3): 320-332.

Fujii-Kuriyama, Y. and K. Kawajiri (2010). "Molecular mechanisms of the physiological functions of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor, a multifunctional regulator that senses and responds to environmental stimuli." <u>Proc Jpn Acad Ser B Phys</u> <u>Biol Sci</u> **86**(1): 40-53.

Fukunaga, B. N., M. R. Probst, S. Reisz-Porszasz and O. Hankinson (1995). "Identification of functional domains of the aryl hydrocarbon receptor." <u>J Biol Chem</u> **270**(49): 29270-8.

Ge, N. L. and C. J. Elferink (1998). "A direct interaction between the aryl hydrocarbon receptor and retinoblastoma protein. Linking dioxin signaling to the cell cycle." <u>J Biol</u> <u>Chem</u> **273**(35): 22708-13.

Geiduschek, E. P. and G. A. Kassavetis (2001). "The RNA polymerase III transcription apparatus." J. Mol. Biol. **310**: 1-26.

Giangreco, A., S. D. Reynolds and B. R. Stripp (2002). "Terminal bronchioles harbor a unique airway stem cell population that localizes to the bronchoalveolar duct junction." <u>Am J Pathol</u> **161**:173-182.

Giangreco, A., E. N. Arwert, I. R. Rosewell, J. Snyder, F. M. Watt and B. R. Stripp (2009). "Stem cells are dispensable for lung homeostasis but restore airways after injury." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **106**:9286-9291.

Gidekel, S., G. Pizov, Y. Bergman and E. (2003). "Pikarsky Oct-3/4 is a dosedependent oncogenic fate determinant." <u>Cancer Cell</u> **4**:361-370.

Gillesby, B. E., M. Stanostefano, W. Porter, S. Safe, Z. F. Wu and T. R. Zacharewski (1997). "Identification of a motif within the 5' regulatory region of pS2 which is responsible for AP-1 binding and TCDD-mediated suppression." <u>Biochemistry</u> **36**(20): 6080-9.

Gillis, A. J., H. Stoop, K. Biermann, R.J. van Gurp, E. Swartzman, S. Cribbes, A. Ferlinz, M. Shannon, J. W. Oosterhuis and L. H. Looijenga (2011). "Expression and interdependencies of pluripotency factors LIN28, OCT3/4, NANOG and SOX2 in human testicular germ cells and tumours of the testis." <u>Int J Androl</u> **34**(4 Pt 2):e160–e174.

Giraldez, A. J., Y. Mishima, J. Rihel, R. J. Grocock, S. Van Dongen, K. Inoue, A.J. Enright and A.F. Schier (2006). "Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs." <u>Science</u> **312**: 75-79.

Girard, A., R. Sachidanandam, G. J. Hannon and M.A. Carmell (2006). "A germlinespecific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins." <u>Nature</u> **442**: 199-202. Gómez-Durán, A., S. Mulero-Navarro, X. Chang and P. M. Fernández-Salguero (2006). "LTBP-1 blockade in dioxin receptor-null mouse embryo fibroblasts decreases TGF-

beta activity: Role of extracellular proteases plasmin and elastase." J <u>Cell Biochem</u> **97**(2): 380-392.

Gómez-Durán, A., J. M. Carvajal-González, S. Mulero-Navarro, B. Santiago-Josefat, A. Puga and P. M. Fernández-Salguero (2008). "Recruitment of CREB1 and histone deacetylase 2 (HDAC2) to the mouse Ltbp-1 promoter regulates its constitutive expression in a dioxin receptor-dependent manner." J Mol Biol **380**(1): 1-16.

González, F. J. and P. Fernández-Salguero (1998). "The aryl hydrocarbon receptor: studies using the AHR-null mice." Drug Metab Dispos **26**(12): 1194-1198.

Goode, G., S. Pratap and S. E. Eltom (2014). Depletion of the Aryl Hydrocarbon Receptor in MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cells Altered the Expression of Genes in Key Regulatory Pathways of Cancer. <u>PLoS One</u> **9**(6):e100103.

Greenlee, W. F. and A. Poland (1979). "Nuclear uptake of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-pdioxin in C57BL/6J and DBA/2J mice. Role of the hepatic cytosol receptor protein." <u>J</u> <u>Biol Chem</u> **254**(19):9814-9821.

Guo, Y., S. Liu, P. Wang, F. Wang, L. Bing, Y. Zhang, E. A. Ling, J. Gao and A. Hao (2011). "Expression profile of embryonic stem cell-associated genes Oct4, Sox2 and Nanog in human gliomas." <u>Histopathology</u> **59**(4):763-775.

Gwinn, D. M., D. B. Shackelford, D. F. Egan, M. M. Mihaylova, A. Mery, D. S. Vasquez, B. E. Turk and R. J. Shaw (2008). "AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint." <u>Mol Cell</u> **30**(2):214-26.

Hahn, M. E. (2002). "Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution." <u>Chem Biol</u> <u>Interact</u> **141**(1-2): 131-60.

Hale, M. A., G. H. Swift, C. Q. Hoang, T. G. Deering, T. Masui, Y. K. Lee, J. Xue, R. J. MacDonald (2013)."The nuclear hormone receptor family member NR5A2 controls aspects of multipotent progenitor cell formation and acinar differentiation during pancreatic organogenesis." <u>Development</u> **141**(16):3123-33.

Hall, J. M., M. A. Barhoover, D. Kazmin, D. P. McDonnell, W. F. Greenlee and R. S. Thomas (2010). "Activation of the aryl-hydrocarbon receptor inhibits invasive and metastatic features of human breast cancer cells and promotes breast cancer cell differentiation." <u>Mol Endocrinol</u> **24**(2):359-69.

Han, J., F. Zhang, M. Yu, P. Zhao, W. Ji, H. Zhang, B. Wu, Y. Wang and R. Niu (2012). "RNA interference-mediated silencing of NANOG reduces cell proliferation and induces G0/G1 cell cycle arrest in breast cancer cells." <u>Cancer Lett</u> **321**(1):80–88. Hancks, D. C. and H. H. Jr. Kazazian (2012). "Active human retrotransposons: variation and disease." <u>Curr. Opin. Genet. Dev.</u> **22**: 191-203.

Harstad, E. B., C. A. Guite, T. L. Thomae and C. A. Bradfield (2006). "Liver deformation in Ahr-null mice: evidence for aberrant hepatic perfusion in early development." <u>Mol Pharmacol</u> **69**(5): 1534-1541.

Hart, A. H., L. Hartley, K. Parker, M. Ibrahim, L. H. Looijenga, M. Pauchnik, C. W. Chow and L. Robb (2005). "The pluripotency homeobox gene NANOG is expressed in human germ cell tumors." <u>Cancer</u> **104**(10):2092-2098.

Harvey, K. and N. Tapon (2007). "The Salvador-Warts-Hippo pathway - an emerging tumour- suppressor network." <u>Nat Rev Cancer</u> **7**: 182-91

Hasler, J., T. Samuelsson and K. Strub (2007). "Useful 'junk': Alu RNAs in the human transcriptome." <u>Cell Mol Life Sci</u> **64**: 1793-1800.

Hayashibara, T., Y. Yamada, N. Mori, H. Harasawa, K. Sugahara, T. Miyanishi, S. Kamihira and M. Tomonaga (2003). "Possible involvement of aryl hydrocarbon receptor (AhR) in adult T-cell leukemia (ATL) leukemogenesis: constitutive activation

of AhR in ATL." <u>Biochem Biophys</u> <u>Res Commun</u> **300**(1): 128-134.

Hayashida, Y., T. Kawamura, R. Hori-e and I. Yamashita (2004). "Retionic acid and its receptors are required for expression of aryl hydrocarbon receptor mRNA and embryonic development of blood vessel and bone in the medaka fish, Oryzias latipes." <u>Zoolog Sci</u> **21**(5):541-51.

Heallen, T., M. Zhang, J. Wang, M. Bonilla-Claudio, E. Klysik, R. L. Johnson and J. F. Martin (2011). "Hippo pathway inhibits Wnt signaling to restrain cardiomyocyte proliferation and heart size." <u>Science</u> **332**(6028):458-61.

Hegab, A. E., D. W. Nickerson, V. L. Ha, D. O. Darmawan and B. N. Gomperts (2012). "Repair and regeneration of tracheal surface epithelium and submucosal glands in a mouse model of hypoxic-ischemic injury." <u>Respirology</u> **17**:1101-1113.

Hoei-Hansen, C. E., K. Almstrup, J. E. Nielsen, S. Brask-Sonne, N. Graem, N. E. Skakkebaek, H. Leffers and E. Rajpert-De Meyts (2005). "Stem cell pluripotency factor NANOG is expressed in human fetal gonocytes, testicular carcinoma in situ and germ cell tumours." <u>Histopathology</u> **47**(1):48-56.

Hofsteen, P., V. Mehta, M. S. Kim, R. E. Peterson and W. Heideman (2013). "TCDD inhibits heart regeneration in adult zebrafish." <u>Toxicol Sci</u> **132**(1):211-21.

