



Departamento de Bioquímica

Identificación bioquímica, genética y funcional de genes  
implicados en la potencialidad de células germinales

Diego Sainz de la Maza Redondo

Madrid, 2016

Departamento de Bioquímica

Facultad de Medicina

Universidad Autónoma de Madrid

Identificación bioquímica, genética y funcional de genes implicados en la  
potencialidad de células germinales

Tesis doctoral realizada por Diego Sainz de la Maza Redondo, licenciado en  
Bioquímica

Trabajo dirigido por la Dra. María Paz de Miguel González y por el Dr.  
Francisco Arnalich Montiel

Estudio realizado en el Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital  
Universitario La Paz (IdiPAZ)

**AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES DE TESIS PARA SU  
PRESENTACIÓN**



MARÍA PAZ DE MIGUEL GONZÁLEZ, Doctora en Ciencias Biológicas y Directora del Grupo de Ingeniería Celular del Instituto de Investigación del Hospital Universitario La Paz de Madrid

FRANCISCO ARNALICH MONTIEL, Doctor en Medicina y Doctor Adjunto del Hospital Universitario Ramón y Cajal.

CERTIFICAN QUE:

DIEGO SAINZ DE LA MAZA REDONDO, con DNI 50757636-V, Licenciado en Bioquímica por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado: "Identificación bioquímica, genética y funcional de genes implicados en la potencialidad de células germinales" y que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para su exposición y defensa como tesis doctoral.

Para que conste y surta los efectos oportunos, firman el presente certificado.

Madrid, a 25 de noviembre de 2016.

Fdo.: Dra. María Paz de Miguel González

Fdo.: Dr. Francisco Arnalich Montiel

# *Agradecimientos*

El presente trabajo ha podido ser llevado a cabo gracias a la ayuda de mucha gente, que ha contribuido de una manera u otra a la realización de esta tesis doctoral. Por ese motivo, me gustaría expresar mi agradecimiento a las siguientes personas:

A todos mis compañeros de unidad por su disposición a resolver mis dudas y a ofrecer ayuda, por el préstamo de reactivos *in extremis* y por hacer tan llevaderas las tardes de cultivos y de citómetro. Gracias en especial a Enrique, Aníbal, Víctor, Jose, Berta, Laura, Jaime, María, Belén, Dani, Vir, Nuria, Lara, Pachi, Clara, Mayte, Bea, Gema y Gonzalo. Este camino habría sido mucho más agotador sin vosotros. Gracias también a Rafa, de Electromedicina, por mimar tanto y tan bien mi incubador. Gracias también a Henar por su ayuda con el microscopio confocal y a Luis por su talento creativo.

A mis amigos por aguantar mis repetidas ausencias y mis tempranas retiradas. Gracias también por soportar el continuo monotema de la tesis y por preocuparos siempre por cómo iba mi trabajo. Gracias por contagiarme vuestra alegría y por ofrecerme vuestro apoyo cuando ha sido necesario. Todo es un poco más fácil si estáis cerca, ya podéis presumir de haber contribuido a tener un amigo doctor.

A un grupo especial de amigos, que han sido mis compañeros de laboratorio, un grupo maravilloso de luchadores y de profesionales como la copa de un pino. Ha sido un placer compartir tantas horas con vosotros. Gracias a Max por ser el primero en sentarse conmigo a diseñar un experimento, a Pili por mostrarme los pasos que habría de seguir yo después y a Fátima por tener siempre una solución para todo y por darme tantos ánimos, se te echa de menos. Gracias a las últimas incorporaciones por su increíble ayuda y por mostrarme que las nuevas generaciones harán muy buena ciencia si les dejan, he aprendido mucho gracias a vosotros. De entre ellos, gracias a Rober, a Cris y en especial a Adri por su gran capacidad de trabajo y por su compañerismo. Gracias también a Diana por no dejar un minuto de silencio y por convertir el laboratorio de Ingeniería Celular en una carcajada continua. También querría expresar un agradecimiento especial al Dr. Yago Alcaina por ser un profesor tan genial y por ofrecerme un pedazo de su enorme generosidad. Sin tu ayuda ni tus enseñanzas esta tesis no habría sido posible, te deseo la mejor de las suertes. Finalmente, querría darle las gracias a la Dra. Sherezade Fuentes, mi brazo derecho durante estos años y una gran amiga. Considero un honor haberte visto crecer como científica durante estos años, gran parte de lo que he aprendido se debe a tu tesón y a tu inteligencia. Nos veremos en los festivales por el mundo.

Gracias también a mis directores de tesis, por la oportunidad que me han brindado de poder dedicarme a mi pasión. Gracias al Dr. Francisco Arnalich Montiel por sus desvelos ocasionales para que pudiera continuar en el laboratorio. Pero sobre todo, gracias a la Dra. María Paz de Miguel González. Gracias por tener la puerta abierta para resolver mis dudas y por ofrecer siempre un par de manos cuando el volumen de trabajo comenzaba a desbordar. En especial, gracias por la confianza depositada en mí, que se ha dejado notar y que me ha ayudado a seguir adelante durante estos años.

Gracias también a todos los que comenzaron este largo camino conmigo hace muchos años pero que no lo verán acabar. El imaginar lo orgullosos que se habrían sentido mis abuelos y mi tía al verme defender esta tesis ha sido una fuente de inspiración muy importante.

Muchas gracias a la persona que apareció en mi vida días después de firmar mi contrato predoctoral. Gracias, Laura, por haber estado a mi lado y por haberme contagiado tu increíble fortaleza y tu vitalidad. Gracias por haber llenado de felicidad cada uno de los días de estos años, por haber sido mi pareja, amiga y confidente, y por haberme enriquecido con tantos conocimientos ajenos a mi campo. Gracias también por ser el motivo principal de querer hacer un buen trabajo todos los días y el de querer acabar la jornada de laboratorio cuanto antes. Me llevo inolvidables recuerdos a tu lado y espero compartir aún muchos más.

Y finalmente, gracias a los que llevan toda la vida conmigo y que me han hecho ser la persona que soy ahora. Gracias a mi hermano Miguel, que a pesar de ser más joven siempre ha sido para mí un ejemplo de honradez, madurez e inteligencia. Gracias por tus continuas tomaduras de pelo, por tu gran humor y por esa complicidad que hemos desarrollado después de pasar tanto tiempo juntos y que hace el día a día mucho más fácil. Tengo mucha suerte de tenerte como hermano. Gracias a mis padres, por ser unos luchadores infatigables, por no haberme negado nunca su ayuda, por haberme apoyado en todas las decisiones que he ido tomando, por haber tenido tanta fe en mí, por ser un ejemplo moral e intelectual, por haberme transmitido tanto amor y por hacerme sentir orgulloso cada día de ser su hijo. Esta tesis es también vuestra.

*“Como el entomólogo a la caza de mariposas de vistosos matices, mi atención perseguía, en el vergel de la substancia gris, células de formas delicadas y elegantes, las misteriosas mariposas del alma, cuyo batir de alas quién sabe si esclarecerá algún día el secreto de la vida mental.”*

Santiago Ramón y Cajal

*“Todas las olas del mar deben la belleza de su perfil a las que les precedieron y se retiraron”*

André Gide

# *Resumen*



La obtención de células troncales pluripotentes inducidas ha supuesto un gran avance científico. Sin embargo, la baja eficiencia de su obtención y la falta de conocimiento acerca de los fundamentos moleculares implicados en la adquisición de pluripotencia han retrasado la aplicación de esta tecnología a la práctica clínica.

Para esclarecer los mecanismos implicados en la reprogramación celular, el presente trabajo utilizó células germinales primordiales (PGCs) de ratón, que conservan una estrecha relación con la pluripotencia. En primer lugar, las PGCs expresan factores relacionados con la pluripotencia, como Oct4, Sox2, Nanog y Lin28. Además, las PGCs, que normalmente dan lugar únicamente a los gametos, son capaces de reprogramarse hacia células germinales embrionarias (EGCs), de tipo pluripotente, al ser cultivadas en presencia de bFGF o de tricostatina A. Finalmente, al ser cultivadas en condiciones de hipoxia, las PGCs dan lugar a células reprogramadas capaces de diferenciarse *in vitro* hacia las tres hojas embrionarias y de integrarse en mórulas en desarrollo. Sin embargo, las células generadas por exposición a hipoxia no son capaces de expandirse en cultivo, probablemente por su negatividad para Klf4 y c-Myc.

Los resultados recogidos en esta tesis doctoral muestran que tanto el metabolismo energético como la autofagia o la modificación epigenética entre otros procesos, intervienen en la reprogramación de las PGCs y son capaces de inducirla mediante el uso de factores solubles. Las células obtenidas mediante el uso de estos factores reprogramadores son capaces de dar lugar a las 3 hojas embrionarias *in vitro*. Sin embargo, las células obtenidas son negativas para Klf4 y/o c-Myc y no pueden mantenerse en cultivo a largo plazo. La inducción de pluripotencia mediante los diversos compuestos reprogramadores converge en un pico esporádico de expresión de HIF1 $\alpha$  y en la pérdida progresiva de la expresión de HIF2 $\alpha$ . Además, se aprecia un mayor número de mitocondrias inactivas y una desregulación en los niveles de Oct4 dependiente de HIF. La alteración del metabolismo energético y del estado epigenético aumenta la capacidad proliferativa de las células reprogramadas, que muestran positividad para c-Myc, pero no para Klf4, y que igualmente no alcanzan la capacidad de autorrenovación indefinida.

En conclusión, la reprogramación de PGCs implica una reestructuración celular, metabólica y epigenética que converge en la expresión temporal de HIF1 $\alpha$  y en la pérdida de HIF2 $\alpha$ , lo cual desemboca en la alteración de los niveles de Oct4 y en la reprogramación metabólica hacia un perfil glicolítico. Las células reprogramadas obtenidas no alcanzan un fenotipo reprogramado completo, ya que aunque presentan capacidad pluripotente dando lugar a células de las tres hojas embrionarias, no poseen una capacidad plena de autorrenovación.

# *Summary*

The generation of induced pluripotent stem cells represents a major scientific breakthrough. However, the low efficiency of their derivation and the lack of understanding of the molecular pathways involved in the acquisition of pluripotency have delayed the application of this technology into clinical practice.

In order to unfold the mechanisms involved in cell reprogramming, this study utilized mouse primordial germ cells (PGCs), which indirectly store pluripotency. Firstly, PGCs express transcription factors associated to pluripotency, such as Oct4, Sox2, Nanog and Lin28. Secondly, PGCs, which normally only give rise to gametes, are able to reprogram towards pluripotent embryonic germ cells (EGCs) when cultured with bFGF and trichostatin A. Also, when cultured under hypoxic conditions, PGCs reprogram into cells able to differentiate *in vitro* towards the three germ layers and to integrate *in vivo* into developing morulae. However, these hypoxia-derived cells are not able to expand indefinitely *in vitro*, probably because of their lack of expression of Klf4 and c-Myc.

Results included in this study show that energetic metabolism, autophagy or epigenetic state among others intervene in PGCs reprogramming and are able to induce it using soluble factors. Cells derived using these reprogramming factors are able to differentiate into the three germ layers *in vitro*. However, these reprogrammed cells are also Klf4 and/or c-Myc-negative and cannot be maintained indefinitely in culture. Induction of pluripotency using these reprogramming factors shares some common features: a peak of expression of HIF1 $\alpha$  and the progressive loss of HIF2 $\alpha$ . In addition, a larger number of inactive mitochondria and a HIF-dependent Oct4 levels deregulation are observed. Also, alteration of energetic metabolism and epigenetic state enhance the proliferative capacity of reprogrammed cells, which become c-Myc-positive but remain Klf4-negative and do not acquire full self-renewal capacity.

In conclusion, PGCs reprogramming involves cell, metabolic and epigenetic rearrangements, which lead to temporary expression of HIF1 $\alpha$ , loss of HIF2 $\alpha$ , Oct4 deregulation and metabolic reprogramming towards a glycolytic profile. Reprogrammed cells do not reach a complete reprogrammed phenotype, since they do not show a full self-renewal capacity although they are able to give rise to cells of the three germ layers.

# *Índice*

<b>Resumen</b>	<b>3</b>
<b>Summary</b>	<b>7</b>
<b>Índice</b>	<b>10-12</b>
<b>Clave de abreviaturas</b>	<b>14-18</b>
<b>Introducción</b>	
Potencialidad y reprogramación	20-22
Dificultades en la utilización de iPSCs	22-23
Modificaciones a la obtención de iPSCs	23-25
PGCs	25-29
Hipoxia y reprogramación	29-36
Hipoxia y diferenciación	36-38
Hipoxia y proliferación	38-39
<b>Objetivos</b>	<b>43</b>
<b>Materiales y métodos</b>	
Animales de experimentación	46-47
Genotipado de animales de experimentación	47-48
Cultivo celular	
<i>Células STO</i>	48-49
<i>Inactivación mitótica de las células STO</i>	49
<i>Aislamiento y cultivo de PGCs</i>	49-51
<i>Pase de PGCs</i>	51
<i>Utilización de otras líneas celulares</i>	51-52
Factores solubles	52-53
Identificación de PGCs y células reprogramadas	53-54
Análisis estadístico	54
Estudio de la expresión génica en PGCs y hiEGLs por RT-PCR	
cuantitativa (RT-qPCR)	54-57
Inmunofluorescencias	57-60
Citometría de flujo	60-61
Cuerpos embrioides	61-62
<b>Resultados</b>	
La hipoxia conduce a un fenotipo pluripotente poco robusto	64-65
La reprogramación de PGCs implica una reprogramación metabólica	65-74

HIF1 es necesario para la reprogramación de PGCs	74-77
Gsk3 $\beta$ interviene en la proliferación de las PGCs reprogramadas	77-78
Akt podría favorecer la proliferación de las PGCs reprogramadas	79
La autofagia es necesaria para la reprogramación de PGCs	79-82
Las especies reactivas de oxígeno disminuyen en hipoxia pero su eliminación no induce la reprogramación	82-83
La señalización por PKCs no clásicas interviene en la reprogramación de PGCs	83-87
Las modificaciones epigenéticas intervienen en la reprogramación de las PGCs y aumentan su proliferación en condiciones de hipoxia	87-91
Los compuestos reprogramadores son capaces de inducir pluripotencia <i>in vitro</i>	91-97
DCA, Resv, PIP y VPA inducen la expresión de HIF1 $\alpha$ en normoxia y ningún compuesto reprogramador es capaz de mantener la expresión de HIF2 $\alpha$	98-102
El cultivo en presencia de DCA, Resv, PIP y VPA provoca un cambio en el perfil metabólico y en los niveles de Oct4 equivalentes a los observados en hiEGLs	103-105
Ninguno de los compuestos reprogramadores consigue inducir la autorrenovación de las PGCs reprogramadas	105-111
<b>Discusión</b>	
La reprogramación de las PGCs muestra una predominancia del metabolismo glicolítico sobre el oxidativo manteniendo una cierta bivalencia	114-117
El flujo glicolítico contribuye a la reprogramación en hipoxia pero no en normoxia	117-118
La autofagia es necesaria para la reprogramación de PGCs	118-121
La inhibición de la translocación de PKC $\epsilon$ induce la reprogramación de las PGCs	121-122
Varias modificaciones epigenéticas son capaces de reprogramar las PGCs y de aumentar su capacidad de proliferación	122-125
Las PGCs reprogramadas con DCA, Resv, PIP y VPA comparten el patrón de expresión de HIFs con las hiEGLs	125-127

El cultivo de PGCs en hipoxia muestra una mayor proliferación tras la adición de CHIR, Tranil, DASA y SC79 sin llegar a alcanzar la capacidad de autorrenovación ilimitada	127-129
La ruta Akt podría estar implicada en la positividad observada para c-Myc	129-130
Modelo mecanístico propuesto	130-132
<b>Conclusiones</b>	<b>135</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>138-161</b>
<b>Artículos</b>	
Hypoxia Induces Pluripotency in Primordial Germ Cells by HIF1a Stabilization and Oct4 Deregulation (artículo original)	
Cell Metabolism Under Microenvironmental Low Oxygen Tension Levels in Stemness, Proliferation and Pluripotency (revisión)	

## *Clave de abreviaturas*



2i: Inhibidores de Gsk3 $\beta$  y MEK.