Hong, K. U., S. D. Reynolds, S. Watkins, E. Fuchs, B. R. Stripp (2004). "In vivo differentiation potential of tracheal basal cells: evidence for multipotent and unipotent subpopulations." <u>Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol</u> **286**:L643-L649.

Hong, K. U., S. D. Reynolds, S. Watkins, E. Fuchs, B. R. Stripp (2004). "Basal cells are a multipotent progenitor capable of renewing the bronchial epithelium." <u>Am J Pathol</u> **164**:577-588.

Hogeveen, K. N., M. Talikka and G. L. Hammond (2001). "Human sex hormonebinding globulin promoter activity is influenced by a (TAAAA)n repeat element within an Alu sequence." J Biol Chem **276**(39):36383-90.

Horras, C. J., C. L. Lamb, A. L. King, J. R. Hanley and K. A. Mitchell (2012). "Consequences of TCDD treatment on intra-hepatic lymphocytes during liver regeneration." <u>J Immunotoxicol</u> **9**(4):359-67.

Hu, Q., B. Tanasa, M. Trabucchi, W. Li, J. Zhang, K. A. Ohgi, D. W. Rose, C. K. Glass and M. G.Rosenfeld (2012). "DICER- and AGO3-dependent generation of retinoic acid-induced DR2 Alu RNAs regulates human stem cell proliferation." <u>Nat Struct Mol Biol</u> **19**(11):1168-75

Huang, G. and C. J. Elferink (2005). "Multiple mechanisms are involved in Ah receptor-mediated cell cycle arrest." <u>Mol Pharmacol</u> **67**(1): 88-96.

Huang, J., S. Wu, J. Barrera, K. Matthews and D. Pan (2005). "The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the Drosophila Homolog of YAP." <u>Cell</u> **122**: 421-34.

Hyslop, L., M. Stojkovic, L. Armstrong, T. Walter, P. Stojkovic, S. Przyborski, M. Herbert, A. Murdoch, T. Strachan and M. Lako (2005). "Downregulation of NANOG induces differentiation of human embryonic stem cells to extraembryonic lineages." <u>Stem Cells</u> **23**(8):1035–1043.

Ichiyanagi, K., R. Nakajima, M. Kajikawa N. and Okada (2007). "Novel retrotransposon analysis reveals multiple mobility pathways dictated by hosts." <u>Genome Res.</u> **17**: 33-41.

Ichiyanagi, K., Y. Li, T. Watanabe, T. Ichiyanagi, K. Fukuda, J. Kitayama, Y. Yamamoto, S. Kuramochi-Miyagawa, T. Nakano, Y. Yabuta, Y. Seki, M. Saitou and Sasaki H. (2011). "Locus- and domain-dependent control of DNA methylation at mouse B1 retrotransposons during male germ cell development." <u>Genome Res.</u> **21**: 2058-2066. Ikuta, T., H. Eguchi, T. Tachibana, Y. Yoneda and K. Kawajiri (1998). "Nuclear localization and export signals of the human aryl hydrocarbon receptor." <u>J Biol Chem</u> **273**(5): 2895-904.

Ikuta, T., T. Tachibana, J. Watanabe, M. Yoshida, Y. Yoneda and K. Kawajiri (2000). "Nucleocytoplasmic shuttling of the aryl hydrocarbon receptor." <u>J Biochem (Tokyo)</u> **127**(3): 503-9.

Ikuta, T., Y. Kobayashi and K. Kawajiri (2004). "Cell density regulates intracellular localization of aryl hydrocarbon receptor." J Biol Chem **279**(18): 19209-16.

Ikuta, T. and K. Kawajiri (2006). "Zinc finger transcription factor Slug is a novel target gene of aryl hydrocarbon receptor." <u>Exp Cell Res</u> **312**(18): 3585-3594.

Ikuta, T., M. Ohba, C. C. Zouboulis, Y. Fujii-Kuriyama and K. Kawajiri (2010). "B lymphocyte-induced maturation protein 1 is a novel target gene of aryl hydrocarbon receptor." <u>J Dermatol Sci</u> **58**(3): 211-216.

Ito, T., S. Tsukumo, N. Suzuki, H. Motohashi, M. Yamamoto, Y. Fujii-Kuriyama, J. Mimura, T. M. Lin, R. E. Peterson, C. Tohyama and K. Nohara (2004). "A constitutively active aryl hydrocarbon receptor induces growth inhibition of jurkat T cells through changes in the expression of genes related to apoptosis and cell cycle arrest." J Biol Chem **279**(24): 25204-25210.

Jacobs, H., C. Dennefeld, B. Féret, M. Viluksela, H. Håkansson, M. Mark and N. B.Ghyselinck (2011). "Retinoic acid drives aryl hydrocarbon receptor expression and is instrumental to dioxin-induced toxicity during palate development." <u>Environ Health</u> <u>Perspect 119(11):1590-5</u>.

Jaenisch, R. and R. Young (2008). "Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming." <u>Cell</u> **132:** 567–582.

Jackson, D. P., H. Li, K. A. Mitchell, A. D. Joshi and C. J. Elferink (2014). "Ah receptor-mediated suppression of liver regeneration through NC-XRE-driven p21Cip1 expression." <u>Mol Pharmacol</u> **85**(4):533-41.

Jacques, P. E., J. Jeyakani and G. Bourque (2013). "The majority of primate-specific regulatory sequences are derived from transposable elements." <u>PLoS Genet</u> **9**: e1003504.

Jurka, J. (1997). "Sequence patterns indicate an enzymatic involvement in integration of mammalian retroposons." <u>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</u> **94**: 1872-1877.

Kaneko, H., S. Dridi, V. Tarallo, B. D. Gelfand, B. J. Fowler et al. (2011). "DICER1 deficit induces Alu RNA toxicity in age-related macular degeneration." <u>Nature</u> **471**: 325–330.

Kaplan, G., W. R. Jelinek and R. Bachvarova (1985). "Repetitive sequence transcripts and U1 RNA in mouse oocytes and eggs." <u>Dev. Biol.</u> **109**: 15-24.

Kashyap, V., N. C. Rezende, K. B. Scotland, S. M. Shaffer, J. L. Persson, L. J. Gudas and N. P. Mongan (2009). "Regulation of stem cell pluripotency and differentiation involves a mutual regulatory circuit of the NANOG, OCT4, and SOX2 pluripotency transcription factors with polycomb repressive complexes and stem cell microRNAs." <u>Stem Cells Dev</u> **18**(7):1093–1108.

Kazlauskas, A., L. Poellinger and I. Pongratz (1999). "Evidence that the co-chaperone p23 regulates ligand responsiveness of the dioxin (Aryl hydrocarbon) receptor." J Biol Chem **274**(19): 13519-24.

Kazlauskas, A., S. Sundstrom, L. Poellinger and I. Pongratz (2001). "The hsp90 chaperone complex regulates intracellular localization of the dioxin receptor." <u>Mol Cell</u> <u>Biol</u> **21**(7): 2594-607.

Kehler, J., E. Tolkunova, B. Koschorz, M. Pesce, L. Gentile, M. Boiani, H. Lomelí, A. Nagy, K. J. McLaughlin, H. R. Schöler and A. Tomilin (2004). "Oct4 is required for primordial germ cell survival." <u>EMBO Rep</u> **5**:1078-1083.

Kim, C. F., E. L. Jackson, A. E. Woolfenden, S. Lawrence, I. Babar, S. Vogel, D. Crowley, R. T. Bronson and T. Jacks (2005). "Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer." <u>Cell</u> **121**:823-835.

Kim, J., J. Chu, X. Shen, J.Wang and S.H. Orkin (2008). "An extended transcriptional network for pluripotency of embryonic stem cells." <u>Cell</u> **132**: 1049–1061.

Kim, N. G., E. Koh, X. Chen and B. M. (2011). "Gumbiner E-cadherin mediates contact inhibition of proliferation through Hippo signaling-pathway components." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **108**(29):11930-5.

Kim, S. G., G. R. Hoffman, G. Poulogiannis, G. R. Buel, Y. J. Jang, K. W. Lee, B. Y. Kim, R. L. Erikson, L. C. Cantley, A. Y. Choo and J. Blenis (2013). "Metabolic stress controls mTORC1 lysosomal localization and dimerization by regulating the TTT-RUVBL1/2 complex." Mol Cell **49**(1):172-85.

Kim, V.N., J. Han and M. C. Siomi MC (2009). "Biogenesis of small RNAs in animals." <u>Nat Rev Mol Cell Biol</u> **10**: 126–139.

Klinge, C. M., J. L. Bowers, P. C. Kulakosky, K. K. Kamboj and H. I. Swanson (1999). "The aryl hydrocarbon receptor (AHR)/AHR nuclear translocator (ARNT) heterodimer interacts with naturally occurring estrogen response elements." <u>Mol Cell Endocrinol</u> **157**(1-2): 105-119.

Knutson, J. C. and A. Poland (1980). "Keratinization of mouse teratoma cell line XB produced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: an in vitro model of toxicity." <u>Cell</u> **22**(1 Pt 1): 27-36.