ATP: Adenosín trifosfato.

bFGF: Factor de crecimiento de fibroblastos básico.

Blimp-1: B lymphocyte-induced maturation protein-1

BMP4: Proteína morfogenética del hueso 4.

BSA: Albúmina de suero bovino.

CCCP: Carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona.

CDK: Kinasa dependiente de ciclina.

CSCs: Células troncales del cáncer.

DAG: Diacilglicerol.

DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol.

DCA: Dicloroacetato

DE: Enhacer distal.

DMOG: Dimetil oxalil glicina.

DMSO: Dimetil sulfóxido.

Dnm1: Dinamina 1.

Dnmt: Metiltransferasa de DNA.

Dpc: días *post coitum*.

Drp1: Proteína relacionada con la dinamina 1.

EB: Cuerpo embrioide.

ECCs: Células de carcinoma embrionario.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

EGCs: Células germinales embrionarias.

Ehmt: Metiltransferasa de histonas de eucromatina.

eNOS: Óxido nítrico sintasa endotelial.

ESCs: Células troncales embrionarias.

EZH2: Enhancer del homólogo de zeste 2.

FBP: Fructosa 1, 6 bifosfato.

FBS: Suero bovino fetal.

FITC: Isotiocianato de fluoresceína.

GFP: Proteína fluorescente verde.

GLUT: Transportador de glucosa.

Gsk3 $\beta$ : Glucógeno sintasa quinasa 3 isoforma  $\beta$ .

HDFs: Fibroblastos dermales de humano adulto.

hESCs: Células troncales embrionarias humanas.

iNOS: Óxido nítrico sintasa inducida.

iPSCs: Células troncales pluripotentes inducidas.

Jmjd3: Proteína con dominio jumonji 3.

H3K4me: Metilación en la lisina 4 de la histona 3.

H3K9ac: Acetilación en la lisina 9 de la histona 3.

H3K9me: Metilación en la lisina 9 de la histona 3.

H3K27me: Metilación en la lisina 27 de la histona 3.

H4R3me: Metilación en la arginina 3 de la histona 4.

HDAC: Inhibidor de deacetilasas de histonas.

hiEGLs: Células similares a germinales embrionarias inducidas por hipoxia.

HIF: Factor inducible por hipoxia.

HK: Hexoquinasa.

HRE: Elemento de respuesta a hipoxia.

HSCs: Células troncales hematopoyéticas.

iPSCs: Células pluripotentes inducidas.

KDM1A: Demetilasa de histonas específica para lisinas 1A.

Klf4: Factor similar a Kruppel 4.

LDHA: Lactato deshidrogenasa.

LIF: Factor inhibidor de la leucemia.

MEFs: Fibroblastos embrionarios de ratón.

MEK: Mitogen-activated protein kinase/Extracellular signal-Regulated Kinase (ERK) Kinase.

mESCs: Células troncales embrionarias de ratón.

Mfn: Mitofusina.

NF- $\kappa$ B: Factor nuclear kappa-beta.

NO: Óxido nítrico.

NPCs: Células precursoras neurales.

ODD: Dominio de degradación dependiente de oxígeno.

OSKM: Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc.

OXPPOS: Fosforilación oxidativa.

PBS: Tampón fosfato salino.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PDH: Piruvato deshidrogenasa.

PDK1: Piruvato deshidrogenasa kinasa 1.

PE: Enhancer proximal.

PEP: Fosfoenol piruvato.

PFA: Paraformaldehído.

PGCs: Células germinales primordiales.

PHD: Dominio prolil hidroxilasa.

PI3K: Fosfatidilinositol 3 kinasa.

PIP: Péptido inhibidor de la translocación de la isoforma  $\epsilon$  de la Proteína Kinasa C.

PKC: Proteína kinasa C.

PKM2: Piruvato kinasa isoforma M2.

PPAR: Receptor activado por proliferadores de peroxisomas.

PRC2: Complejo represor Polycomb 2.

PSCs: Células troncales pluripotentes.

PTEN: Homólogo de fosfatasa y tensina.

Resv: Resveratrol.

ROS: Especies reactivas de oxígeno.

SCF: Sem cell factor.

SCID: Inmunodeficiencia combinada grave.

SDHB: Succinato deshidrogenasa subunidad B.

SDS: Dodecilsulfato sódico.

Ser: Serina.

SGZ: Zona subgranular.

siRNA: RNA pequeño de interferencia.

Sirt: Sirtuina.

SSEA: Antígeno embrionario específico de etapa.

STO: Santos Thioguanine- y Ouabain- resistant.

TBS: Tampón tris salino.

TCA: Ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

TGF- $\beta$ : Factor de crecimiento tumoral  $\beta$ .

TNAP: Fosfatasa alcalina no específica de tejido.

Tranil: Tranilcipromina.

TSA: Tricostatina A.

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular.

VHL: Von Hippel-Lindau.

VPA: Ácido valproico.

# *Introducción*

## **Potencialidad y reprogramación**

Las células troncales se definen por sus capacidades de autorrenovación y de diferenciación hacia múltiples tipos celulares o potencialidad. De estas dos características, la autorrenovación hace referencia a la capacidad de las células troncales de proliferar y dar lugar a dos células hijas con la misma capacidad de diferenciación o potencialidad. Las células troncales pueden clasificarse según la mencionada potencialidad que posean: totipotentes, como el cigoto, son aquellas células troncales capaces de dar lugar a cualquier tipo celular del organismo, incluyendo estructuras extraembrionarias; pluripotentes, como las células troncales embrionarias (ESCs), capaces de dar lugar a tipos celulares de las tres hojas embrionarias; y multipotentes, como los precursores hematopoyéticos, con una potencialidad más restringida, generalmente reducida a una única hoja embrionaria. Por último, las células unipotentes, como las células germinales primordiales (PGCs), pueden dar lugar a un único tipo celular y son también denominadas progenitores celulares (Kumar et al., 2010).

Es interesante que la capacidad de diferenciación de una célula puede ser alterada mediante la denominada reprogramación celular, la cual hace referencia a la interrupción de la progresión normal de la célula para dar lugar a un tipo celular distinto que no aparecería en condiciones fisiológicas. Un ejemplo sería la expresión ectópica del factor de diferenciación miogénica MyoD para transformar fibroblastos en mioblastos (Davis et al., 1987). Sin embargo, los procesos de reprogramación pueden ocurrir en un contexto fisiológico, y suelen derivar en procesos aberrantes que contribuyen a la oncogénesis. Es frecuente que células cancerosas expresen genes fuera de contexto, y también es frecuente que algunos de estos genes estén implicados en la reprogramación celular (Boussouar et al., 2013; Rousseaux et al., 2013).

Existen diversos métodos para adquirir una mayor potencialidad a partir de células de un linaje más comprometido o incluso a partir de células completamente diferenciadas. Entre dichas estrategias figuran la transferencia nuclear, también denominada clonación (Gurdon, 1962; Wilmut et al., 2002; Kishigami et al., 2006), la fusión celular con células pluripotentes (Ying et al., 2002) o la incubación con extractos celulares pluripotentes (Taranger et al., 2005).

La investigación en células troncales tuvo un gran avance tras la generación de células pluripotentes inducidas (iPSCs) a través de la expresión ectópica mediante el uso de retrovirus de los factores de transcripción Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc (OSKM), relacionados con el establecimiento de la pluripotencia y con la proliferación celular, en fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs), obteniendo una eficiencia de 0.02% de reprogramación a células pluripotentes tras tres semanas de cultivo (Takahashi y Yamanaka, 2006). Por su parte, también se generaron

iPSCs induciendo la expresión ectópica de Oct4, Sox2, Nanog y Lin28 (Yu et al., 2007), siendo Nanog un marcador de pluripotencia y Lin28 una proteína relacionada con la autorrenovación de células troncales. Los tipos celulares elegidos fueron fibroblastos fetales y neonatos de ratón, obteniéndose eficiencias de 0.03-0.05% y 0.01%, respectivamente (Yu et al., 2007). Otra combinación más reciente fue la de los genes *Esrrβ* (componente de la red de factores necesarios para el establecimiento de la pluripotencia en células troncales embrionarias), *Sall4* (factor implicado en el mantenimiento del estado desdiferenciado de ESCs), *Lin28* y *Nanog*, obteniéndose una eficiencia de reprogramación de 0.001%, pero con una mayor capacidad pluripotente, lo que indica que las distintas combinaciones de factores influyen en el proceso de reprogramación (Buganim et al., 2012; Buganim et al., 2014).

En el caso de células humanas, la primera reprogramación que se describió fue a partir de fibroblastos dermales de humano adulto (HDFs), utilizando también el método de sobreexpresión de OSKM mediante el uso de vectores retrovirales (Takahashi et al., 2007). Posteriormente, se desarrollaron métodos con construcciones que incluían los 4 factores en vectores lentivirales (Chang et al., 2009). Sin embargo, para evitar procesos oncogénicos se comenzaron a diseñar protocolos de reprogramación utilizando vectores no integrativos, como los adenovirus o los virus Sendai, llegando en este último caso a eficiencias del 1% (Fusaki et al., 2009; Zhou et al., 2009). También se ha conseguido reprogramar fibroblastos humanos con una eficiencia del 1.4% transfectando con el mRNA de OSKM y *Lin28* y realizando el cultivo en condiciones de 5% de oxígeno (Warren et al., 2010).

La inducción de pluripotencialidad con OSKM se ha conseguido también en otros tipos celulares, tales como en células de estómago e hígado de ratón (Aoi et al., 2008), células  $\beta$  pancreáticas (Stadtfeld et al., 2008) y linfocitos (Hanna et al., 2008). En este último estudio se intentó la reprogramación de linfocitos B y mientras que células no completamente diferenciadas pudieron reprogramarse con los 4 factores, las completamente diferenciadas necesitaron adicionalmente la transducción del factor de transcripción *C/EBP $\alpha$*  o la regulación a la baja del determinante de linfocitos B *Pax5* (Hanna et al., 2008), sugiriendo que el estado de diferenciación inicial también condiciona el proceso de reprogramación. Asimismo, se ha establecido que las iPSCs obtenidas pueden mantener una suerte de “memoria epigenética” perteneciente al tipo celular original, por lo que no habrían alcanzado aún un estado pluripotente similar al de las ESCs (Chin et al., 2009; Doi et al., 2009; Ghosh et al., 2010). Dicha memoria epigenética puede revertirse tras periodos largos de cultivo, de modo que tras numerosos pases las iPSCs humanas se asemejan consistentemente a las ESCs humanas (Chin et al., 2010).



Existen otros modelos de reprogramación celular, como por ejemplo la derivación de células germinales embrionarias (EGCs), de tipo pluripotente, a partir de PGCs, con capacidad unipotente ya que únicamente dan lugar a los gametos, mediante el cultivo en presencia de un conjunto determinado de factores de crecimiento (Matsui et al., 1992, Resnick et al., 1992). Este método es más sencillo y eficiente que el de la obtención de iPSCs, en parte debido a que las PGCs expresan constitutivamente Oct4, Sox2, Nanog y Lin28 (Schöler et al., 1990; Boiani et al., 2002; Donovan y de Miguel, 2003; Yamaguchi et al., 2005; Yabuta et al., 2006; West et al., 2009). Es interesante resaltar que un desarrollo incorrecto de las células germinales *in vivo* puede dar lugar a su malignización y la aparición de células de carcinoma embrionario testicular (ECCs), también de fenotipo pluripotente. Por otra parte, un desarrollo anómalo de las PGCs puede desembocar en su reprogramación hacia ECCs y, de hecho, diversas mutaciones en PGCs han sido relacionadas con la incidencia de cáncer testicular (Donovan y De Miguel, 2003).

En conjunto, todas las células pluripotentes descritas anteriormente poseen una serie de características comunes, aparte de su capacidad de dar lugar a tipos celulares de las tres hojas germinales, como la expresión de antígenos de la familia SSEA en membrana, la actividad fosfatasa alcalina no específica de tejido (TNAP) o la expresión de genes reguladores de la red de pluripotencia como Oct4, Sox2 o Nanog. Este último está considerado como el factor implicado en el estado basal de pluripotencia, ya que en ESCs una expresión baja de Nanog promueve la diferenciación, mientras que una expresión alta mantiene su estado desdiferenciado (Silva et al., 2009). Del mismo modo, los niveles de Oct4 son también esenciales, ya que una expresión anómala de Oct4 se asocia a la expresión de genes fuera de contexto, al mismo tiempo que los niveles de Oct4 deben estar estrictamente regulados para la entrada en pluripotencia en ESCs y un aumento excesivo puede conducir a procesos de diferenciación (Boiani et al., 2002; Radzsheuskaya et al., 2013). Por tanto, parece que el fenotipo pluripotente depende de la expresión de los ya mencionados factores relacionados con la pluripotencia dentro de unos rangos muy determinados.

### **Dificultades en la utilización de iPSCs**

Pese al gran avance científico que supuso la obtención de las iPSCs, la detección de mutaciones y aberraciones cromosómicas ha hecho considerar su capacidad tumorigénica (Yamanaka, 2012). La observación inicial de que el trasplante de iPSCs en ratones inducía la aparición de teratomas (Zhao et al., 2011) fue parcialmente solventada al apreciarse que el trasplante de iPSCs totalmente diferenciadas a células de la piel y de la médula ósea no producía este efecto, aunque una diferenciación errónea sí podía desencadenar respuestas de inmunogenicidad

(Araki et al., 2013). Los resultados paralelos de que el trasplante de células diferenciadas hacia un tipo celular representativo de cada hoja germinal no produjo ningún tipo de respuesta inmune puso el foco de atención en lo determinante del tipo celular final, la influencia de una correcta diferenciación o la calidad inicial de las iPSCs obtenidas sobre la capacidad terapéutica de estas células (Guha et al., 2013; De Almeida et al., 2014; Zhao et al., 2015).

La aparición de aberraciones cromosómicas durante el proceso de reprogramación también ha sido fuente de preocupación. Entre ellas figuran la duplicación del brazo corto del cromosoma 12, la trisomía del cromosoma 8 o la trisomía del cromosoma 17 (Taapken et al., 2011). Estudios posteriores han argumentado que la aparición de dichas alteraciones también sucede en las células somáticas adultas, y que la población inicial de la que obtener las iPSCs es un factor de especial relevancia (Cheng et al., 2012). De hecho, el uso generalizado de fibroblastos como tipo celular a reprogramar genera el problema de que dichas células son capaces de tolerar elevados niveles de alteraciones genómicas (Tapia y Schöler, 2016). Además, otros grupos han descrito alteraciones genómicas que tienen lugar durante el proceso de diferenciación a partir de iPSCs (Laurent et al., 2011; Varela et al., 2012).

Otro problema al que se enfrenta la tecnología de las iPSCs es el hecho de que no todas las células pluripotentes obtenidas son iguales. No todas las líneas de iPSCs superan satisfactoriamente el test de complementación tetraploide, que está considerada como la prueba más restrictiva a la hora de demostrar pluripotencia (Zhao et al., 2009). Tampoco todas las líneas celulares de iPSCs muestran la misma capacidad de diferenciación hacia distintos tipos celulares (Hu et al., 2010).

### **Modificaciones a la obtención de iPSCs**

Se han realizado distintas aproximaciones para conseguir una mejora en la obtención de las iPSCs. Con el fin evitar el uso del oncogén c-Myc, se han desarrollado iPSCs sin utilizar ese gen (Nakagawa et al., 2008). También en 2008 se consiguieron reprogramar células precursoras neurales (NPCs) en ausencia de Sox2 (Eminli et al., 2008) y, un año más tarde, únicamente con Oct4 (Kim et al., 2009). El uso de otros factores de transcripción adicionales a OSKM contribuyó a mejorar la eficiencia de reprogramación, como por ejemplo Sall4 (Tsubooka et al., 2009), el factor de la red de pluripotencia Tbx3 (Han et al., 2010) o UTF1 (Zhao et al., 2008), cuya expresión se ve disminuida al comenzar la diferenciación y que mostró capacidad de sustituir a c-Myc. Otros estudios han mostrado la posibilidad de sustituir Klf4 por Esrr $\beta$  (Feng et al., 2009) o de Oct4 por Nr5a2, un gen implicado en el mantenimiento de la pluripotencia (Heng et al., 2010).

Como se ha comentado anteriormente, los niveles de expresión de los factores de transcripción son un factor muy importante durante el proceso de inducción de iPSCs. Puede apreciarse que durante el proceso de reprogramación aparecen tipos celulares visiblemente diferentes. Los cuatro factores OSKM pueden inducir un fenotipo de diferenciación si se expresan a niveles elevados. Concretamente, Oct4 debe mantener su expresión dentro de un estrecho rango. Se ha descrito un tipo celular pluripotente con alta capacidad proliferativa llamado clase F caracterizado por formar colonias sin bordes definidos, por ser positivo para Nanog y por requerir de forma continua una alta expresión de OSKM. La diferencia con otras células pluripotentes como las ESCs radica en que las ESCs colonias presentan una morfología compacta y en que las células de clase F presentan un ciclo más rápido que el de las ESCs y un estado epigenético distinto. El paso de clase F a iPSCs con morfología típica de ESCs puede conseguirse utilizando inhibidores de deacetilasas de histonas (Tonge et al., 2014).

El uso de factores solubles tales como los inhibidores de Gsk3 $\beta$  y de TGF- $\beta$  han hecho innecesaria la transducción de los factores Klf4, Sox4 y c-Myc (Ichida et al., 2009; Lyssiotis et al., 2009; Maherali y Hochedlinger, 2009). Incluso se han llegado a conseguir iPSCs a partir de fibroblastos sin utilizar OSKM utilizando únicamente factores solubles, entre los cuales figuran modificadores epigenéticos e inhibidores de Gsk3 $\beta$  y TGF $\beta$  (Hou et al., 2013). El uso exclusivo de factores solubles se ha utilizado en otros modelos, como la obtención de EGCs al cultivar PGCs en presencia de bFGF o tricostatina A (TSA), además de SCF y LIF (Durcova-Hills et al., 2008) (Fig.1). La ventaja de este método es que evita la introducción de material genético en la célula y facilita mucho más el procedimiento de obtención de células pluripotentes en el laboratorio.

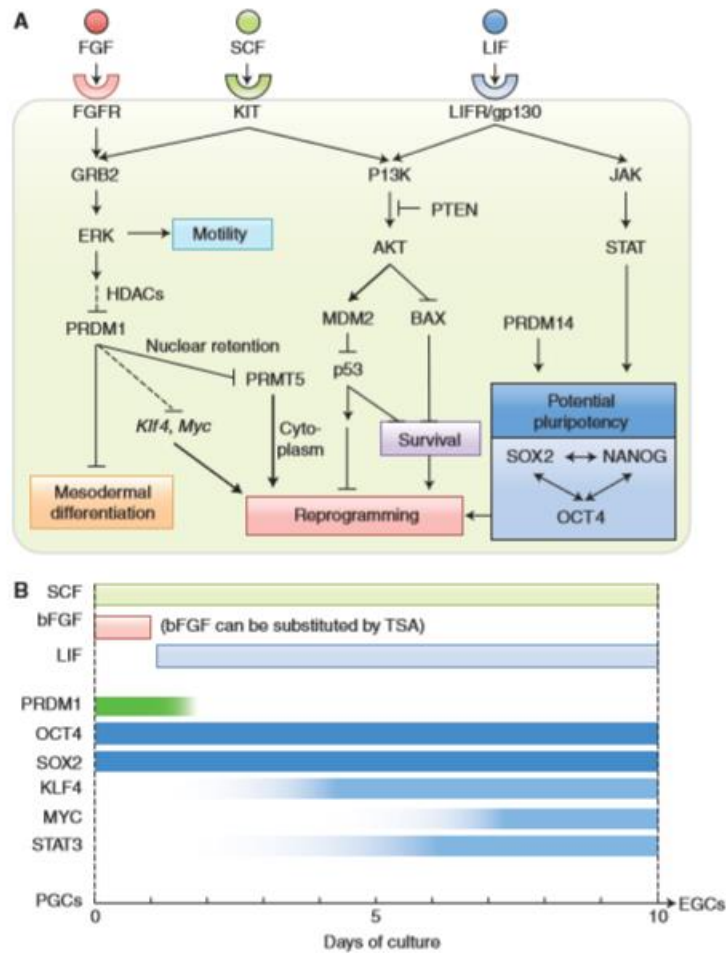


Figura 1. Esquema de las rutas implicadas en la reprogramación de PGCs hacia EGCs (A) y representación de los eventos de más importancia durante dicha reprogramación a lo largo de los primeros 10 días de cultivo (B) (Saitou y Yamaji, 2012).

## PGCs

A pesar de sus semejanzas con células pluripotentes, en condiciones fisiológicas las PGCs son los precursores embrionarios de los gametos (Molyneaux y Wylie, 2004; Elliott et al., 2007), por lo cual son consideradas células unipotentes. De hecho, las PGCs no forman cuerpos embrioides (EBs) y tampoco contribuyen ni a la formación de teratomas ni de quimeras (Donovan et al., 2001; Donovan y De Miguel, 2003).

En el ratón, las PGCs se especifican alrededor de 6 días *post coitum* (dpc) en ratón, en el epiblasto proximal y comienzan a expresar la proteína PR domain zinc finger protein 1 (Prdm1), también conocida como B lymphocyte-induced maturation protein 1 (Blimp1), que es esencial para la especificación de las PGCs (Ohinata et al., 2005). Blimp1 contribuye de forma decisiva a la

represión del programa somático incluidos los genes Hox, además de inducir la expresión de genes de la línea germinal, como Nanos3, Dnd1 y c-Kit (Kurimoto et al., 2008).

Tras la especificación, debido al movimiento de la gastrulación a través de la línea primitiva, esta agrupación de unas 20 PGCs abandona el epiblasto junto con el mesodermo extraembrionario y queda en la base del alantoides (Pirouz et al., 2012). Las PGCs pueden identificarse en este momento como una agrupación de aproximadamente 40 células por la expresión de fosfatasa alcalina (TNAP), de stage-specific embryonic agents (SSEAs), de los factores de desarrollo de la línea germinal mouse-vasa homolog (Mvh), Dppa3 y Fragilis, Oct4, el determinante de línea germinal Blimp1 y los marcadores de pluripotencia Rex1 y Fbx15 (Saitou et al., 2002; Donovan y Gearhart, 2001; Donovan y De Miguel, 2003; De Felici, 2011; De Miguel et al., 2011; Hayashi et al., 2011). Las PGCs también expresan Prdm14 y, junto con Blimp1, intervienen en la reexpresión de genes relacionados con la pluripotencia, como Oct4, Sox2 y Klf2 (Seki et al., 2007; Surani y Hajkova, 2010; Nagamatsu et al., 2012; Pirouz et al., 2012). La expresión de genes relacionados con la red de pluripotencia se pierde alrededor de 13.0 dpc, incluido SSEA1. Por su parte, Lin28 es detectable desde 7.5 dpc hasta 12.5 dpc e impide que Let7 inhiba la expresión de Blimp1. De este modo, Blimp1 mantiene su expresión y las PGCs son capaces de proseguir su desarrollo normal (Ohinata et al., 2005; West et al., 2009).

Las PGCs sufren una reprogramación epigenética a nivel genómico a lo largo de su desarrollo (Nagamatsu et al., 2012). Los precursores de PGCs, positivos para Blimp1, presentan las marcas de metilación H3K4me2, H3K4me3, H3K9ac, H3K9me1, H3K9me2, H3K9me3, H3K27me2 y H3K27me3. Todas estas marcas también las presentan las células vecinas, que mantienen un programa somático (Seki et al., 2007; De Felici, 2011). Una vez comenzada la migración, las PGCs reducen la marca H3K9me2 y la metilación a nivel de DNA, modificaciones represoras en ambos casos (Seki et al., 2007; Saitou y Yamaji, 2010). Sin embargo, a partir de 8.25 dpc aproximadamente, la marca represora H3K27me3 aumenta, mediada por el complejo represor polycomb 2 (PRC2) (Seki et al., 2007).

Seguidamente, entre E9.0 y E9.5, avanzan en su reprogramación epigenética, incluyendo la reactivación del cromosoma X inactivo en las PGCs de hembras, así como la eliminación de marcas de impronta (Seki et al., 2007; Sasaki y Matsui, 2008). También aparece la marca H4R3me2, debida a la interacción entre Blimp1 y Prmt5 entre E8.5 y E10.5 (Ancelin et al., 2006). Finalmente, en E11.5 se produce una pérdida de la histona H1, lo cual conduce a un estado más abierto de la cromatina. Además, disminuyen las marcas H3K9me3, H3K27me2, H3K9ac y H4R3me2 (De Felici, 2011).

A partir de 7.5 dpc, las PGCs se desplazan y migran a lo largo del mesodermo extraembrionario hacia las futuras crestas genitales, que posteriormente darán lugar a las gónadas (Fig. 2). Para tal efecto, recorren el endodermo del futuro intestino hasta alcanzar el mesenterio a los 9.5 dpc. En ese momento, abandonan el intestino y se dirigen hacia las crestas genitales. Dicho proceso se completa alrededor de 11.5 dpc (Molyneaux y Wylie, 2004; Seki et al., 2007; Kimura et al., 2008). A los 13.0 dpc, las PGCs detienen su proliferación y comienzan a diferenciarse. En el estadio seleccionado en este estudio (8.5 dpc), las PGCs se encuentran en el endodermo del futuro intestino y en la base del alantoides, contándose 50-100 células por embrión (De Miguel et al., 2011). Además, en 8.5 dpc las PGCs de ratón son reprogramables, ya que estas pueden dar lugar a EGCs desde 7.5 a 11.5 d.p.c. (Matsui et al., 1992; Resnick et al., 1992)

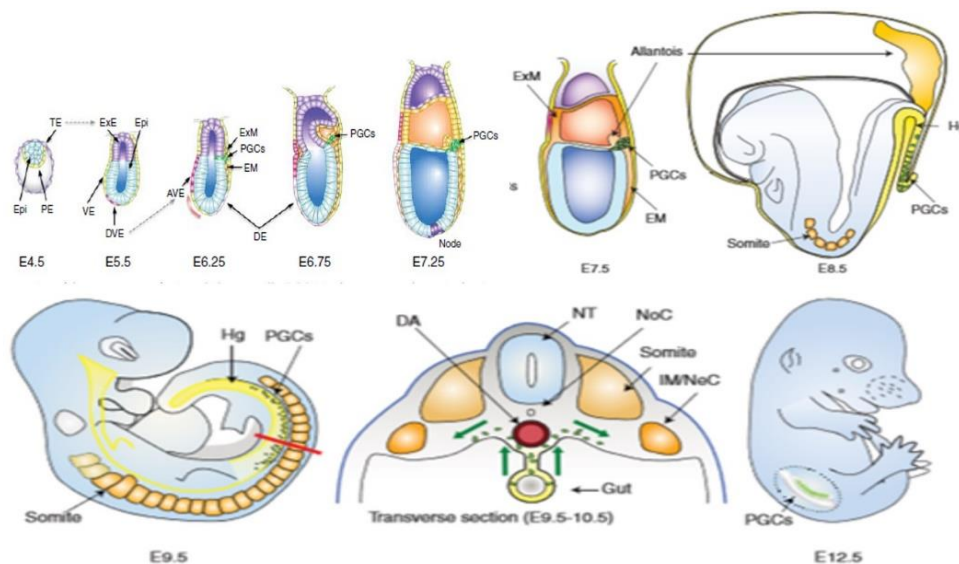


Figura 2. Representación esquemática de la especificación y el desarrollo de las PGCs en ratón. Representadas en verde aparecen las PGCs, que se especifican en el epiblasto proximal. La sección transversal en el panel inferior corresponde al corte hipotético siguiendo el trazo de la línea roja en el panel inferior a la izquierda con las PGCs a ambos lados de la aorta. Epi: epiblasto; TE: trofoectodermo; PE: endodermo primitivo; VE: endodermo visceral; DVE: endodermo distal visceral; AVE: endodermo anterior visceral; ExE: endodermo extraembrionario; PGCs: células germinales primordiales; EM: mesodermo embrionario; ExM: mesodermo extraembrionario; Hg: intestino; DA: aorta dorsal; NT: tubo neural; NoC: notocorda; IM: mesodermo intermedio; NeC: cordón nefrogénico. (Saitou y Yamaji, 2012)

La reprogramación clásica de PGCs involucra la transducción de señales por bFGF (Resnick et al., 1992). Otros estudios han descrito que la activación de Akt es capaz de reprogramar las PGCs hacia EGCs y han apuntado a que el mecanismo de acción es a través de la fosforilación y consecuente inhibición de Gsk3 $\beta$ , así como inhibiendo la actividad de p53. La inhibición tanto de Gsk3 $\beta$  como de p53 favorece la reprogramación hacia EGCs (Kimura et al., 2008; De Felici, 2011). También han sido descritos numerosos genes que mantienen su expresión durante la reprogramación de PGCs hacia EGCs, así como genes que ven inducida su expresión en EGCs al alcanzar la reprogramación (Fig. 3).