Ko, C. I., Q. Wang, Y. Fan, Y. Xia and A. Puga (2013). "Pluripotency factors and Polycomb Group proteins repress aryl hydrocarbon receptor expression in murine embryonic stem cells." <u>Stem Cell Res</u> **12**: 296-308.

Koliopanos, A., J. Kleeff, Y. Xiao, S. Safe, A. Zimmermann, M. W. Büchler and H. Friess (2002). "Increased arylhydrocarbon receptor expression offers a potential therapeutic target for pancreatic cancer." <u>Oncogene</u> **21**(39): 6059-6070.

Kolluri, S. K., C. Weiss, A. Koff and M. Gottlicher (1999). "p27(Kip1) induction and inhibition of proliferation by the intracellular Ah receptor in developing thymus and hepatoma cells." <u>Genes Dev</u> **13**(13): 1742-53.

Kolluri, S. K., C. Balduf, M. Hofmann, M. Göttlicher (2001). "Novel target genes of the Ah (dioxin) receptor: transcriptional induction of N-myristoyltransferase 2." <u>Cancer Res</u> 61(23): 8534-8539.

Konsavage, W. M., S. L. Kyler, S. A. Rennoll, G. Jin and G. S. Yochum. "Wnt/ β -catenin signaling regulates Yes-associated protein (YAP) gene expression in colorectal carcinoma cells." J Biol Chem **287**(15):11730-9.

Kook, S. H., S. S. Lim, E. S. Cho, Y. H. Lee, S. K. Han, K. Y. Lee, J. Kwon, J. W. Hwang, C. H. Bae, Seo Y. K. and J. C. Lee (2014). "COMP-angiopoietin 1 increases proliferation, differentiation, and migration of stem-like cells through Tie-2-mediated activation of p38 MAPK and PI3K/Akt signal transduction pathways." Biochem <u>Biophys Res Commun</u> **455**(3-4):371-7.

Kornasio, R., I. Riederer, G. Butler-Browne, V. Mouly, Z. Uni and O. Halevy (2009). "Beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) stimulates myogenic cell proliferation, differentiation and survival via the MAPK/ERK and PI3K/Akt pathways." <u>Biochim</u> <u>Biophys Acta</u> **1793**(5):755-63.

Koster, M. I., S. Kim, A. A. Mills, F. J. DeMayo and D. R. Roop (2004). "p63 is the molecular switch for initiation of an epithelial stratification program." <u>Genes Dev</u> **18**:126-131.

Kramerov, D. A., A. A. Grigoryan, A. P. Ryskov and G. P. Georgiev (1979). "Long double-stranded sequences (dsRNA-B) of nuclear pre-mRNA consist of a few highly abundant classes of sequences: evidence from DNA cloning experiments." <u>Nucleic Acids Res</u> **6**: 697–713.

Kriegs, J. O., G. Churakov, J. Jurka, J. Brosius and J. Schmitz (2007). "Evolutionary history of 7SL RNA-derived SINEs in supraprimates." <u>Trends Genet</u>. **23**: 158–161. Kumar, M. B., R. W. Tarpey and G. H. Perdew (1999). "Differential recruitment of coactivator RIP140 by Ah and estrogen receptors. Absence of a role for LXXLL motifs." J Biol Chem **274**(32): 22155-64.

Kumar, P. A., Y. Hu, Y. Yamamoto, N. B. Hoe, T. S. Wei, D. Mu, Y. Sun, L. S. Joo, R. Dagher, E. M. Zielonka, Y. Wangde, B. Lim, V. T. Chow, C. P. Crum, W. Xian and F. McKeon (2011). "Distal airway stem cells yield alveoli in vitro and during lung regeneration following H1N1 influenza infection." <u>Cell</u> **147**:525-538.

Kuramochi-Miyagawa,S., T. Kimura, T. W. Ijiri, T. Isobe, N. Asada, Y. Fujita, M. Ikawa, N. Iwai, M. Okabe, W. Deng et al. (2004) "Mili, a mammalian member of piwi family gene, is essential for spermatogenesis." <u>Development</u> **131:** 839-849.

Kuramochi-Miyagawa,S., T. Watanabe, K. Gotoh, Y. Totoki, A. Toyoda, M. Ikawa, N. Asada, K. Kojima, Y. Yamaguchi, T. W. Ijiri, K. Hata, E. Li, Y. Matsuda, T. Kimura, M. Okabe, Y. Sakaki, H. Sasaki and T. Nakano (2008). "DNA methylation of retrotransposon genes is regulated by Piwi family members MILI and MIWI2 in murine fetal testes." <u>Genes Dev.</u> **22**: 908-917.

Kuroda, T., M. Tada, H. Kubota, H. Kimura, S.Y. Hatano, H. Suemori, N. Nakatsuji and T. Tada (2005). Octamer and Sox elements are required for transcriptional cis regulation of Nanog gene expression. <u>Mol. Cell. Biol.</u> **25**: 2475–2485.

Lahvis, G. P., S. L. Lindell, R. S. Thomas, R. S. McCuskey, C. Murphy, E. Glover, M. Bentz, J. Southard and C.A.Bradfield (2000). "Portosystemic shunting and persistent fetal vascular structures in aryl hydrocarbon receptor-deficient mice." <u>Proc Natl Acad</u> <u>Sci U S A</u> **97**(19): 10442-10447.

Lahvis, G. P., R. W. Pyzalski, E. Glover, C. Pitot H., M. K. McElwee and C. A. Bradfield (2005). "The aryl hydrocarbon receptor is required for developmental closure of the ductus venosus in the neonatal mouse." <u>Mol Pharmacol</u> **67**(3): 714-720.

Lander, E. S. et al. (2001). "International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome." <u>Nature</u> **409**: 860–921. Landgraf, P. et al. (2007). "A mammalian microRNA expression atlas based on small

RNA library sequencing." <u>Cell</u> **129**(7):1401-14. Laperriere, D., T. T. Wang, J. H. White and S. Mader (2007). "Widespread Alu repeatdriven expansion of consensus DR2 retinoic acid response elements during primate evolution." BMC Genomics **8**: 23.

Laplante, M. and D. M. Sabatini (2012). "mTOR signaling in growth control and disease." Cell **149**(2):274-93.

Lau, N. C., A. G. Seto, J. Kim, S. Kuramochi-Miyagawa, T. Nakano, D. P.Bartel and R. E. Kingston (2006). "Characterization of the piRNA complex from rat testes." <u>Science</u> **313**: 363-367.

Lee, K. J., A. B. Conley, V. V. Lunyak and I. K. Jordan (2012). "Do human transposable element small RNAs serve primarily as genome defenders or genome regulators?" <u>Mob Genet Elements</u> **2**(1):19-25.

Lee, M., E. J. Nam, S. W. Kim, S. Kim, J. H. Kim and Y. T. Kim (2012). "Prognostic impact of the cancer stem cell-related marker NANOG in ovarian serous carcinoma." Int J Gynecol Cancer **22**(9):1489–1496.

Lee, S. S., T. Pineau, J. Drago, E. J. Lee, J. W. Owens, D. L. Kroetz, P. M. Fernández-Salguero, H. Westphal and F. J. Gonzalez (1995). "Targeted disruption of the alpha isoform of the peroxisome proliferator- activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators." <u>Mol Cell Biol</u> **15**(6): 3012-3022.

Lees, M. J. and M. L. Whitelaw (1999). "Multiple roles of ligand in transforming the dioxin receptor to an active basic helix-loop-helix/PAS transcription factor complex with the nuclear protein Arnt." <u>Mol Cell Biol</u> **19**(8): 5811-22.

Lian, I., J. Kim, H. Okazawa, J. Zhao, B. Zhao, J. Yu, A. Chinnaiyan, M. A. Israel, L. S. Goldstein, R. Abujarour, S. Ding and K. L. Guan (2010). "The role of YAP

transcription coactivator in regulating stem cell self-renewal and differentiation." <u>Genes</u> <u>Dev</u> 24(11):1106-18.

Lin, T., Y. Q. Ding and J. M. Li (2012). "Overexpression of Nanog protein is associated with poor prognosis in gastric adenocarcinoma." <u>Med Oncol</u> **29**(2): 878–885.

Lin, Y. L., Z. B. Han, F. Y. Xiong, L. Y. Tian, X. J. Wu, S. W. Xue, Y. R. Zhou, J. X. Deng and H. X. Chen (2011). "Malignant transformation of 293 cells induced by ectopic expression of human Nanog " <u>Mol Cell Biochem</u> **351**(1–2):109–116.

Loh, Y.H., Q. Wu, J.L. Chew, V.B. Vega, W. Zhang, X. Chen, G. Bourque, J. George, B. Leong, J. Liu, K.Y. Wong, K.W. Sung, C.W. Lee, X.D. Zhao, K.P. Chiu, L.

Lipovich, V.A. Kuznetsov, P. Robson, L.W. Stanton, C.L. Wei, Y. Ruan, B. Lim and H.H. Ng (2006). "TheOct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonicstem cells." <u>Nat. Genet.</u> **38:** 431–440.

Lu, Y.F., M. Santostefano, B. D. Cunningham, M. D. Threadgill and S.Safe (1996). "Substituted Flavones as Aryl Hydrocarbon (Ah) Receptor Agonists and Antagonists." <u>Biochemical Pharmacology</u> **51**(8): 1077-1087.

Lund, A. K., M. B. Goens, N. L. Kanagy and M. K. Walker (2003). "Cardiac hypertrophy in aryl hydrocarbon receptor null mice is correlated with elevated angiotensin II, endothelin-1, and mean arterial blood pressure." <u>Toxicol Appl Pharmacol</u> **193**(2): 177-187.

Ma, Q. and J. P. Whitlock, Jr. (1996). "The aromatic hydrocarbon receptor modulates the Hepa 1c1c7 cell cycle and differentiated state independently of dioxin." <u>Mol Cell</u> <u>Biol</u> **16**(5): 2144-50.

Ma, Q. and K. T. Baldwin (2002). "A cycloheximide-sensitive factor regulates TCDDinduced degradation of the aryl hydrocarbon receptor." <u>Chemosphere</u> **46**(9-10): 1491-500.

Ma, X. M. and J. Blenis (2009). "Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control." <u>Nat Rev Mol Cell Biol</u> **10**(5):307-18.

Marlowe, J. L., E. S. Knudsen, S. Schwemberger and A. Puga (2004). "The aryl hydrocarbon receptor displaces p300 from E2F-dependent promoters and represses S phase-specific gene expression." J Biol Chem **279**(28): 29013-22.

Martello,G., L. Zacchigna, M. Inui, M. Montagner, M. Adorno, A. Mamidi, L. Morsut, S. Soligo, U. Tran, S. Dupont, M. Cordenonsi, O. Wessely and S.Piccolo (2007). "MicroRNA control of Nodal signalling." Nature, **449**: 183-188. Mathew, L. K., E. A. Andreasen and R. L. Tanguay (2006). "Aryl hydrocarbon receptor activation inhibits regenerative growth." <u>Mol Pharmacol</u> **69**(1):257-65.

Mathew, L. K., M. T. Simonich and R. L. Tanguay (2009). "AHR-dependent misregulation of Wnt signaling disrupts tissue regeneration." <u>Biochem Pharmacol</u> **77**(4):498-507.

Matikainen, T., G. I. Perez, A. Jurisicova, J. K. Pru, J. J. Schlezinger, H. Y. Ryu, J. Laine, T. Sakai, S. J. Korsmeyer, R. F. Casper, D. H. Sherr and J. L. Tilly (2001). "Aromatic hydrocarbon receptor-driven Bax gene expression is required for premature ovarian failure caused by biohazardous environmental chemicals." <u>Nat Genet</u> **28**(4): 355-360.

Mauviel, A., F. Nallet-Staub and X. Varelas (2012). "Integrating developmental signals: a Hippo in the (path)way." <u>Oncogene</u> **31**(14):1743-56.

Meng, H. M., P. Zheng, X. Y. Wang, C. Liu, H. M. Sui, S. J. Wu, J. Zhou, Y. Q. Ding and J. Li (2010). "Overexpression of nanog predicts tumor progression and poor prognosis in colorectal cancer." <u>Cancer Biol Ther</u> **9**(4): 295-302.

Meyer, B. K., M. G. Pray-Grant, J. P. Vanden Heuvel and G. H. Perdew (1998). "Hepatitis B virus X-associated protein 2 is a subunit of the unliganded aryl

hydrocarbon receptor core complex and exhibits transcriptional enhancer activity." <u>Mol</u> <u>Cell Biol</u> **18**(2): 978-88.

Mills, R. E., E. A. Bennett, R. C. Iskow and S. E. Devine (2007). "Which transposable elements are active in the human genome?" <u>Trends Genet</u> **23**: 183–191.

Mimura, J., K. Yamashita, K. Nakamura, M. Morita, T. N. Takagi, K. Nakao, M. Ema, K. Sogawa, M. Yasuda, M. Katsuki and Y. Fujii-Kuriyama (1997). "Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor." <u>Genes Cells</u> **2**(10): 645-54.

Mimura, J., M. Ema, K. Sogawa and Y. Fujii-Kuriyama (1999). "Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function." <u>Genes Dev</u> **13**(1): 20-5.

Minucci, S., V. Botquin, Y.I. Yeom, A. Dey, I. Sylvester, D.J. Zand, K. Ohbo, K. Ozato and H.R. Schöler (1996). "Retinoic acid-mediated down-regulation of Oct3/4 coincides with the loss of promoter occupancy in vivo." <u>EMBO J.</u> **15**: 888–899.

Mitchell, K. A., C. A. Lockhart, G. Huang and C. J. Elferink (2006). "Sustained aryl hydrocarbon receptor activity attenuates liver regeneration." <u>Mol Pharmacol</u> **70**(1):163-70.

Mitsui, K., Y. Tokuzawa, H. Itoh, K. Segawa, M. Murakami, K. Takahashi, M. Maruyama, M. Maeda and S. Yamanaka (2003). "The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells." <u>Cell</u> **113**(5):631–642. Moennikes, O., S. Loeppen, A. Buchmann, P. Andersson, C. Ittrich, L. Poellinger and M. Schwarz (2004). "A constitutively active dioxin/aryl hydrocarbon receptor promotes hepatocarcinogenesis in mice." <u>Cancer Res</u> **64**(14): 4707-10.

Morán, J. V., S. E. Holmes, T. P. Naas, DeBerardinis, R. J., J. D. Boeke and H. H. Jr. Kazazian (1996). "High frequency retrotransposition in cultured mammalian cells." <u>Cell</u> **87**: 917-927.

Mori, M., R. Triboulet, M. Mohseni, K. Schlegelmilch, K. Shrestha, F. D. Camargo, Gregory R. I (2014). "Hippo signaling regulates microprocessor and links cell-density-dependent miRNA biogenesis to cancer." <u>Cell</u> **156**(5):893-906.

Mukai, M. and S. A. Tischkau (2007). "Effects of tryptophan photoproducts in the circadian timing system: searching for a physiological role for aryl hydrocarbon receptor." <u>Toxicol Sci</u> **95**(1):172-81.

Murchison, E.P., P. Stein, Z. Xuan, H. Pan, M. Q. Zhang, R. M. Schultz and G.J. Hannon (2007). "Critical roles for Dicer in the female germline." <u>Genes Dev.</u> **21:** 682-693.

Mulero-Navarro, S., J. M. Carvajal-González, M. Herranz, E. Ballestar, M. F. Fraga, S. Ropero, M. Esteller and P. M. Fernández-Salguero (2006). "The dioxin receptor is silenced by promoter hypermethylation in human acute lymphoblastic leukemia through inhibition of Sp1 binding." <u>Carcinogenesis</u> **27**(5):1099-1104.

Nagata, T., Y. Shimada, S. Sekine, R. Hori, K. Matsui, T. Okumura, S. Sawada, J. Fukuoka and K. Tsukada (2012). "Prognostic significance of NANOG and KLF4 for breast cancer." <u>Breast cancer</u> **21**(1):96-101.

Nebert, D. W., A. L. Roe, M. Z. Dieter, W. A. Solis, Y. Yang and T. P. Dalton (2000). "Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis." <u>Biochem Pharmacol</u> **59**(1): 65-85.

Nemoto, T., T. Yanagita, S. Satoh, T. Maruta, T. Kanai, M. Murakami and A. Wada (2011). "Insulin-induced neurite-like process outgrowth: acceleration of tau protein synthesis via a phosphoinositide 3-kinase~mammalian target of rapamycin pathway." <u>Neurochem Int</u> **59**(6):880-8.

Nichols, J., B. Zernike, K. Anastassiadis, H. Niwa, D. Klewe-Nebenius, I. Chambers, H. Schöler and A. Smith (1998). "Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4." <u>Cell</u> **95**:379-391.

Niermann, T., S. Schmutz, P. Erne and T. Resink (2003). "Aryl hydrocarbon receptor ligands repress T-cadherin expression in vascular smooth muscle cells." <u>Biochem</u> <u>Biophys Res Commun</u> **300**(4): 943-949.

Nikoopour, E., S. M. Bellemore, B. Singh (2014). "IL-22, cell regeneration and autoimmunity." <u>Cytokine</u> **S1043-4666**(14)00535-3.

Nishimoto, M., A. Fukushima, A. Okuda and M. Muramatsu (1999). "The gene for the embryonic stem cell coactivator UTF1 carries a regulatory element which selectively interacts with a complex composed of Oct-3/4 and Sox-2." <u>Mol. Cell. Biol.</u> **19:** 5453–5465.

Nishio, M., K. Otsubo, T. Maehama, K. Mimori and A. Suzuki (2013). "Capturing the mammalian Hippo: elucidating its role in cancer." <u>Cancer Sci</u> **104**(10):1271-7. Niwa, H., J. Miyazaki and A. G.Smith (2000). "Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells." <u>Nat Genet</u>

24(4):372–376.