Gene	8.5 dpc PGCs				EG cells			
	5	7	14	20	1	2	3	6
<b>Group I</b>								
Oct-4	+	+	+	+	+	+	+	+
Sox-2	+	+	+	+	+	+	+	+
nanog	+	+	+	+	+	+	+	+
Dppa5(Esg-1)	+	+	+	+	+	+	+	+
Sall4	+	+	+	+	+	+	+	+
mRif1	+	+	+	+	+	+	+	+
E-cadherin	+	+	+	+	+	+	+	+
TNA P	+	+	+	+	+	+	+	+
Rex1 (Zfp42)	+	+	+	+	+	+	+	+
Utf1	+	+	+	+	+	+	+	+
Dppa3 (Stella)	+	+	+	+	+	+	+	+
Sox15	+	+	+	+	+	+	+	+
Grb2	-	+	+	+	+	+	+	+
$\beta$ -catenin	-	+	+	+	+	+	+	+
<b>Group II</b>								
<i>c-Myc</i>	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>Stat-3</i>	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>Klf-4</i>	-	-	-	-	+	+	+	+
Dnmt3L	-	-	-	-	+	+	+	+
ERas	-	-	-	-	+	+	+	+
Fthl-17	-	-	-	-	+	+	+	+
Dppa2	-	-	-	-	+	+	+	+
Dppa4	+	-	-	-	+	+	+	+
Ecat1	-	-	-	-	+	+	+	+
Ecat8	-	+	+	-	+	+	+	+
Gdf3	+	+	+	+	+	-	-	-
Fbxo15	-	+	-	+	+	+	+	+
Td1	-	+	-	-	+	+	+	+

Figura 3. Análisis comparativo de la expresión génica entre 4 muestras de PGCs de 8.5 dpc y EGCs. Los genes agrupados en el grupo I se refieren a aquellos coexpresados en PGCs y EGCs. Los del grupo II engloban a los que se expresaron diferencialmente entre ambos tipos celulares (Durcova-Hills et al., 2008).

En estudios previos de nuestro laboratorio, se demostró que el cultivo de PGCs durante 7 días con un nivel de oxígeno del 3% muestra una eficiencia de reprogramación del 6.9%, un valor muy superior a los mencionados anteriormente y sin necesidad de recurrir a la expresión ectópica de factores de transcripción. De esta manera, se evita la introducción de material genético en las células y tampoco es necesario afinar la estequiometría de cada factor de transcripción. El cultivo de PGCs en hipoxia induce la formación de colonias similares a las de EGCs, incluso en ausencia de bFGF, de células denominadas hipoxia-induced embryonic germ-like cells (hiEGLs). El estudio de la cinética indica que la significación estadística de dicho proceso de reprogramación tiene lugar a los 7 días de cultivo. Además, dichas colonias son positivas para tanto para TNAP como para Oct4 y Sox2, y pueden diferenciarse a las 3 hojas germinales, así como integrarse en blastocistos (López-Iglesias, Alcaina et al., 2015).

### **Hipoxia y reprogramación**

Recientemente, se ha reconocido que la reprogramación celular se acompaña de cambios metabólicos. En particular, se produce un cambio del metabolismo energético desde la fosforilación oxidativa a la glucólisis (Panopoulos et al., 2012; Zhang et al., 2012). Por otra parte, varios estudios muestran que el reajuste metabólico es un proceso activo que tiene lugar durante la reprogramación (Zhu et al., 2010; Folmes et al., 2011; Panopoulos et al., 2012), y que un aumento en la expresión de genes glicolíticos precede a un aumento similar en la expresión de los genes que controlan la autorrenovación, lo que sugiere que el reajuste metabólico tiene un papel activo y temprano en la reprogramación. De hecho, nosotros hemos demostrado que la hipoxia induce la glucólisis en las PGC y en consecuencia que las mitocondrias son en su mayoría inactivas en condiciones de hipoxia (López-Iglesias, Alcaina et al., 2015). Estos datos coinciden con los datos en iPSC en los que la estimulación de la glucólisis aumenta la eficiencia de reprogramación (Yoshida et al., 2009; Panopoulos et al., 2012) y la reprogramación nuclear se acompaña de la remodelación de la infraestructura mitocondrial (Folmes et al., 2011; Varum et al., 2011). Existen diversos ejemplos en la bibliografía en los cuales la inducción de pluripotencialidad fue más efectiva al realizar los cultivos en condiciones de hipoxia, además de conseguirse una mayor capacidad de autorrenovación, un estado pluripotente más robusto y una menor diferenciación del cultivo, la utilización de menos factores de reprogramación o un acortamiento del tiempo necesario para la reprogramación (Ezashi et al., 2005; Yoshida et al., 2009; Forristal et al., 2010; Mohyeldin et al., 2010; Shimada et al., 2012; Medley et al., 2013). También se ha demostrado que la inhibición de las vías oxidativas es importante en el mantenimiento de la pluripotencia (Yanes et al., 2010), y que el cambio metabólico precede a la expresión de genes de pluripotencia durante la derivación de iPSC (Folmes et al., 2011), pero



nuestro trabajo fue el primero que describió la causa-efecto contraria, es decir, que la manipulación metabólica (glucólisis forzada inducida por hipoxia), promueve directamente la reprogramación celular de células comprometidas en vivo, ya que el cultivo de PGCs en hipoxia induce reprogramación a células pluripotentes hiEGLs (López-Iglesias, Alcaina et al., 2015). Estos y nuestros datos proponen una forma de inducir pluripotencia mediante la modificación del metabolismo de la célula. Nuestros resultados anteriores apoyan claramente esta hipótesis, y permiten caracterizar aún más el proceso de reprogramación en condiciones de reajuste metabólico.

El posible mecanismo de acción está parcialmente elucidado. En respuesta a niveles bajos de oxígeno, las células generalmente activan programas de expresión génica orquestados por los factores inducibles por hipoxia (HIFs). Los HIFs son factores de transcripción pertenecientes a la familia basic helix-loop-helix (bHLH) (Wang et al., 1995) y se conforman como heterodímeros formados por una unidad inducible ( $\alpha$ ) y otra constitutiva ( $\beta$ ) (Gradin et al., 1996; Majmundar et al., 2010) que se unen a secuencias reguladoras presentes en el genoma llamadas elementos de respuesta a hipoxia (HREs). Existen 3 subunidades  $\alpha$  (HIF1, HIF2 y HIF3) que, al estabilizarse, se translocan al núcleo, conforman el heterodímero junto a la subunidad  $\beta$  y se unen a las secuencias consenso RCGTG de las HREs, localizadas en multitud de genes (Majmundar et al., 2010). Finalmente, con la ayuda de coactivadores de la transcripción como p300/CBP, los HIFs disparan la expresión de genes diana (Carrero et al., 2000; Ruas y Poellinger, 2005). Sin embargo, también se han descrito casos de expresión génica inducida por hipoxia e independiente de HIF. Por ejemplo, proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha (PGC1 $\alpha$ ) y nuclear factor kappa-beta (NF- $\kappa$ B) pueden inducir la expresión de VEGF independientemente de HIF1 $\alpha$  (Fujioka et al., 2004; Arany et al., 2008).

La regulación de los HIF, que es ejercida a nivel de la subunidad  $\alpha$ , es compleja. El principal mecanismo implicado es la degradación de la subunidad  $\alpha$  dependiente de oxígeno a través de proteínas que contienen dominios proil hidroxilasa (PHD). Ante niveles altos de oxígeno, las PHDs hidroxilan residuos de prolina presentes en los dominios de degradación dependiente de oxígeno (ODD) presentes en las subunidades  $\alpha$  de los HIFs (Majmundar et al., 2010; Semenza, 2012). Esta modificación es reconocida por la proteína Von Hippel-Lindau (VHL), que forma parte de un complejo ubiquitina-ligasa (Kamura et al., 2000; Kondo y Kaelin, 2001; Kaelin, 2003). De esta forma, HIF queda ubiquitinilado y es degradado en el proteasoma 26S (Salceda y Caro, 1997; Maxwell et al., 1999; Brahimi-Horn et al., 2007). Por el contrario, en condiciones de hipoxia, las PHDs no disponen de oxígeno como cofactor para llevar a cabo la hidroxilación. Como resultado,

HIF $\alpha$  se acumula en el núcleo, se une a HIF $\beta$  y ejerce su función reguladora de la expresión génica (Carrero et al., 2000).

El estado redox de la célula también puede influir en la señalización por HIF. Las sirtuinas, deacetilasas de histonas dependientes de NAD<sup>+</sup>, pueden unirse a HIF1 $\alpha$  y HIF2 $\alpha$  y deacetilar residuos de lisina localizados en dichos factores, lo cual se traduce en una disminución de su actividad transcripcional (Lim et al., 2010). Por su parte, Sirt6, que deacetila en H3K9, ejerce un efecto inhibitorio sobre HIF1 $\alpha$ , modulando así los niveles de glucosa (Majmundar et al., 2010; Zhong et al., 2010). La deficiencia de Sirt6 provoca una mayor toma de glucosa, una mayor expresión de GLUT1 en membrana y un fenotipo más glicolítico a través de HIF1 $\alpha$  (Zhong et al., 2010).

A pesar de que HIF1 $\alpha$  y HIF2 $\alpha$  se expresan en multitud de tipos celulares y de que presentan propiedades bioquímicas similares, sus funciones son distintas (Tian et al., 1998; Kotch et al., 1999; Keith et al., 2011). A HIF1 $\alpha$  se le ha relacionado con la angiogénesis y con la reprogramación metabólica hacia un fenotipo glicolítico, mientras que a HIF2 $\alpha$  se le atribuyen funciones relacionadas con la proliferación y la migración celular y con la pluripotencia mediante su inducción de la expresión de Oct4, Sox2 y Nanog (Elvert et al., 2003; Aprelikova et al., 2006; Covello et al., 2006; Forristal et al., 2010; Petruzzelli et al., 2014). HIF2 $\alpha$  es incluso capaz de mantener la expresión de Oct4, Sox2 y especialmente Nanog después de 72 horas de reoxigenación en ESCs humanas (Petruzzelli et al., 2014) y también ha mostrado regular positivamente la expresión de GLUT1 (Forristal et al., 2013). Además, HIF2 $\alpha$  se expresa en blastocistos, embriones a 7.5 dpc y en PGCs, donde desempeña un papel fundamental por su regulación de Oct4 (Covello et al., 2006; Saitou y Yamaji, 2010).

Por su parte, HIF3 $\alpha$  se expresa en diversos tejidos, como corazón, pulmón, riñón y músculo, y presenta variantes por splicing, que pueden desempeñar un papel activador o inhibidor sobre HIF1 $\alpha$  y HIF2 $\alpha$  (Maynard et al., 2005; Maynard et al., 2007; Heikkila et al., 2011; Drevytska et al., 2012).

El mecanismo de inducción de pluripotencia por la hipoxia en PGCs ha sido parcialmente dilucidado por nuestro grupo. La inmunofluorescencia contra HIF1 $\alpha$  mostró expresión de HIF1 $\alpha$  en PGCs exclusivamente bajo condiciones de hipoxia a las 24 horas como se esperaba, pero también mantenido, de forma inesperada, en algunos casos a los 7 días, lo que sugiere que HIF 1 es responsable de la señalización de la hipoxia en PGCs. Es importante destacar que hemos demostrado que, en las PGCs, la hipoxia induce pluripotencia por medio de la estabilización de HIF1 $\alpha$  y la desregulación de los bajos niveles de Oct4 ya presentes en las PGCs (López-Iglesias,

Alcaina et al., 2015). Curiosamente, muy recientemente se ha demostrado que en realidad es una expresión de Oct4 reducida lo que dirige un estado pluripotente robusto en ESCs (Karwacki-Neisius et al., 2013). Esto también es apoyado por la redefinición de los bajos niveles Oct4 necesarios para la entrada en pluripotencia, así como los más altos niveles de Oct4 necesarios para la diferenciación (Radziskeuskaya et al., 2013).

El aumento de la glicolisis al cultivar a baja concentración de oxígeno aumenta la eficiencia de la derivación de iPSCs, incluso permitiendo su obtención utilizando únicamente los factores Oct4 y Klf4 (Yoshida et al., 2009), y activa la expresión de genes relacionados con la pluripotencia a través de los HIFs (Forristal et al., 2010). De hecho, se ha mostrado que la utilización de un desacoplador mitocondrial, el carbonyl cyanide 3-chloro-phenyl-hydrazone (CCCP) conduce a un aumento en la expresión de Oct4, Nanog y Sox2 (Mandal et al., 2011). Por el contrario, la expresión de genes relacionados con la diferenciación, como Hand1, Eomes, H19 y Gata6, así como otros marcadores de linaje, muestran una mayor expresión en normoxia (Westfall et al., 2008; Lengner et al., 2010). En el caso de las PGCs, el cultivo en hipoxia induce una mayor expresión de genes glicolíticos y reduce la expresión de genes implicados en la respiración mitocondrial (López-Iglesias, Alcaina et al., 2015).