Oesch-Bartlomowicz, B. and F. Oesch (2005). "Phosphorylation of cytochromes P450: first discovery of a posttranslational modification of a drug-metabolizing enzyme." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> **338**(1): 446-9.

Ogi, T., J. Mimura, M. Hikida, H. Fujimoto, Y. Fujii-Kuriyama and H. Ohmori (2001). "Expression of human and mouse genes encoding polkappa: testis-specific developmental regulation and AhR-dependent inducible transcription." <u>Genes Cells</u>

6(11): 943-953.

Oh, J. H., H. J. Do, H. M. Yang, S. Y. Moon, K. Y. Cha, Chung and J. H. Kim (2005). "Identification of a putative transactivation domain in human Nanog." <u>Exp Mol Med</u> **37**(3):250–254.

Ohnishi, Y., Y. Totoki, A. Toyoda, T. Watanabe, Y. Yamamoto, K. Tokunaga, Y. Sakaki, H. Sasaki and H. Hohjoh (2012). "Active role of small non-coding RNAs derived from SINE/B1 retrotransposon during early mouse development." <u>Mol Biol Rep</u> **39**(2):903-9.
Ohshima, K., M. Hamada, Y. Terai and N. Okada (1996). "The 3' ends of tRNAderived short interspersed repetitive elements are derived from the 3' ends of long interspersed repetitive elements." <u>Mol. Cell. Biol.</u> **16:** 3756-3764.

Ohshima, K. and N. Okada (2005). "SINEs and LINEs: symbionts of eukaryotic genomes with a common tail." <u>Cytogenet. Genome Res.</u> **110**: 475–490.

Ohtake, F., K. Takeyama, T. Matsumoto, H. Kitagawa, Y. Yamamoto, K. Nohara, C. Tohyama, A. Krust, J. Mimura, P. Chambon, J. Yanagisawa, Y. Fujii-Kuriyama and S. Kato (2003). "Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor." <u>Nature</u> **423**(6939): 545-550.

Ohtake, F., Y. Fujii-Kuriyama and S. Kato (2007). "[Transcription factor AhR is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase]." <u>Tanpakushitsu Kakusan Koso</u> **52**(15): 1973-1979.

Okada, N. (1991). "SINEs." Curr. Opin. Genet. Dev. 1: 498–504.

Okey, A. B., G. P. Bondy, M. E. Mason, G. F. Kahl, H. J. Eisen, T. M. Guenthner and D. W. Nebert (1979). "Regulatory gene product of the Ah locus. Characterization of the cytosolic inducer-receptor complex and evidence for its nuclear translocation." J Biol Chem **254**(22): 11636-48.

Okumura-Nakanishi, S., M. Saito, H. Niwa and F. Ishikawa (2005). "Oct-3/4 and Sox2 regulate Oct-3/4 gene in embryonic stem cells." J. Biol. Chem. **280:** 5307–5317.

Ouyang, Z., Q. Zhou and W.H.Wong (2009). "ChIP-Seq of transcription factors predicts absolute and differential gene expression in embryonic stem cells." <u>Proc. Natl. Acad.</u> <u>Sci. U. S. A.</u> **106:** 21521–21526.

Pan, G. and J. A. Thomson (2007). "Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency." <u>Cell Res</u> **17**(1):42–49.

Pan, Y., J. Jiao, C. Zhou, Q. Cheng, Y. Hu and H. Chen (2010). "Nanog is highly expressed in ovarian serous cystadenocarcinoma and correlated with clinical stage and pathological grade." <u>Pathobiology</u> **77**(6): 283-288.

Pandey, R. and M. Mukerji (2011). "From 'JUNK' to just unexplored noncoding knowledge: the case of transcribed Alus." <u>Brief Funct Genomics</u> **10**(5):294-311.

Paquet-Durand, F., S. Tan and G. Bicker (2003). "Turning teratocarcinoma cells into neurons: rapid differentiation of NT-2 cells in floating spheres." <u>Brain Res Dev Brain</u> <u>Res 142</u>(2):161-7.

Park, S. W., H. J. Do, S. H. Huh, B. Sung, S. J. Uhm, H. Song, N. H. Kim and J. H. Kim (2012). "Identification of a putative nuclear export signal motif in human NANOG homeobox domain." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> **421**(3):484–489.

Paulson, K. E. and C. W. Schmid (1986). "Transcriptional inactivity of Alu repeats in HeLa cells." <u>Nucleic Acids Res</u> 14, 6145-6158.

Perdew, G. H. (1988). "Association of the Ah receptor with the 90-kDa heat shock protein." J Biol Chem **263**(27): 13802-5.

Peters, J. M., et al. (1999). "Amelioration of TCDD-induced teratogenesis in aryl hydrocarbon receptor (AhR)-null mice." <u>Toxicol Sci</u> **47**(1): 86-92.

Pewsey, E., C. Bruce, P. Tonge, C. Evans, Ow S. Y., A. S. Georgiou, P. C. Wright, P. W. Andrews and A. Fazeli (2010). "Nuclear proteome dynamics in differentiating embryonic carcinoma (NTERA-2) cells." <u>J Proteome Res</u> **9**(7):3412-26.

Phelan, D., G. M. Winter, W. J. Rogers, J. C. Lam and M. S. Denison (1998). "Activation of the Ah receptor signal transduction pathway by bilirubin and biliverdin." Arch Biochem Biophys **357**(1): 155-163.

Piao, H. L., Y. Yuan, M. Wang, Y. Sun, H. Liang and L. Ma (2014). " α -catenin acts as a tumour suppressor in E-cadherin-negative basal-like breast cancer by inhibiting NF- κ B signalling." <u>Nat Cell Biol</u> **16**(3):245-54.

Piccolo, S., S. Dupont and M. Cordenonsi (2014). "The Biology of YAP/TAZ: Hippo Signaling and Beyond." <u>Physiol Rev</u> **94**(4):1287-312.

Piestun, D., B. S. Kochupurakkal, J. Jacob-Hirsch, S. Zeligson, M. Koudritsky, E. Domany, N. Amariglio, G. Rechavi and D. Givol (2006). "Nanog transforms NIH3T3 cells and targets cell-type restricted genes." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> **343**(1):279–285.

Pikarsky, E., H. Sharir, E. Ben-Shushan and Y. Bergman (1994). "Retinoic acid represses Oct-3/4 gene expression through several retinoic acid-responsive elements located in the promoter–enhancer region." <u>Mol. Cell. Biol.</u> **14:** 1026–1038.

Pleasure, S. J., C. Page and V. M. Y. Lee (1992). "Pure, postmitotic, polarized neurons from embryonal carcinoma cells using a cell aggregation human neurons derived from Ntera 2 cells provide a system for expressing exogenous proteins in terminally differentiated neurons." J Neurosci 12 1802-1815.

Pohjanvirta, R. and J. Tuomisto (1994). "Short-term toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in laboratory animals: effects, mechanisms, and animal models." <u>Pharmacol Rev</u> **46**(4): 483-549.

Pohjanvirta, R., Ed. (2012). <u>The AH Receptor in Biology and Toxicology</u>. Ney Jersey, USA, John Wiley and Sons Inc.

Polak, P. and E. Domany (2006). "Alu elements contain many binding sites for transcription factors and may play a role in regulation of developmental processes." <u>BMC Genomics.</u> **7**: 133.

Poland, A., E. Glover, and A.S. Kende (1976). "Stereospecific, high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p- dioxin by hepatic cytosol. Evidence that the binding species is receptor for induction of aryl hydrocarbon hydroxylase." J Biol Chem **251**(16): 4936-4946.

Poland, A. and J. C. Knutson (1982). "2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity." <u>Annu Rev Pharmacol Toxicol</u> **22**: 517-54.

Pollenz, R. S., C. A. Sattler and A. Poland (1994). "The aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein show distinct subcellular localizations in Hepa 1c1c7 cells by immunofluorescence microscopy." <u>Mol Pharmacol</u> **45**(3): 428-38.

Pollenz, R. S. (1996). "The aryl-hydrocarbon receptor, but not the aryl-hydrocarbon receptor nuclear translocator protein, is rapidly depleted in hepatic and nonhepatic culture cells exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin." <u>Mol Pharmacol</u> **49**(3): 391-8.

Porter, W., F. Wang, R. Duan, C. Qin, E. Castro-Rivera, K. Kim and S. Safe (2001). "Transcriptional activation of heat shock protein 27 gene expression by 17beta-estradiol and modulation by antiestrogens and aryl hydrocarbon receptor agonists." <u>J Mol</u> <u>Endocrinol</u> **26**(1): 31-42.

Procopio, M., A. Lahm, A. Tramontano, L. Bonati and D. Pitea (2002). "A model for recognition of polychlorinated dibenzo-p-dioxins by the aryl hydrocarbon receptor." <u>Eur</u> <u>J Biochem</u> **269**(1): 13-8.