La relación entre el nivel de oxígeno y el metabolismo celular es perfectamente lógica teniendo en cuenta que el aceptor final de electrones si opera la fosforilación oxidativa (OXPHOS) es el oxígeno. Ante una disminución de dicho gas, el metabolismo se vuelve predominantemente glicolítico. HIF1 es el nexo molecular esencial que dirige esta reprogramación metabólica. Como se muestra en la Figura 4, HIF1 induce la expresión de los transportadores de glucosa (GLUTs) con el fin de incrementar la captación de glucosa por parte de la célula. Debido a que la glicolisis es un proceso catabólico mucho menos eficiente energéticamente que la fosforilación oxidativa, la célula responde así a su elevada demanda de glucosa (Hayashi et al., 2004; Sakagami et al., 2014).

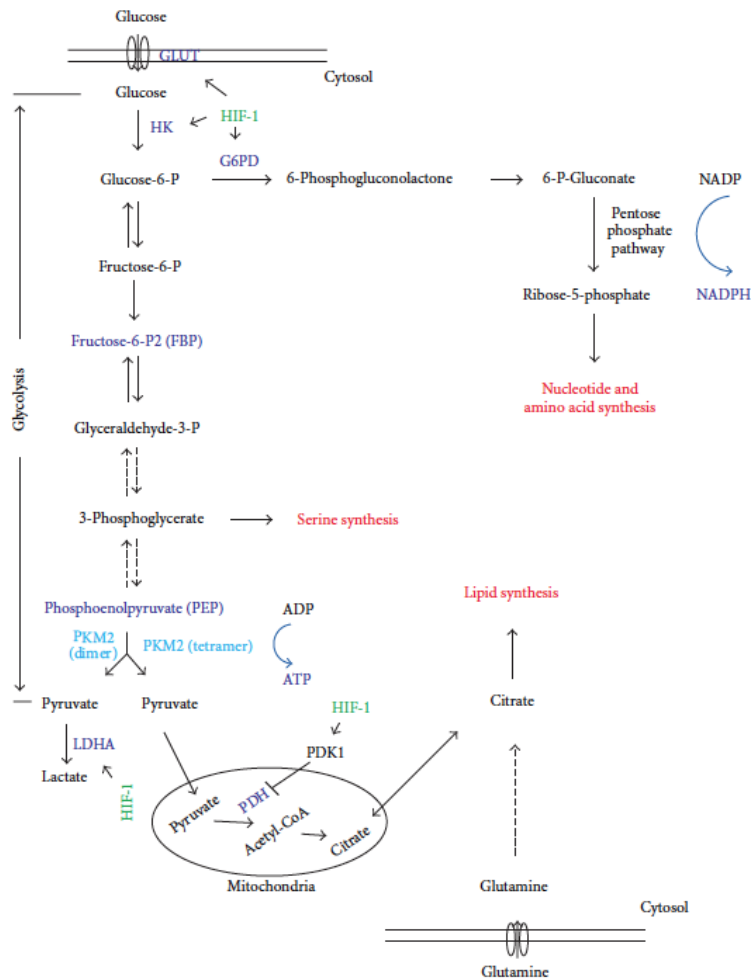


Figura 4. Esquema representativo de las rutas metabólicas utilizadas en un contexto de favorecimiento de procesos anabólicos mediante HIF1. En verde y rotulado como HIF1, las reacciones que se ven potenciadas por la acción de HIF1. GLUT: transportador de glucosa, HK: hexokinasa, G6PD: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, HIF-1: hypoxia-inducible factor 1, LDHA: lactato deshidrogenasa A, PDK1: piruvato deshidrogenasa kinasa 1, y PDH: piruvato deshidrogenasa (Wong et al., 2013).

De igual manera, aumenta la expresión la hexokinasa (HK), que activa a la glucosa convirtiéndola en glucosa-6-fosfato, el metabolito que entra o bien en glicólisis o en la ruta de las pentosas fosfato. El comienzo de esta última lo marca el paso de glucosa-6-fosfato a 6-fosfogluconolactona, paso catalizado por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, que también ve potenciada su expresión por HIF1 (Fig.4). Además, HIF1 estimula la expresión de la piruvato deshidrogenasa kinasa 1 (PDK1), que fosforila a la piruvato deshidrogenasa (PDH). De esta forma, PDH queda inactiva, no puede descarboxilar al piruvato y no hay acetil CoA disponible

para entrar al ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA) (Fig.5) (Kim et al., 2006; Papandreou et al., 2006). Por otra parte, HIF1 induce la expresi3n de la enzima lactato deshidrogenasa (LDHA), que cataliza el paso de piruvato a lactato y permite que el flujo glicolítico no se detenga y asegura aún más que no quede piruvato disponible para ser descarboxilado y que, por tanto no entre acetil CoA al TCA (Firth et al., 1995; Semenza, 2002). A nivel mitocondrial, la citocromo c oxidasa es inhibida porque al disminuir la concentraci3n de oxígeno el óxido nítrico (NO) se convierte en un inhibidor competitivo de dicha enzima (Hagen et al., 2003). De hecho, HIF1 induce la expresi3n de eNOS e iNOS en muchos tipos celulares (Cullis et al., 2006; Abe et al., 2013). Además, se interrumpe el paso de succinato a fumarato en el TCA por la supresi3n de la expresi3n de subunidad B de la succinato deshidrogenasa (SDHB). La consecuencia es la interrupci3n de dicho ciclo, la inhibici3n del complejo II, y la inhibici3n de las PHDs más allá de la disminuci3n en los niveles de oxígeno debido a la acumulaci3n de succinato, que actúa como inhibidor competitivo de estas enzimas (Lu et al., 2005, Dahia et al., 2005).

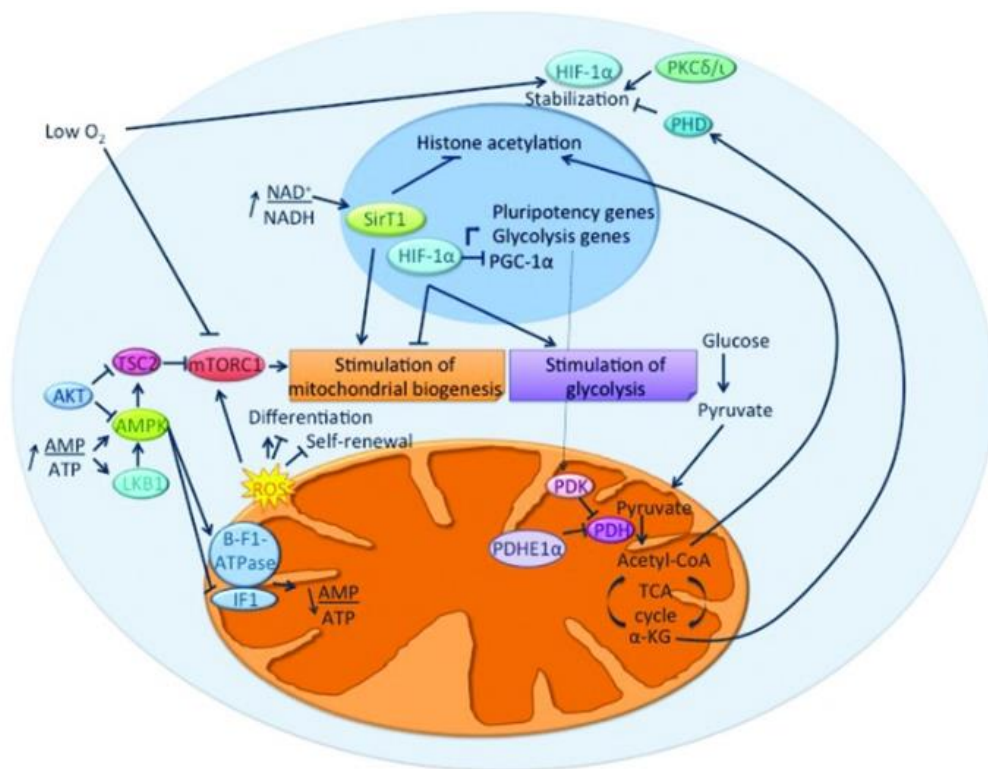


Figura 5. Representaci3n de los procesos que tienen lugar ante un bajo nivel de oxígeno. La imagen muestra cómo la estabilizaci3n de HIF1 $\alpha$  inhibe la biogénesis mitocondrial al inhibir la expresi3n de PGC-1 $\alpha$  y estimula la glicólisis induciendo la expresi3n de genes glicolíticos, como PDK (Wanet et al., 2015).

La relación entre metabolismo, potencialidad e hipoxia se muestra en nuestro modelo experimental con PGCs de ratón, cuando al comparar la expresión génica entre PGCs y EGCs, las mayores diferencias se apreciaron en una serie de genes implicados en el metabolismo celular (especialmente el glicolítico), en genes que codifican para moléculas mitocondriales y para receptores acoplados a proteínas G, además de enzimas remodeladoras de la cromatina. Además, el cultivo de PGCs en normoxia en presencia de DMOG, un inhibidor de la degradación de HIF, induce un número similar de hiEGLs al obtenido en hipoxia. HIF1 juega un papel esencial en la reprogramación de PGCs por hipoxia, ya que la proteína HIF1 $\alpha$  se detecta en condiciones de hipoxia tras únicamente 8 horas de cultivo, mientras que está ausente en normoxia (López-Iglesias, Alcaina et al., 2015).

La relación entre pluripotencialidad y metabolismo no se reduce únicamente al papel de HIF1: también Oct4 puede intervenir en la reprogramación metabólica. En ESCs de ratón, Oct4 regula la expresión de genes glicolíticos, entre los que están la hexokinasa 2 (HK2) y la isoforma M2 de la enzima piruvato kinasa (PKM2). Incluso un aumento del flujo glicolítico mediante la sobreexpresión de HK2 y PKM2 llevó a una mayor resistencia a la diferenciación tanto al suprimir Oct4 como al retirar el LIF (Kim et al., 2015). PKM2 es una de las isoformas de la piruvato kinasa, que cataliza la desfosforilación del fosfoenol piruvato a piruvato, el cual es un paso limitante y de vital importancia en vista al flujo glicolítico. PKM2 puede fluctuar entre una forma dimérica menos activa y otra tetramérica muy activa (Christofk et al., 2008). Su actividad puede ser regulada por fosforilación, como consecuencia de la señalización por factores de crecimiento. Al ser fosforilada PKM2, por ejemplo como resultado de la transducción de señales inducida por factores de crecimiento, el complejo tetramérico de mayor actividad es desensamblado por inducir la disociación de FBP, metabolito glicolítico que favorece la conformación en tetrámero, y PKM2 queda en forma monomérica o dimérica, asociada a una menor actividad (Hitosugi et al., 2009). Oct4 también puede actuar a nivel de la ya mencionada PDK1, de forma que una mayor actividad transcripcional de Oct4 puede aumentar los niveles de PDK1 (Kim et al., 2015). En el caso de las PGCs, son aquellas que presentan unos bajos niveles de Oct4 las que entran en el proceso de reprogramación, y las células resultantes tienen derivado el metabolismo hacia la glicolisis por presentar la forma fosforilada de PDH (López-Iglesias, Alcaina et al., 2015).

La hipoxia también modifica el perfil metabólico alterando la masa mitocondrial. La inhibición que HIF1 ejerce sobre c-Myc lleva a una expresión reducida de PGC1 $\beta$  y, por tanto, a una menor biogénesis mitocondrial (Fig.5) (Zhang et al., 2007). Adicionalmente, la hipoxia favorece la autofagia como una forma de supervivencia celular ante una escasez de nutrientes y permite reciclar estructuras celulares alteradas (Levine y Klionsky, 2004; Yan et al., 2005; Hamacher-

Brady et al., 2007). La autofagia, que en su ruta canónica es dependiente de las proteínas Atg5 y LC3-II, es necesaria en los momentos tempranos de la reprogramación celular y es activada tras un aumento en la expresión de Sox2 que conduce a la inactividad del complejo mTOR. De hecho, las células deficientes para Atg5 no son capaces de reducir el número de mitocondrias y de ROS tras inducir la expresión de OSKM (Wang et al., 2013). Sin embargo, la autofagia también puede tener lugar a través de otras rutas independientes de Atg5 que parecen ser más importantes durante la reprogramación celular (Ma et al., 2015).

En particular, la autofagia de mitocondrias o mitofagia tiene lugar en hipoxia como mecanismo de adaptación y la proteína central de este proceso, Bcl-2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3 (BNIP3), es una diana de HIF1 que ve aumentada su expresión en condiciones de hipoxia (Kubli et al., 2007; Zhang et al., 2008; Bellot et al., 2009). Además, la inducción de iPSCs a partir de MEFs a través de OSKM provoca un aumento en la proporción núcleo/citoplasma y cambia la morfología mitocondrial, desde mitocondrias perinucleares tubulares y con crestas bien desarrolladas a mitocondrias esféricas más pequeñas, fuera de la zona perinuclear y sin crestas (Prigione et al., 2010; Folmes et al., 2011). En ESCs, las mitocondrias se localizan alrededor del núcleo y presentan poca actividad y pequeño tamaño, con crestas poco desarrolladas (St John et al., 2005). Además, en este mismo tipo celular, la inhibición de la función mitocondrial aumenta la expresión de Oct4, Sox2 y Nanog (Huang et al., 2011; Mandal et al., 2011).

### **Hipoxia y diferenciación**

La hipoxia tiende a ser visualizada como una condición patológica. Sin embargo, hay numerosos procesos biológicos que tienen lugar en un entorno hipóxico. Por ejemplo, la embriogénesis tiene lugar en un ambiente hipóxico (1.5-5% O<sub>2</sub>), dado que el sistema circulatorio aún no se ha desarrollado y el transporte de oxígeno tiene lugar mediante difusión (Fischer y Bavister, 1993; Ezashi et al., 2005). Quinn y Harlow establecieron esta relación al apreciar *in vitro* que los blastocistos cultivados a una concentración de oxígeno superior al 5% sufrían una disminución en el número de blastómeros, lo cual no sucedía al cultivarlos entre 2.5% y 5% (Quinn y Harlow, 1978). La evidencia *in vivo* llegaría más tarde, al evidenciarse que los bajos niveles de oxígeno eran necesarios para un desarrollo correcto del tubo neural en embriones de rata en cultivo (Morris y New, 1979). En el adulto existen nichos hipóxicos donde tienen lugar procesos de diferenciación a partir de células troncales o progenitores celulares. Un ejemplo sería la médula ósea, con un 1% de oxígeno (Parmar et al., 2007; Simon y Keith, 2008), donde tienen lugar procesos de diferenciación celular a partir de progenitores, las células troncales

hematopoyéticas (HSCs), que ocupan las zonas más hipóxicas de la médula ósea (Moore y Lemischka, 2006; Parmar et al., 2007). Otro ejemplo podrían ser las células troncales neurales (NSCs) localizadas en el nicho hipóxico de la zona subgranular (SGZ) o los progenitores cardiacos del nicho epicárdico (Kimura y Sadek, 2012).

Obviamente, el nivel de oxígeno juega un papel esencial en el metabolismo energético de la célula. Mientras que las células diferenciadas obtienen normalmente la energía a partir de la fosforilación oxidativa que tiene lugar en las mitocondrias, las células cancerosas dependen en su mayoría de la glicolisis como fuente de energía. La teoría más utilizada para justificar este hecho es que el uso de la glicolisis, a pesar de su menor aporte energético, permite derivar los metabolitos hacia rutas anabólicas de lípidos, aminoácidos y nucleótidos. De esta forma, las células cancerosas son capaces de aumentar la biomasa y de dividirse rápidamente (Ward y Thompson, 2012). Esta situación tiene lugar incluso en concentraciones de oxígeno atmosféricas, fenómeno conocido como “efecto Warburg”. En el efecto Warburg tiene una gran importancia PKM2, que cataliza el paso de fosfo enol piruvato (PEP) a piruvato, obteniéndose una molécula de ATP. Dicho paso es de esencial importancia por ser la última reacción de la ruta y por ser irreversible (Boland et al., 2013; Gui et al., 2013).

Al diferenciarse, las PSCs aumentan la biogénesis mitocondrial y cambian su metabolismo desde glicolisis a OXPHOS (Varum et al., 2011). Al diferenciarse, las ESCs fusionan sus mitocondrias y maduran sus crestas (Fig.6). Además, la inhibición de la función mitocondrial en ESCs diferenciadas hizo que ratones con inmunodeficiencia combinada grave (SCID) desarrollaran tumores (Prigione et al., 2010; Huang et al., 2011; Mandal et al., 2011). Sin embargo, hay datos contradictorios en cuanto al programa metabólico de PSCs. Por ejemplo, la reprogramación de PSCs humanas a PSCs naive mediante la sobreexpresión de Nanog y Klf4 está asociada con actividad OXPHOS, e incluso las ESCs humanas naive son más dependientes del metabolismo oxidativo que las ESCs “primadas” (Takashima et al., 2014).



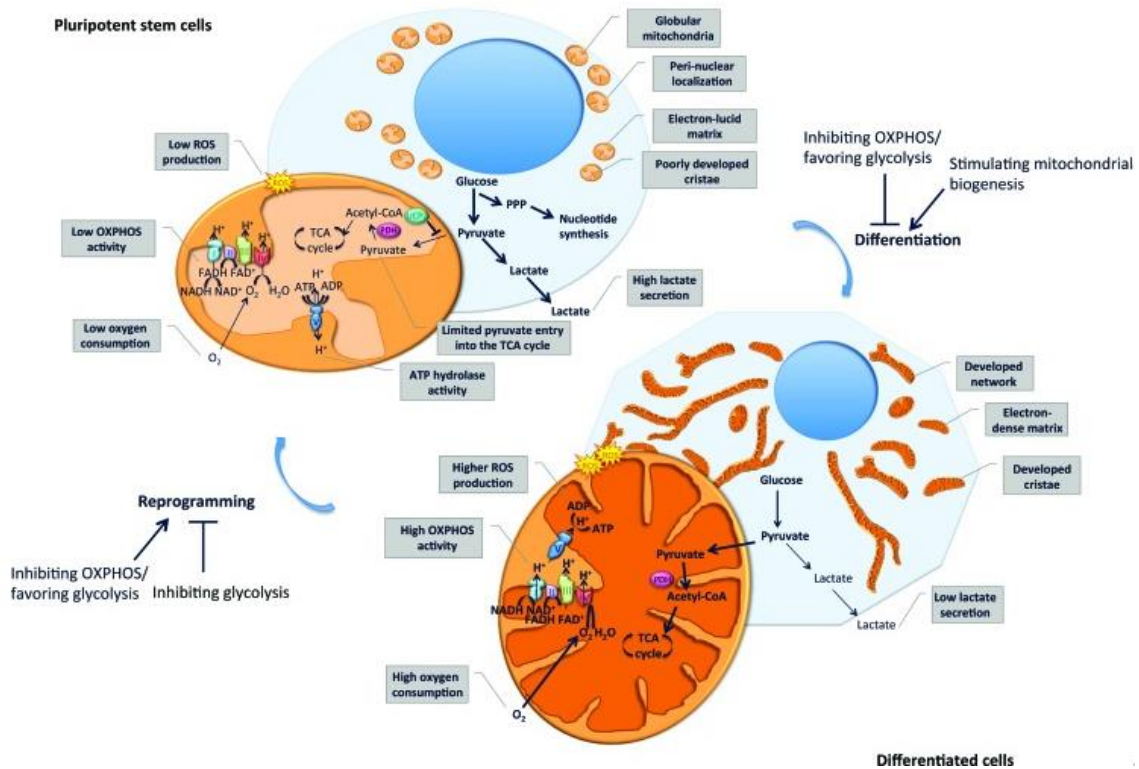


Figura 6. Representación de los cambios que tienen lugar a nivel mitocondrial como consecuencia de la diferenciación celular. La imagen muestra que las células pluripotentes poseen mitocondrias pequeñas, con crestas poco desarrolladas y localizadas en la zona perinuclear. Estas células presentan, por lo tanto, una OXPHOS reducida y una baja producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Al tener lugar la diferenciación, las mitocondrias conforman redes a lo largo del citoplasma y forman crestas perfectamente estructuradas. Por consiguiente, las células diferenciadas presentan una elevada OXPHOS, con alta producción de ROS (Wanet et al., 2015).

Las mitocondrias son altamente dinámicas y sufren procesos de fusión, regulados principalmente por mitofusinas 1 y 2 (Mfn1/2), y de fisión, donde es clave la proteína dynamin-related protein 1 (Drp1) (Smirnova et al., 2001; Cervený et al., 2007; Chen et al., 2009). Durante la reprogramación celular se ve favorecida la fisión mitocondrial y Drp1 juega un papel importante. Rex1, un marcador de pluripotencia muy utilizado, favorece la fosforilación de Drp1 en su residuo Ser616 por parte del complejo ciclina B/CDK1. Dicha fosforilación activa el proceso de fisión mitocondrial por parte de Drp1 (Son et al., 2013).

## Hipoxia y proliferación

En cuanto al papel que juega la hipoxia en la proliferación, este aspecto es más controvertido y parece estar tremendamente influenciado por el tipo celular y por el contexto. Por ejemplo, en ESCs de ratón, la hipoxia ha mostrado tanto aumentar (Lee et al., 2007) como disminuir la proliferación (Jeong et al., 2007). Uno de los primeros estudios que analizaron este tema observaron que las células troncales quiescentes ocupaban zonas más hipóxicas que abandonaban para proliferar (Cipolleschi et al., 1993). Apoyando este punto de vista, se ha descrito que en células de cáncer colorrectal la hipoxia induce una menor actividad de c-Myc y un aumento de p21, lo que provoca una parada del ciclo celular en G1 (Kaidi et al., 2007).

Tampoco hay un consenso en cuanto al papel que juegan los distintos HIFs en este aspecto. En general, se tiende a afirmar que HIF2 $\alpha$  promueve la proliferación y el mantenimiento del estado desdiferenciado, promoviendo la expresión de c-Myc y Oct4 respectivamente (Covello et al., 2006; Gordan et al., 2007a), mientras que HIF1 $\alpha$  ejerce el efecto contrario al secuestrar el factor Sp1 y al inducir la disociación del complejo Myc/Max (Koshiji et al., 2004; Gordan et al., 2007b). De hecho, en tumores renales deficientes para VHL y que sólo expresan HIF2 $\alpha$ , la proliferación dependiente de c-Myc está estimulada (Gordan et al., 2007a). Sin embargo, hay también ejemplos que ponen en cuestión estos datos, como el hecho de que en un modelo de tumor pulmonar con mutación para K-Ras la pérdida de HIF2 $\alpha$  suponga un incremento en la tasa de crecimiento del tumor (Kim et al., 2009).

En conclusión, a pesar de la cantidad ingente de conocimientos existentes hasta la fecha acerca de la reprogramación celular, aún quedan muchos interrogantes por resolver. Aún se desconocen las funciones de muchos genes implicados en la adquisición de potencialidad, así como las rutas moleculares implicadas. De igual manera, tampoco se ha conseguido interconectar distintos procesos celulares como la reprogramación metabólica, la autofagia o la modificación epigenética en el contexto de la reprogramación celular.

# *Objetivos*

Como se ha expuesto anteriormente, la reprogramación celular adolece de un escaso conocimiento de los mecanismos moleculares implicados, así como de una baja eficiencia. Estos dos factores impiden la aplicación de la tecnología de las iPSCs a la práctica clínica a corto plazo.

La reprogramación de PGCs es un proceso más eficiente que el de la obtención de iPSCs y con una cinética acelerada, que permite obtener resultados en tan sólo una semana. Además, no se requiere la introducción de material genético y puede alcanzarse la reprogramación utilizando únicamente factores solubles.

Con todos estos antecedentes expuestos, se persiguieron los siguientes objetivos:

- 1.- Investigar el papel de la reprogramación metabólica en la reprogramación celular de las PGCs mediante el cultivo en condiciones de hipoxia y el uso de factores solubles que interfieren en el metabolismo energético.
- 2.- Estudiar el papel de la autofagia en general y de la mitofagia en particular en el proceso de reprogramación a través del uso de activadores e inhibidores de dicho proceso.
- 3.- Analizar el papel de la epigenética interfiriendo en las modificaciones a nivel de DNA y de histonas mediante el uso de modificadores epigenéticos.
- 4.- Identificar rutas de señalización celular implicadas en la reprogramación de PGCs mediante estudios de expresión génica y utilizando diversos activadores e inhibidores.
- 5.- Dilucidar las moléculas que gobiernan el establecimiento de las características de pluripotencia y autorenovación de forma diferencial en el proceso de reprogramación de las PGCs.

# *Materiales y métodos*

## Animales de experimentación

Todos los experimentos fueron realizados con el visto bueno del Comité Ético de Bienestar Animal (CEBA) del Hospital de La Paz, de La Universidad Autónoma de Madrid y de la Dirección General de Agricultura y Ganadería de la Consejería de Medio Ambiente, Administración Local y Ordenación del Territorio de la Comunidad de Madrid. En estos experimentos se utilizaron ratones (*Mus musculus*) transgénicos que presentan una construcción que permite la expresión de la proteína fluorescente verde (GFP) bajo la influencia del promotor de Oct4. En concreto, la expresión de GFP de esta cepa está bajo la influencia del promotor, del *enhancer* distal (DE) y del *enhancer* proximal (PE). El DE es el responsable de la activación de la expresión de Oct4 en ES y PGCs (Yeom et al., 1996) (Fig. 7). Los ratones utilizados fueron pertenecientes a la cepa C57BL/6. Dichos ratones fueron desarrollados por Boiani et al. (2004) y fueron donados al Laboratorio de Ingeniería Celular por parte del grupo de investigación del Prof. Hans Schöler, del Instituto Max Plank de Biología Molecular, en Münster, Alemania. Los ratones recibieron una alimentación *ad libitum*.

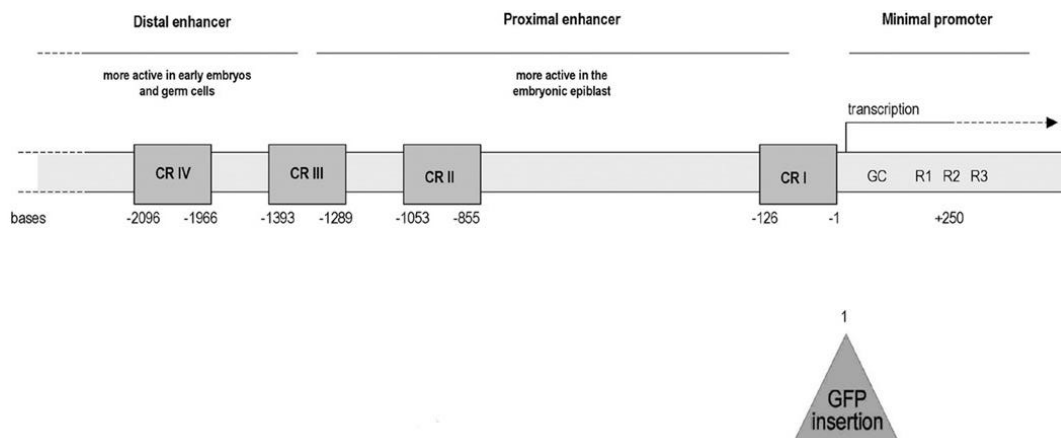


Figura 7. Representación esquemática de la construcción presente en los ratones que fueron utilizados para este estudio. Se representan tanto el enhancer distal (más activo en células germinales y embriones tempranos) como el enhancer proximal (más activo en el epiblasto embrionario) con sus regiones conservadas (CR), así como la zona en la que se inserta la información codificante para GFP. Dibujo modificado de Boiani et al., 2004.

La elección de la especie *Mus musculus* permite la obtención de cepas modificadas genéticamente por el alto conocimiento que se posee de su genoma. Además, presenta la ventaja de compartir con el ser humano una gran variedad de procesos biológicos. Por otra parte, el uso del ratón como animal de experimentación posibilita la utilización de un gran

número de individuos, ya que presentan un alto número de camadas por año (5-10), con hasta 12 individuos por camada. Esta especie presenta además un corto periodo de gestación (18.5-19.5 días en las primíparas y 19-21 días en las múltiparas), lo cual permite una disponibilidad más rápida de animales. Asimismo, las hembras son fértiles desde las 6 semanas de vida, y los machos, desde las 6-8 semanas. Las características biológicas del ratón cobran especial importancia en este estudio, ya que no sólo permiten una mayor disponibilidad de animales de experimentación, sino que las hembras utilizadas en el estudio para la extracción de embriones presentan un alto número de los mismos para el aislamiento de las PGCs.