Prud'homme, G. J., Y. Glinka, A. Toulina, O. Ace, V. Subramaniam and S. Jothy (2010). "Breast cancer stem-like cells are inhibited by a non-toxic aryl hydrocarbon receptor agonist." <u>PLoS One</u> **5**(11):e13831.

Przyborski, S. A., I. E. Morton, A.Wood and P.W. Andrews (2000). "Developmental regulation of neurogenesis in the pluripotent human embryonal cell line NTERA-2." <u>Eur J Neurosci</u> **12**: 3521-3528.

Puga, A., J. Marlowe, S. Barnes, C. Y. Chang, A Maier., Z. Tan, J. K. Kerzee, X. Chang, M. Strobeck E. S. Knudsen. (2002). "Role of the aryl hydrocarbon receptor in cell cycle regulation." <u>Toxicology</u> **181-182**: 171-177.

Puga, A., C. R. Tomlinson and Y. Xia (2005). "Ah receptor signals cross-talk with multiple developmental pathways." <u>Biochem Pharmacol</u> **69**(2): 199-207.

Qin, H., K. Blaschke, G. Wei, Y. Ohi, L. Blouin, Z. Qi, J. Yu, R. F. Yeh, M. Hebrok and M. Ramalho-Santos (2012). "Transcriptional analysis of pluripotency reveals the Hippo pathway as a barrier to reprogramming." <u>Hum Mol Genet</u> **21**(9):2054-67.

Radzisheuskaya, A. and J. C. Silva (2014). "Do all roads lead to Oct4? the emerging concepts of induced pluripotency." <u>Trends Cell Biol</u> **24**(5):275-84.

Rawlins, E. L., T. Okubo, Y. Xue, D. M. Brass, R. L. Auten, H. Hasegawa, F. Wang and B. L. Hogan "The role of Scgb1a1+ Clara cells in the long-term maintenance and repair of lung airway, but not alveolar, epithelium." <u>Cell Stem Cell</u> **4**:525-534.

Ren, Y. F., G. Li, J. Wu, Y. F. Xue, Y. J. Song, L. Lv, X. J. Zhang and K. F. Tang (2012). "Dicer-Dependent Biogenesis of Small RNAs Derived from 7SL RNA." <u>PLoS</u> <u>One</u> **7**(7):e40705.

Rey-Barroso, J., A. Álvarez-Barrientos, E. Rico-Leo, M. Contador-Troca, J. M. Carvajal-González, A. Echarri, M. A. Del Pozo, P. M. Fernández-Salguero (2014). "The Dioxin receptor modulates Caveolin-1 mobilization during directional migration: role of cholesterol." <u>Cell Commun Signal</u> **12**(1):57.

Reyes, H., S. Reisz-Porszasz and O. Hankinson (1992). "Identification of the Ah receptor nuclear translocator protein (Arnt) as a component of the DNA binding form of the Ah receptor." <u>Science</u> **256**(5060): 1193-1195.

Reynolds, S. D., A. Giangreco, J. H. Power and B. R. Stripp (2000). "Neuroepithelial bodies of pulmonary airways serve as a reservoir of progenitor cells capable of epithelial regeneration " <u>Am J Pathol</u> **156**:269-278.

Richter, C. A., D. E. Tillitt and M. Hannink (2001). "Regulation of subcellular localization of the aryl hydrocarbon receptor (AhR)." <u>Arch.Biochem.Biophys.</u> **389**(2): 207-217.

Rico-Leo, E. M., A. Álvarez-Barrientos and P. M. Fernández-Salguero (2013). "Dioxin Receptor Expression Inhibits Basal and Transforming Growth Factor beta-induced Epithelial-to-mesenchymal Transition." J Biol Chem **288**(11): 7841-7856.

Roberts, B. J. and M. L. Whitelaw (1999). "Degradation of the basic helix-loophelix/Per-ARNT-Sim homology domain dioxin receptor via the ubiquitin/proteasome pathway." J Biol Chem **274**(51): 36351-6.

Rock, J. R., M. W. Onaitis, E. L. Rawlins, Y. Lu, C. P. Clark, Y. Xue, S. H. Randell and B. L.Hogan (2009). "Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **106**:12771–12775.

Rock, J. R., S. H. Randell and B. L. Hogan (2010). "Airway basal stem cells: a perspective on their roles in epithelial homeostasis and remodeling." <u>Dis Model Mech</u> **3**:545-556.

Rock, J. R., X. Gao, Y. Xue, S. H. Randell, Y. Y. Kong and B. L. Hogan (2011). "Notch-dependent differentiation of adult airway basal stem cells." <u>Cell Stem Cell</u> **8**:639-648.

Rodda, D.J., J.L. Chew, L.H. Lim, Y.H. Loh, B. Wang, H.H. Ng and P. Robson (2005). "Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2." J. Biol. Chem. **280**: 24731–24737.

Rodríguez, R. T., J. M. Velkey, C. Lutzko, R. Seerke, D. B. Kohn, K.S. O'Shea and M. T. Firpo (2007). "Manipulation of OCT4 levels in human embryonic stem cells results in induction of differential cell types." <u>Exp Biol Med</u> **232**: 1368-1380.

Román, A. C., D. A. Benitez, J. M. Carvajal-González and P. M. and Fernández-Salguero (2008). "Genome-wide B1 retrotransposon binds the transcription factors dioxin receptor and Slug and regulates gene expression in vivo." <u>Proc Natl Acad Sci U</u> <u>S A</u> **105**(5):1632-1637.

Román, A. C., J. M. Carvajal-González, E. M. Rico-Leo and P. M. Fernández-Salguero (2009). "Dioxin receptor deficiency impairs angiogenesis by a mechanism involving VEGF-A depletion in the endothelium and transforming growth factor-beta overexpression in the stroma." J Biol Chem 284(37):25135-48.

Román, A. C., J. M. Carvajal-González, E. M. Rico-Leo and P. M. Fernández-Salguero (2009). "Dioxin receptor deficiency impairs angiogenesis by a mechanism involving VEGF-A depletion in the endothelium and transforming growth factor-beta overexpression in the stroma." J Biol Chem 284(37): 25135-25148.

Román, A. C., F. J. González-Rico, E. Moltó, H. Hernando, A. Neto, C. Vicente-Garcia, E. Ballestar, J. L. Gómez-Skarmeta, J. Vavrova-Anderson, R. J. White, L. Montoliu and P. M. Fernández-Salguero (2011). "Dioxin receptor and SLUG transcription factors regulate the insulator activity of B1 SINE retrotransposons via an RNA polymerase switch." <u>Genome Res.</u> **21:** 422-432.

Rowlands, J. C. and J. A. Gustafsson (1997). "Aryl hydrocarbon receptor-mediated signal transduction." <u>Crit Rev Toxicol</u> **27**(2): 109-34.

Rubin, C. M., C. M. Houck, P. L. Deininger, T. Friedmann and C. W. Schmid (1980). "Partial nucleotide sequence of the 300-nucleotide interspersed repeated human DNA sequences." <u>Nature</u> **284**: 372–374.

Sadek, C. M. and B. L. Allen-Hoffmann (1994). "Cytochrome P450IA1 is rapidly induced in normal human keratinocytes in the absence of xenobiotics." <u>J Biol Chem</u> **269**(23): 16067-74.

Safe, S., F. Wang, W. Porter, R. Duan and A. McDougal (1998). "Ah receptor agonists as endocrine disruptors: antiestrogenic activity and mechanisms." <u>Toxicol Lett</u> **102-103**: 343-347.

Santiago-Josefat, B., E. Pozo-Guisado, S. Mulero-Navarro and P. M. Fernández-Salguero (2001). "Proteasome inhibition induces nuclear translocation and transcriptional activation of the dioxin receptor in mouse embryo primary fibroblasts in the absence of xenobiotics." <u>Mol Cell Biol</u> **21**(5): 1700-9.

Santiago-Josefat, B. and P. M. Fernández-Salguero (2003). "Proteasome inhibition induces nuclear translocation of the dioxin receptor through an Sp1 and protein kinase C-dependent pathway." J Mol Biol **333**(2): 249-60.

Santiago-Josefat, B., S. Mulero-Navarro, S. L. Dallas and P. M. Fernández-Salguero (2004). "Overexpression of latent transforming growth factor-{beta} binding protein 1 (LTBP-1) in dioxin receptor-null mouse embryo fibroblasts." <u>J Cell Sci</u> **117**(Pt 6):849-859.

Savouret, J. F., M. Antenos, M. Quesne, J. Xu, E. Milgrom and R. F. Casper (2001). "7-Ketocholesterol Is an Endogenous Modulator for the Aryl hydrocarbon Receptor." <u>J.</u> <u>Biol. Chem.</u> **276**(5): 3054-3059.

Schaldach, C. M., J. Riby and L. F. Bjeldanes (1999). "Lipoxin A4: a new class of ligand for the Ah receptor." <u>Biochemistry</u> **38**(23): 7594-7600.

Schmid, C. W. (1998). "Does SINE evolution preclude Alu function?" <u>Nucleic Acids</u> <u>Res</u> 26: 4541-50.

Schmidt, J. V., G. H. Su, J. K. Reddy, M. C. Simon, C. A. Bradfield (1996). Characterization of a murine Ahr null allele: Involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **93**(13): 6731-6736. Schoorlemmer, J., A. van Puijenbroek, M. van Den Eijnden, L. Jonk, C. Pals and W.Kruijer (1994). "Characterization of a negative retinoic acid response element in the murine Oct4 promoter." <u>Mol. Cell. Biol.</u> **14:** 1122–1136.

Septer, S., G. Edwards, S. Gunewardena, A. Wolfe, H. Li, J. Daniel and U. Apte (2012). "Yes-associated protein is involved in proliferation and differentiation during postnatal liver development." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **302**(5):G493-503.

Sharan, K., J. S. Mishra, G. Swarnkar, J. A. Siddiqui, K. Khan, R. Kumari, P. Rawat, R. Maurya, S. Sanyal and N. Chattopadhyay (2011). "A novel quercetin analogue from a medicinal plant promotes peak bone mass achievement and bone healing after injury and exerts an anabolic effect on osteoporotic bone: the role of aryl hydrocarbon receptor as a mediator of osteogenic action." J Bone Miner Res **26**(9):2096-111.

Shen-Orr, S. S., R. Milo, S. Mangan and U. Alon (2002). "Network motifs in the transcriptional regulation network of Escherichia coli." <u>Nat. Genet.</u> **31**: 64–68.

Shimizu, Y., Y. Nakatsuru, M. Ichinose, Y. Takahashi, H. Kume, J. Mimura, Y. Fujii-Kuriyama and T. Ishikawa (2000). "Benzo[a]pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(2): 779-82.

Shor B., J. Wu, Q. Shakey, L. Toral-Barza, C. Shi, M. Follettie and K. Yu (2010). "Requirement of the mTOR Kinase for the Regulation of Maf1 Phosphorylation and Control of RNA Polymerase III-dependent Transcription in Cancer Cells." <u>J Biol Chem</u> **285**(20):15380-92.

Sieweke, M. H. and T. Graf (1998). "A transcription factor party during blood cell differentiation. Current opinion in genetics & development." **8**: 545-551.

Sinal, C. J. and J. R. Bend (1997). "Aryl Hydrocarbon Receptor-Dependent Induction of Cyp1a1 by Bilirubin in Mouse Hepatoma Hepa 1c1c7 Cells." <u>Mol Pharmacol</u> **52**(4): 590-599.

Singer, M. F. (1982). "Highly repeated sequences in mammalian genomes." <u>Int. Rev.</u> <u>Cytol</u>. **76**: 67–112.

Singh, S. S., N. G. Hord and G. H. Perdew (1996). "Characterization of the activated form of the aryl hydrocarbon receptor in the nucleus of HeLa cells in the absence of exogenous ligand." <u>Arch Biochem Biophys</u> **329**(1): 47-55.

Song, Z. and R. S. Pollenz (2002). "Ligand-dependent and independent modulation of aryl hydrocarbon receptor localization, degradation, and gene regulation." <u>Mol</u> <u>Pharmacol</u> **62**(4): 806-16.

Song, H., E. Yao, C. Lin, R. Gacayan, M. H. Chen and P. T. Chuang (2012). "Functional characterization of pulmonary neuroendocrine cells in lung development, injury, and tumorigenesis." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **109**:17531-17536.

Sonnenfeld, M., M. Ward, G. Nystrom, J. Mosher, S. Stahl and S. Crews (1997). "The Drosophila tango gene encodes a bHLH-PAS protein that is orthologous to mammalian Arnt and controls CNS midline and tracheal development." <u>Development</u> **124**(22): 4571-82.

Soprano, D. R. and K. J. Soprano (2003). "Pharmacological doses of some synthetic retinoids can modulate both the aryl hydrocarbon receptor and retinoid receptor pathways." J Nutr **133**(1):277S-281S.

Soufi, A., G. Donahue and K.S. Zaret (2012). "Facilitators and impediments of the pluripotency reprogramming factors' initial engagement with the genome." <u>Cell</u> **151**: 994–1004.

Steinberg, T. H., D. E. Mathews, R. D. Durbin and R. R. Burgess (1990). "Tagetitoxin: a new inhibitor of eukaryotic transcription by RNA polymerase III." <u>J Biol Chem</u> **265**(1):499–505.

Sterneckert, J., S. Höing and H. R. Schöler (2012). "Concise Review: Oct4 and More: The Reprogramming Expressway." <u>Stem Cells</u> **30**: 15-21.

Stopp, S., M. Bornhäuser, F. Ugarte, M. Wobus, M. Kuhn, S. Brenner and S.Thieme (2013). "Expression of the melanoma cell adhesion molecule in human mesenchymal stromal cells regulates proliferation, differentiation, and maintenance of hematopoietic stem and progenitor cells." <u>Haematologica</u> **98**(4):505-13.

Straßburger, K., M. Tiebe, F. Pinna, K. Breuhahn and A. A. Teleman (2012). "Insulin/IGF signaling drives cell proliferation in part via Yorkie/YAP." <u>Dev Biol</u> **367**(2):187-96.

Sylvester, I. and H.R. Schöler (1994). "Regulation of the Oct-4 gene by nuclear receptors." <u>Nucleic Acids Res.</u> **22**: 901–911.

Takahashi, K. and S. Yamanaka (2006). "Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors." <u>Cell</u> **126**(4):663-76.

Tam, O. H., A. A. Aravin, P. Stein, A. Girard, E. P. Murchison, S. Cheloufi, E. Hodges, M. Anger, R. Sachidanandam, R. M. Schultz and G. J. Hannon (2008). "Pseudogene-derived small interfering RNAs regulate gene expression in mouse oocytes." <u>Nature</u> 453: 534-538.

Tan, G. S., C. H. Chiu, B. G. Garchow, D. Metzler, S. L. Diamond and M. Kiriakidou (2012). "Small molecule inhibition of RISC loading." <u>ACS Chem Biol</u> **7**(2):403-10.

Tan, Z., X. Chang, A. Puga and Y. Xia (2002). "Activation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) by aromatic hydrocarbons: role in the regulation of aryl hydrocarbon receptor (AHR) function." <u>Biochem Pharmacol</u> **64**(5-6): 771-780.

Tang, F., M. Kaneda, D. O'Carroll, P. Hajkova, S. C. Barton, Y. A. Sun, C. Lee, A. Tarakhovsky, K. Lao, and M. A. Surani (2007). "Maternal microRNAs are essential for mouse zygotic development." <u>Genes Dev</u>. 2N1: 644-648.

Tantin, D. (2013). "Oct transcription factors in development and stem cells: insights and mechanisms." <u>Development</u> **140**: 2857–2866.

Tata, P. R., H. Mou, A. Pardo-Saganta, R. Zhao, M. Prabhu, B. M. Law, V. Vinarsky, J. L. Cho, S. Breton, A. Sahay, B. D. Medoff and J. Rajagopal (2013). "Dedifferentiation of committed epithelial cells into stem cells in vivo." <u>Nature</u> **503**:218-223.

Thackaberry, E. A., D. M. Gabaldon, M. K. Walker and S. M. Smith (2002). "Aryl hydrocarbon receptor null mice develop cardiac hypertrophy and increased hypoxia-inducible factor-1alpha in the absence of cardiac hypoxia." <u>Cardiovasc Toxicol</u> **2**(4): 263-274.

Thornton, J. E. and R. I. Gregory (2014). "How does Lin28 let-7 control development and disease?" <u>Trends Cell Biol</u> **22**(9):474-82.

Tian, Y., S. Ke, M. S. Denison, A. B. Rabson and M. A. Gallo (1999). "Ah receptor and NF-kappaB interactions, a potential mechanism for dioxin toxicity." J Biol Chem **274**(1): 510-5.

Tijet, N., P. C. Boutros, I. D. Moffat, A. B. Okey, J. Tuomisto and R. Pohjanvirta (2006). "Aryl hydrocarbon receptor regulates distinct dioxin-dependent and dioxin-independent gene batteries." <u>Mol Pharmacol</u> **69**(1): 140-153.

Tsang, H., T. Y. Cheung, S. P. Kodithuwakku, J. Chai, W. S. Yeung, C. K. Wong and K. F. Lee (2012). "2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) suppresses spheroids attachment on endometrial epithelial cells through the down-regulation of the Wnt-signaling pathway." <u>Reprod Toxicol</u> **33**(1):60-6.

Tumaneng, K., R. C. Russell and K. L. Guan (2012a). "Organ size control by Hippo and TOR pathways." <u>Curr Biol</u> **22**(9):R368-79.

Tumaneng, K., K. Schlegelmilch, R. C. Russell, D. Yimlamai, H. Basnet, N. Mahadevan, J. Fitamant, N. Bardeesy, F. D. Camargo and K. L. Guan (2012b). "YAP mediates crosstalk between the Hippo and PI(3)K–TOR pathways by suppressing PTEN via miR-29." <u>Nat Cell Biol</u> **14**(12):1322-9.