### **Genotipado de animales de experimentación**

Para garantizar que los animales transgénicos no perdían la construcción que permite la identificación de la expresión de Oct4 a través de GFP, se realizaron genotipados periódicos. Para ello, se seccionó 1 centímetro de cola de varios individuos al azar de la colonia. Cada cola fue incubada durante toda la noche a 55 °C en agitación en 500 µL de tampón de lisis, compuesto por 0.1 M Tris-HCl, pH=8.5; 5 mM Ácido Etilendiaminotetraacético (EDTA) (Sigma); 0.2% SDS; 0.2M NaCl (Merck) y 0.2 mg/mL Proteinasa K (Boehringer Ingelheim GmbH). Posteriormente, las colas digeridas fueron sometidas a un pulso de vórtex durante aproximadamente 1 minuto para acabar de disgregarlas y se centrifugaron 5 minutos a 1000g en una centrífuga Nahita Minivite 2716 (Auxilab). El sobrenadante fue recogido y se pipeteó sobre 500 µL de isopropanol (Amresco). Los tubos se agitaron suavemente volteándolos manualmente hasta que el DNA comenzó a hacerse visible. Utilizando capilares de vidrio (Kimble Chase), el DNA fue recogido debido a interacciones electrostáticas y se disolvió en 100 µL de agua destilada.

Una vez disuelto el DNA, se determinó su concentración mediante espectrofotometría utilizando un Nanodrop (ThermoFisher Scientific). Se determinó que el ratio  $A_{260}/A_{280}$  fuera igual o mayor a 1.8 para descartar contaminación por proteínas. Posteriormente, se procedió a realizar una PCR para la detección de DNA codificante para la proteína GFP con los cebadores:

Forward: 5'-CGT AAA CGG CCA CAA GTT-3'

Reverse: 5'-TCA GCT CGA TGC GGT TCA C-3'

En un volumen final de 20 µL se añadieron 120 ng de DNA, PCR buffer (Qiagen), 0.65 U HotStarTaq-DNA Polymerase (Qiagen), 2.5 nM dNTPs (Sigma) y 2.5 µM de cada cebador. El volumen final se alcanzó añadiendo agua destilada estéril. Como control negativo se utilizó una muestra con todos los reactivos salvo el DNA, mientras que el control positivo incluyó en la reacción una muestra de DNA de los ratones originales.

Las condiciones de PCR fueron fijadas en un termociclador (Biometra GmbH), consistiendo en un primer paso de desnaturalización de 15' a 95°C; 30 ciclos de 30'' a 94°C para desnaturalizar, 1' a 59°C para el alineamiento de los cebadores y 1' a 72°C para la elongación; y finalmente 10' a 72°C para permitir una elongación final y una bajada a 4°C para conservar el DNA. El producto de la PCR fue separado por electroforesis en gel de agarosa (Sigma) al 1% y con 0.034  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de bromuro de etidio. El gel fue finalmente visualizado en un transiluminador ultravioleta (Uvitec). La banda de interés posee 313 pares de bases (pb) (Fig. 8). Para verificar el tamaño se cargó el marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

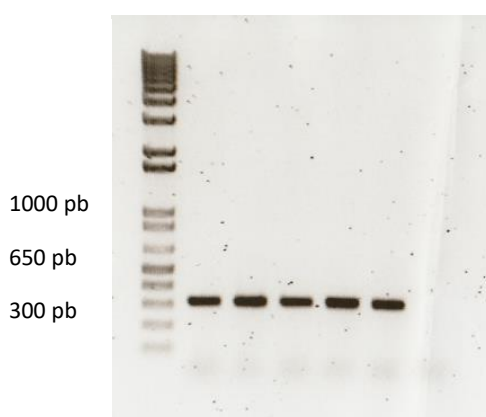


Figura 8. Gel de agarosa al 1% correspondiente al genotipado para GFP de una muestra aleatoria de 5 ratones transgénicos. Las 5 bandas, de 313 pares de bases, se sitúan levemente por encima de la banda de 300 pares de bases correspondiente al patrón. El último carril sin banda corresponde al control negativo.

### **Cultivo celular**

#### *Células nutricias STO*

Las PGCs requieren de células que actúen de soporte para poder sobrevivir. En este estudio se utilizaron células Sandoz Thioguanine- and Ouabain- resistant (STO), adquiridas de la American Type Culture Collection (ATCC). Estas células son fibroblastos embrionarios de ratón inmortalizados que presentan en membrana el ligando de Kit (KL o SCF), el cual interactúa con la molécula de membrana c-Kit, en PGCs. Dicha interacción permite tanto un anclaje al sustrato como la transducción de señales que favorecen la supervivencia de las PGCs (De Miguel y Donovan, 2003). Dado que las células STO han sido inmortalizadas, es posible una mayor expansión y una mayor disponibilidad en comparación con los fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs), que aunque presentan una mayor cantidad de SCF en membrana no se expanden con tanta facilidad. Además, estos últimos poseen el inconveniente de que presentan inestabilidad genómica más allá del pase 4, por lo tanto el utilizar las células STO aporta la



ventaja de no tener que extraer fibroblastos a partir de embriones y la posibilidad de expandir enormemente el cultivo con el fin de disponer de un gran stock de células.

Para el cultivo de las células STO se utilizó medio Dubecco's Modified Eagle Medium (DMEM) con alta concentración de glucosa (4.5 g/L) y con GlutaMAX (862 mg/L) y piruvato (110 mg/L) (Gibco/Invitrogen). Dicho medio fue suplementado con un 10% de suero bovino fetal (FBS) (Gibco/Invitrogen) y un 1% de penicilina/streptomina (Gibco/Invitrogen).

Las células STO fueron sembradas a una confluencia del 100% para formar una monocapa que permitiera la adhesión de las PGCs. A tal efecto, se añadió en primer lugar gelatina procedente de piel porcina (Sigma) al 1% en agua, en un volumen suficiente como para cubrir toda la superficie del pocillo. Las placas, ya fueran de 96 pocillos (Corning), de 24 o cámaras de cultivo tipo chamber slide con Permanox Nunc-Lab-Tek (Thermo Scientific), fueron incubadas a 37°C durante al menos 30'. Pasado ese tiempo, la gelatina fue retirada y se sembraron las células siguiendo la proporción de  $1.5 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>.

#### *Inactivación mitótica de las células STO*

Las células STO sembradas para formar la monocapa se inactivaron mitóticamente para no desplazar el cultivo de las PGCs y servir únicamente de soporte que permitiera la supervivencia de estas últimas. Para ello, se cultivaron en placas p100 (Corning) en presencia de Mitomicina C (Sigma) a una concentración de 10 µg/mL durante 3 horas. Transcurrido ese tiempo, las placas fueron lavadas tres veces con PBS y dos veces con medio STO. Finalmente, se dejaron incubar toda la noche a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Al día siguiente, se levantaron las células con tripsina 0.5% y 0.2% EDTA (Gibco), y se congelaron en viales de congelación (Corning) en medio STO+10% DMSO.

#### *Aislamiento y cultivo de PGCs*

Se aislaron las PGCs de 8.5 dpc. Con tal fin, se prepararon tríos formados por un semental y dos hembras y las hembras se inspeccionaron diariamente para examinar la presencia de tapón vaginal. Dicha estructura se utiliza para confirmar si ha habido acoplamiento, ya que el tapón vaginal se forma por la secreción de las glándulas accesorias del macho junto con otras secreciones vaginales de la hembra. Así, se mantienen unas condiciones más favorables para la supervivencia de los espermatozoides y se impide la monta por parte de otro macho. Dado que el tapón persiste entre 6 y 12 horas y, presumiblemente, el acoplamiento tiene lugar a la mitad de su periodo nocturno (su periodo de actividad), se consideró que la visualización del tapón por la mañana indicaba 0.5 dpc. De este modo, las ratonas fueron sacrificadas 8 días después para la obtención de embriones 8.5 dpc.

Las ratonas fueron sacrificadas por dislocación cervical y se utilizó material quirúrgico estéril para la extracción de embriones. Utilizando unas tijeras, se disecó el abdomen, cortando tanto la piel como el peritoneo para acceder a los úteros. A continuación, se cortaron los úteros y, con la ayuda de unos fórceps, se extrajo cada una de las placentas realizando un corte a la altura de la decidua (Fig. 9). Las placentas seccionadas se recogieron en una placa Petri con PBS frío que se mantuvo en hielo durante todo el proceso. Posteriormente, con ayuda de unas pinzas, se extrajeron los embriones del interior de las placentas. Este proceso fue realizado en placas p100 con PBS estéril bajo estereomicroscopio y luz fría.

En el estadio embrionario 8.5 dpc, las PGCs se encuentran en estado migratorio y se localizan en el mesodermo extraembrionario y en la parte más caudal del embrión. Por este motivo, se seccionó el tercio caudal del embrión junto con el mesodermo extraembrionario, justo en el punto inferior donde ya no se visualizan los somitas (Fig. 9).

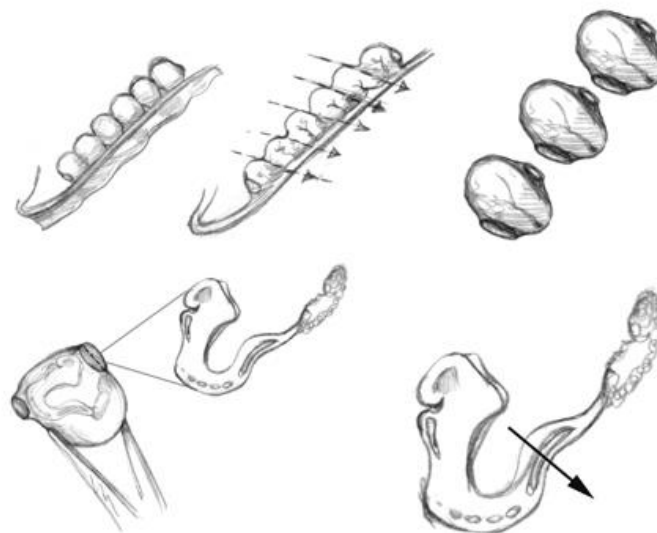


Figura 9. Esquema ilustrativo del proceso de disección de embriones de ratón de 8.5 dpc para el aislamiento de PGCs. Los dibujos muestran cómo se extrae el útero, donde están alojadas las placentas y por dónde se corta cada una de ellas. Como resultado, quedan las placentas sueltas con dos espacios que permiten la salida del embrión y su posterior disección (De Miguel y Donovan, 2003).

Las porciones de los embriones fueron trasladadas a un tubo cónico de centrifuga de 15 mL (Corning) con FBS frío para permitir las decantar. Después, se retiró el FBS, se añadió 1 mL de tripsina 0.005%, 0.002% EDTA y se incubó el tubo a 37°C durante 7 minutos. Se retiró la tripsina

y se procedió a la disgregación de los fragmentos de embriones realizando suaves agitados con pipeta hasta conseguir una suspensión homogénea con medio de PGCs, consistente en Dubecco's Modified Eagle Medium (DMEM) con alta concentración de glucosa (4.5 g/L), GlutaMAX (862 mg/L) y piruvato (110 mg/L) (Gibco/Invitrogen) suplementado con un 15% de suero bovino fetal (FBS) (Gibco/Invitrogen) previamente testado para PGCs y EGCs, 1% de penicilina/streptomicina (Gibco/Invitrogen), 1% de aminoácidos no esenciales (Gibco/Invitrogen), 40 µg/mL de forskolina (Sigma), 10 ng/mL de stem cell factor (SCF, R&D Systems) y 1000 U/mL de leukemia inhibitory factor (LIF/ESGRO, Millipore). Una vez ya obtenida la suspensión de células donde están contenidas las PGCs, se retiró el medio STO de los pocillos correspondientes, que fue suplido por medio de PGCs. Finalmente, se sembraron el equivalente a 50-100 PGCs por cada pocillo de 96, un máximo de 500 PGCs en cada pocillo de 24 y 150 en cada pocillo de las cámaras chamber slide.

Los cultivos primarios de PGCs fueron cultivados a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, bien en condiciones de normoxia (21% O<sub>2</sub>) en un incubador Hera Cell 150, Heraeus, o bien en condiciones de hipoxia (3% O<sub>2</sub>) en un incubador Sanyo CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> MCO-18. El medio de PGCs fue cambiado diariamente con los componentes descritos anteriormente y con la eventual adición de factores solubles con el fin de influir en el proceso de reprogramación. Cada condición experimental se llevó a cabo por triplicado en tres pocillos y al menos en tres experimentos independientes.

#### *Pase de PGCs*

Para realizar pases de los cultivos de PGCs, se retiró el medio y se realizó un lavado con PBS para añadir después colagenasa (Gibco) a concentración 1 mg/mL con el fin de disgregar completamente las colonias. La incubación con colagenasa fue de 5 minutos a 37°C. Transcurrido ese tiempo, se añadió tripsina al 0.5%, 0.2% EDTA (Gibco) y se dejó incubar a 37°C durante 5 minutos adicionales. Posteriormente se añadió medio de PGCs para neutralizar la tripsina, el cultivo se pipeteó intensamente y la suspensión fue centrifugada a 400g, 4°C, durante 5 minutos. El sobrenadante fue retirado, las células se resuspendieron en medio de PGCs con factores y fueron pipetadas en placas nuevas en las que se había sembrado previamente una monocapa de células STO mitomicinadas.

#### *Utilización de otras líneas celulares*

Con el fin de obtener controles para diversos experimentos realizados en esta tesis doctoral, se utilizaron diversas líneas celulares:

E14TG2a: Línea celular de células troncales embrionarias de *Mus musculus*, derivadas de blastocisto y capaces de proliferar sin monocapa de células nutricias. Se cultivaron en placas Petri de 100 mm de diámetro (p100) (Corning) tratadas previamente con gelatina al 1% (Sigma). El medio de cultivo consistió en medio Glasgow Minimum Essential Medium (GMEM) (Gibco/Invitrogen) suplementado con 10% FBS ES-Qualified (Whittaker Bioproducts), 1% penicilina/streptomycin (Gibco/Invitrogen), 2mM L-Glutamina (Gibco/Invitrogen), 0.1 mM aminoácidos no esenciales (Gibco/Invitrogen), y 0.1 mM  $\beta$ -mercaptoetanol (Sigma). Se añadieron diariamente 1000 U/mL de LIF para evitar la diferenciación.

Cos-7: Línea celular de riñón procedente de *Cercopithecus aethiops* transformadas mediante SV-40, utilizada como control para las inmunofluorescencias frente a HIF1 $\alpha$  y HIF2 $\alpha$ . Las células Cos7 fueron cultivadas de forma análoga a lo descrito anteriormente para las células STO.

### **Factores solubles**

Los reactivos utilizados durante este estudio son los siguientes:

2-metoxiestradiol (Sigma): Inhibidor de la activación de la transcripción mediada por HIF.