Ule, J. (2013). "Alu elements: at the crossroads between disease and evolution." <u>Biochem Soc Trans</u> **41**(6):1532-5.

van den Berg, D.L., T. Snoek, N.P. Mullin, A. Yates, K. Bezstarosti, J. Demmers, I. Chambers and R.A. Poot (2010). "An Oct4-centered protein interaction network in embryonic stem cells." <u>Cell Stem Cell</u> **6** 369–381.

Varelas, X., B. W. Miller, R. Sopko, S. Song, A. Gregorieff, F. A. Fellouse, R. Sakuma, T. Pawson, W. Hunziker, H. McNeill, J. L. Wrana and L. Attisano (2010). "The Hippo pathway regulates Wnt/beta-catenin signaling." <u>Dev Cell</u> **18**(4):579-91.

Varelas, X. and J. L. Wrana (2012). "Coordinating developmental signaling: novel roles for the Hippo pathway." <u>Trends Cell Biol</u> **22**(2):88-96.

Volckaert, T. and S. De Langhe (2014). "Lung epithelial stem cells and their niches: Fgf10 takes center stage." <u>Fibrogenesis Tissue Repair</u> **7**:8.

von Figura, G., J. P. Morris, C. V. Wright and M. Hebrok (2013). "Nr5a2 maintains acinar cell differentiation and constrains oncogenic Kras-mediated pancreatic neoplastic initiation." <u>Gut</u> **63**(4):656-64.

Wang, F., I. Samudio and S. Safe (2001). "Transcriptional activation of cathepsin D gene expression by 17[beta]-estradiol: mechanism of aryl hydrocarbon receptor-mediated inhibition." Molecular and Cellular Endocrinology **172**(1-2): 91-103.

Wang, J., S. Rao, J. Chu, X. Shen, D. N. Levasseur, T. W. Theunissen and S. H. Orkin (2006). "A protein interaction network for pluripotency of embryonic stem cells." <u>Nature</u> **444**(7117):364–368.

Wang, J., D. N. Levasseur and S. H. Orkin (2008). "Requirement of Nanog dimerization for stem cell self-renewal and pluripotency." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **105**(17):6326–6331.

Wang, M. L., S. H. Chiou and C. W. Wu (2013). Targeting cancer stem cells: emerging role of Nanog transcription factor. <u>Onco Targets Ther</u> **6**:1207-20.

Watanabe, T., Y. Totoki, A. Toyoda, M. Kaneda, S. Kuramochi-Miyagawa, Y. Obata, H. Chiba, Y. Kohara, T. Kono, T. Nakano, M. A Surani, Y. Sakaki and H. Sasaki (2008). "Endogenous siRNAs from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in mouse oocytes." <u>Nature</u> **453**: 539-543.

Wei, Y. D., H. Helleberg, U. Rannug and A. Rannug (1998). "Rapid and transient induction of CYP1A1 gene expression in human cells by the tryptophan photoproduct 6-formylindolo[3,2-b]carbazole." <u>Chem Biol Interact</u> **110**(1-2): 39-55.

Weiss, C., S. K. Kolluri, F. Kiefer and M. Göttlicher (1996). "Complementation of Ah receptor deficiency in hepatoma cells: negative feedback regulation and cell cycle control by the Ah receptor." <u>Exp Cell Res</u> **226**(1): 154-163.

Wen, J., J. Y. Park, K. H. Park, H. W. Chung, S. Bang, S. W. Park and S. Y. Song (2010). "Oct4 and Nanog expression is associated with early stages of pancreatic carcinogenesis." <u>Pancreas</u> **39**(5): 622-626.

Whitlock, J. P., Jr. (1999). "Induction of cytochrome P4501A1." <u>Annu Rev Pharmacol</u> <u>Toxicol</u> 39:103-125.

Whitlock, J. P., Jr. (1999). "Induction of cytochrome P4501A1." <u>Annu Rev Pharmacol</u> <u>Toxicol</u> **39**: 103-25.

Wilhelmsson, A., S. Cuthill, M. Denis, A. C. Wikstrom, J. A. Gustafsson and L. Poellinger (1990). "The specific DNA binding activity of the dioxin receptor is modulated by the 90 kd heat shock protein." <u>EMBO J</u> 9(1): 69-76.

Willoughby, D. A., A. Vilalta and R. G. Oshima (2000). "An Alu element from the K18 gene confers position-independent expression in transgenic mice." J Biol Chem **275**(2):759-68.

Wormke, M., M. Stoner, B. Saville and S. Safe (2000). "Crosstalk between estrogen receptor alpha and the aryl hydrocarbon receptor in breast cancer cells involves unidirectional activation of proteasomes." <u>FEBS Lett</u> **478**(1-2): 109-112.

Wu, P. Y., Y. F. Liao, H. F. Juan, H. C. Huang, B. J. Wang, Y. L. Lu, I. S. Yu, Y. Y. Shih, Y. M. Jeng, W. M. Hsu and H. Lee (2014). "Aryl hydrocarbon receptor downregulates MYCN expression and promotes cell differentiation of neuroblastoma." <u>PLoS One</u> **9**(2):e88795.

Xu, N., T. Papagiannakopoulos, G. Pan, J.A. Thomson and K.S. Kosik (2009). "MicroRNA-145 regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and represses pluripotency in human embryonic stem cells." <u>Cell</u> **137:** 647–658.

Yang, X., D. Liu, T. J. G. C. Murray, Mitchell, E.V. Hesterman, S. I. Karchner, R. R. Merson, M. E. Hahn and D. H. Sherr (2005). "The aryl hydrocarbon receptor constitutively represses c-myc transcription in human mammary tumor cells." <u>Oncogene</u> 24(53): 7869-7881.

Ye, X., Y. Deng and Z. C. Lai (2012). "Akt is negatively regulated by Hippo signaling for growth inhibition in Drosophila." <u>Dev Biol</u> **369**(1):115-23.

Young, R.A. (2011). "Control of the embryonic stem cell state." <u>Cell</u> **144:** 940–954. Yu, H., Y. Du, X. Zhang, Y. Sun, S. Li, Y. Dou, Z. Li, H. Yuan and W. Zhao. "The aryl hydrocarbon receptor suppresses osteoblast proliferation and differentiation through the activation of the ERK signaling pathway." <u>Toxicol Appl Pharmacol</u> S0041-008X(14)00317-2.

Yuan, Q., K. Loya, B. Rani, S. Möbus, A. Balakrishnan, J. Lamle, T. Cathomen, A. Vogel, M. P. Manns, M. Ott, T. Cantz and A. D. Sharma (2013). "MicroRNA-221 overexpression accelerates hepatocyte proliferation during liver regeneration." <u>Hepatology</u> **57**(1):299-310.

Zaher, H., P. M. Fernández-Salguero, J. Letterio, M. S. Sheikh, A. J. Fornace Jr, A. B. Roberts, and F. J. González (1998). "The involvement of aryl hydrocarbon receptor in the activation of transforming growth factor-beta and apoptosis." <u>Mol Pharmacol</u> **54**(2): 313-321.

Zarogoulidis, P., S. Lampaki, J. F. Turner, H. Huang, S. Kakolyris, K. Syrigos and K. Zarogoulidis (2014). "mTOR pathway: A current, up-to-date mini-review (Review)." <u>Oncol Lett</u> **8**(6):2367-2370.

Zhao, B., L. Li, K. Tumaneng, C. Y. Wang and K. L. Guan (2010). "A coordinated phosphorylation by Lats and CK1 regulates YAP stability through SCF (beta-TRCP)." <u>Genes Dev</u> **24**: 72-85.

Zhao, B., K. Tumaneng and K. L. Guan (2011). "The Hippo pathway in organ size control, tissue regeneration and stem cell self-renewal." <u>Nat Cell Biol</u> **13**(8):877-83. Zhao, F.Q. (2013). "Octamer-binding transcription factors: genomics and functions." <u>Front. Biosci.</u> (Landmark Ed) **18**: 1051–1071.

Zhou, J., S. B. Ng and W. J. Chng (2013). "LIN28/LIN28B: an emerging oncogenic driver in cancer stem cells." Int J Biochem Cell Biol **45**(5):973-8.

Zhou, X., Y. P. Zhou, G. R. Huang, C. Liu, H. M. Sui, S. J. Wu, J. Zhou, Y. Q. Ding and J. Li (2011). "Expression of the stem cell marker, Nanog, in human endometrial adenocarcinoma." Int J Gynecol Pathol **30**(3):262-270.

Zhu, C., Y. L. Chen, X. J. Wang, X. S. Hu, Z. B. Yu and S. P. Han (2012). "ShRNAmediated gene silencing of AHR promotes the differentiation of P19 mouse embryonic carcinoma cells into cardiomyocytes." <u>Mol Med Rep</u> 6(3):513-8. Zodrow, J. M. and R. L. Tanguay (2003). "2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin inhibits zebrafish caudal fin regeneration." <u>Toxicol Sci</u> **76**(1):151-61.