Ácido ascórbico (Sigma): Donador de electrones que actúa como cofactor de gran cantidad de enzimas, funcionando como antioxidante, ayudando a eliminar especies reactivas de oxígeno.

Ácido valproico (Sigma): Inhibidor de deacetilasas de histonas (HDACs).

Antimicina A (Sigma): Inhibidor de la transferencia de electrones en el complejo III mitocondrial.

BAPTA-AM (Enzo Life Sciences): Quelante intracelular de cationes bivalentes, en especial de Ca<sup>2+</sup>. Como consecuencia, inactiva a las Proteín-Kinasas C (PKCs) de tipo clásico.

Butirato sódico (Sigma): Inhibidor de deacetilasas de histonas (HDACs).

CCCP (Sigma): Ionóforo desacoplador de la fosforilación oxidativa en mitocondrias.

CHIR99021 (Millipore): Inhibidor de GSK3 $\beta$ .

Ciglitazone (Millipore): Agonista selectivo de PPAR $\gamma$ .

Cloroquina (Sigma): Inhibidor de autofagia por impedir el descenso de pH en el lisosoma y la unión fagosoma-lisosoma.

DASA (Calbiochem): Activador de la isoforma M2 de la enzima piruvato kinasa, al estabilizar su forma tetramérica.

Dicloroacetato (Sigma): Inhibidor de la enzima piruvato deshidrogenasa kinasa.

DZNep (Millipore): Inhibidor de la histona metiltransferasa EZH2.

Espermidina (Sigma): Inductor de autofagia.

Estaurosporina: Inhibidor de amplio espectro de las PKCs.

FR236924 (Tocris): Activador selectivo de la isoforma  $\epsilon$  de la PKC (Prkce).

Inhibidor de la traducción de HIF2 $\alpha$  (Millipore): Inhibidor de la traducción de HIF2 $\alpha$  por unirse a la región 5'UTR del mRNA.

Inhibidor de la translocación de Prkce (Millipore): Inhibidor de la translocación de Prkce desde Golgi, evitando su activación al unirse a diacil glicerol (DAG).

mdivi-1 (Sigma): Inhibidor de las dinaminas Drp1 y Dnm1, implicadas en la división mitocondrial.

Mitramicina A (Sigma): Inhibidor del factor de transcripción Sp1, relacionado con la respuesta mediada por HIF1 $\alpha$  en hipoxia.

Resveratrol (Sigma): Antioxidante e inductor de autofagia.

SC-79 (R&D): Activador de la enzima Akt.

Tapsigargina: Inhibidor de la bomba de calcio que introduce dicho ion desde el citoplasma al retículo endoplásmico.

Tranilcipromina (Enzo Life Sciences): Inhibidor de la enzima LSD1, de tipo histona demetilasa.

### **Identificación de PGCs y células reprogramadas**

En los ensayos de inducción o de represión de la reprogramación, los cultivos fueron llevados a 7 días. La razón fue que las PGCs no sobreviven aisladas en cultivo más allá de una semana, lo que permite identificar PGCs no reprogramadas aisladas y colonias reprogramadas. Además, las células STO pierden la inactivación mitótica a los 8-10 días y comienzan a proliferar, desplazando por completo el cultivo de PGCs.

Alcanzada la semana de cultivo, se retiró el medio de cultivo, se realizó un lavado con PBS y se fijaron las células con paraformaldehído (Panreac) al 4% en PBS a pH=7.4, durante 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se retiró el paraformaldehído y se procedió a un primer lavado con PBS y otro ulterior con agua destilada obtenida a partir de un destilador Millipore Elix©. Para identificar tanto a las PGCs como a las células reprogramadas se realizó una inmunohistoquímica frente a fosfatasa alcalina, marcador de células pluripotentes que también se encuentra presente en nuestras células de interés pero no en las células STO. Se preparó una

mezcla de reacción en agua destilada consistente en 1 mg/mL de Fast-Red TR (Sigma) y 40 µL/mL de Naphtol AS-MX (Sigma) a pH=9. Dicha mezcla se añadió a los pocillos y se dejó incubar en oscuridad a temperatura ambiente durante al menos 30 minutos, momento a partir del cual se comprobó la existencia de tinción en un microscopio óptico invertido (Axiovert 200, Zeiss). Realizada la comprobación, se realizó un lavado final con agua destilada y se procedió al conteo. Dado que las PGCs crecen de forma aislada mientras que las EGCs (Donovan et al., 1986) y las células reprogramadas lo hacen en colonia, se consideraron células reprogramadas aquellos grupos de células conformados por 8 o más células.

### **Análisis estadístico**

Los experimentos de inducción de pluripotencialidad fueron sometidos al test de la t de student mediante el software Sigma Plot Scientific Graphing System 4.10 (Systal Software). Se fijó el nivel de significación en 0.05. Para considerar como reprogramador a cada factor soluble utilizado se fijó el requisito de obtener significación estadística en tres experimentos independientes. Dicho criterio no se aplicó a los casos del CHIR (inhibidor de Gsk3β) y de SC79 (activador de Akt), donde se apreció reprogramación en numerosos pocillos de diversos experimentos pero con mucha variabilidad. Observada esta más que evidente tendencia en más de 5 experimentos independientes, se dio por buena una única significación estadística.

En el caso de los experimentos de los niveles de Oct4, se compararon las varianzas intra-grupo utilizando el test estadístico F-Snedecor, fijando el nivel de significación en 0.05.

### **Estudio de la expresión génica en PGCs y hiEGLs por RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR)**

En vista a realizar un estudio comparativo de expresión génica entre PGCs y hiEGLs, se cultivaron PGCs aisladas según el protocolo descrito anteriormente sobre una monocapa de células STO inactivadas mitóticamente en placas de 24 pocillos (Corning) durante 48 horas en condiciones de normoxia e hipoxia al 3%. La elección de este periodo de tiempo se enfocó a detectar genes implicados en las fases tempranas de la reprogramación.

En primer lugar, se procedió al diseño de los cebadores para 73 genes. Se eligieron cebadores que amplificaran en la frontera entre diferentes exones con el fin de que una eventual contaminación por DNA genómico fuera improbable debido a cortos amplicones (entre 60 y 150 pares de bases) y cortos tiempos de elongación. Se confirmó que todos los cebadores presentaban una temperatura de fusión muy próxima a 60°C utilizando la herramienta informática Primer 3 WWW Primer Tool, desarrollada por el Whitehead Institute for Biomedical Research (Cambridge, Massachusetts, EEUU). Además, se confirmó que los cebadores se unían

de forma exclusiva a los genes de interés mediante la herramienta Basic Local Alignment Tool (BLAST). Una vez realizada esta primera fase del diseño, se validaron 49 de los 73 genes iniciales, descartando aquellos que no mostraban amplicones claros entre exones con la temperatura de fusión deseada y/o con un correcto resultado tras su validación usando BLAST. Los cebadores validados fueron sintetizados por la casa comercial Bonsai.

A continuación, se procedió a validar las reacciones de amplificación. Debido al escaso número de PGCs por embrión, estas comprobaciones previas fueron realizadas en células troncales embrionarias (ESCs) de la línea E14TG2a. De este modo, se garantizaba la expresión de todas las categorías de genes seleccionados. Las células E14TG2a fueron cultivadas en placas p100 tratadas previamente con gelatina al 1%. A la composición descrita anteriormente para el cultivo de ESCs se añadieron diariamente 1000 U/mL de LIF para evitar su diferenciación. Dado que el número de células elegido para trabajar con PGCs era de 3000, las células E14TG2a fueron levantadas con tripsina al 0.5%, EDTA 0.2% y contadas para aislar el RNA de 3000 células utilizando RNeasy Minikit (Qiagen). A continuación, se verificó la presencia de RNA atendiendo a su concentración y a la calidad del mismo según el cociente  $A_{260}/A_{280}$ . Posteriormente se realizó un tratamiento con DNAsa (Duviz) para eliminar cualquier resto de DNA genómico y se procedió a realizar la retrotranscripción utilizando el kit high capacity cDNA reverse transcription (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los ciclos programados fueron: 10 minutos a 25°C, 120 minutos a 37°C y 5 minutos a 85°C. Debido al bajo número de células utilizadas, se llevó a cabo un paso de preamplificación con el fin de aumentar la cantidad de cDNA disponible para la qPCR. Para ello se utilizó el kit TaqMan PreAmp Master Mix (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los cebadores añadidos a la mezcla de reacción consistieron en las 49 parejas correspondientes a 49 genes de interés para su posterior validación. Los ciclos programados fueron: un ciclo inicial de 10 minutos a 95°C y 10 ciclos con un primer paso de 15 segundos a 95°C y un segundo paso de 4 minutos a 60°C, en un termociclador Biometra TPersonal.

De modo paralelo y con el fin de validar los genes implicados en apoptosis y supervivencia, se realizó un experimento adicional utilizando estaurosporina a concentración 0.5  $\mu$ M en células embrionarias de la línea E14TG2a sembradas en una placa Petri de 100 mm. Este tratamiento tuvo como finalidad la inducción de apoptosis para comprobar la expresión de genes involucrados en apoptosis y supervivencia y así comprobar la correcta implicación de los genes incluidos en esta categoría. A las 24 horas, las células fueron despegadas de la placa mediante digestión con tripsina. Todos los pasos desde el aislamiento de RNA se realizaron de forma análoga al apartado anterior.

Finalmente, se realizó la PCR cuantitativa para cada uno de los 49 genes, con un duplicado tecnológico, incluyendo un control sin cDNA en cada reacción utilizando un termociclador LightCycler 2.0 (Roche). Se utilizó el kit Quantimix Easy Kit (Biotools) siguiendo las instrucciones del fabricante y se añadió a la mezcla de reacción SYBR-Green (Invitrogen). Los ciclos programados fueron: un paso inicial de 5 minutos a 95°C y 40 ciclos consistentes en 10 segundos a 95°C, 10 segundos a 58°C, 30 segundos a 72°C y 5 segundos a la temperatura de lectura escogida para cada gen. Finalmente, se llevó a cabo una curva de fusión desde los 75°C a los 95°C siguiendo una tasa de incremento de temperatura de 0.1°C/s para detectar productos inespecíficos. Como último procedimiento de validación, se comprobó que en la curva de fusión sólo apareciera un producto como resultado de la PCR. Tras esta comprobación, los genes incluidos en el estudio y analizados posteriormente en PGCs fueron los detallados en la tabla 1:

Gen	Función biológica	Primer fwd 5'-3'	Primer rev 3'-5'
Ecat1	Pluripotencia	ctcactattgccgcatgaaa	atacgcgacgctcaactcc
Eras		tcctaaccaccaactgtcc	gcagctcaaggaagaggtgt
Dppa3		ttgttcggattgagcagaga	ggcagaaagtgcagagacatc
Stat3		acatctgcctggaccgtct	ttaatttgtggcgggtctg
Grb2		tcaatgggaaagatggcttc	ttgctgagcatttcttctgc
Sall4		tcaccacgaaaggcaacc	ggcgggaggagttatt
Fthl17		gtgcctctatgcctctacg	tggcagttgtgtgacttgg
Klf4		gggaaggagaagacactgc	gtcgctcatgtgagagagttc
Ctnnb1		gagctgaccagttccctcttc	caccaatgtccagccaaga
Ehmt1		Remodelación epigenética	gcaatcgtgtggtgcaaa
Ehmt2	cttcttcagctccagggaca		ccagaatcggtcaccgtag
Jmjd3	ggttcacttcggctcaactt		tacggacctccaccgtatgt
Bbc3	Ciclo celular/Supervivencia	atggcggacgacctca	ggtgtcgaatgctgctctct
p53		gccatggccatctacaagaa	tccaccggataagatgct
p21		gaaaacggaggcagacca	acttcagggttttctcttgca
Bnip3		aaaacagcactctgtctgagga	gcttcgggtgtttaaaggga
Rb1		tgtgagcatcgaatcatgga	ccatccttgactgcttaatg
c-Jun		gagtgctagcggagtcttaacc	ctccagacggcagtgctt
JunD		cctttgtacctccgagtagg	ggacactcccgttctctcttc
Pac1		ttcttgaggcggttt	gcaggagcttcagagcaca
Perp		ggctgccagagcctcat	agaatgaagcagatgcacagg



PPAR $\gamma$	Transducción de señales	tggggatgtctcacaatgc	tgggttcagctggctgata
Camk2 $\gamma$		acatccaacattgtgcgtct	aaacaactcccctccgtaa
Prkce		aagaacaggaaccctgac	acttggtgggcatgttgac
PPP3cc		accctgcagtttgaattttt	gaaagccagttgcttggttc
Gsk3 $\beta$		tcaaattccctcaaatcaagg	caattgcctctggtggagtt
Blimp1		gtctgtgccaagacgttcg	gaaaggcgttctccactg

Tabla 1. Listado de los cebadores utilizados para los estudios de expresión génica realizados mediante PCR cuantitativa.

### Inmunofluorescencias

Las células de interés fueron cultivadas en placas de 24 pocillos, sobre cristales estériles de 13mm de diámetro (Fisher). Transcurrido el tiempo requerido de cultivo, las células fueron lavadas con PBS y fijadas con paraformaldehído al 4% de forma análoga a la identificación de PGCs y células reprogramadas por fosfatasa alcalina. Una vez finalizada la fijación, se procedió a realizar la inmunofluorescencia.

La albúmina de suero bovino (BSA) y la gelatina porcina utilizadas fueron de la casa comercial Sigma. Los sueros utilizados fueron o bien suero de cabra (Vector Laboratories) o bien suero de caballo (Sigma).

Los procedimientos para cada una de las inmunofluorescencias fueron los siguientes:

SSEA1 (R&D): Este anticuerpo fue el utilizado para la detección de las PGCs. Esta proteína se expresa en la membrana de las PGCs, pero no de las STO. Con lo cual, fue utilizado en paralelo a cada uno de los siguientes anticuerpos. El anti-SSEA1 se añadió a una concentración 1:200 en la solución requerida para cada uno de los otros anticuerpos y siguiendo el protocolo de cada uno de ellos. El anticuerpo secundario utilizado fue o bien anti-IgM de ratón conjugado con FitC (Sigma), a concentración 1:500, o bien anti-IgM de ratón conjugado con Texas Red (Vector) a concentración 1:500, en cada una de las soluciones requeridas para los otros anticuerpos.

Los procedimientos utilizados para una de las proteínas de interés se detallan en la Tabla 2.

Antígeno	Permeabilización	Bloqueo	Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario	Obtención de señal
HIF1 $\alpha$	Triton X-100 al 0.5% en PBS, 15' a temperatura ambiente.	PBS + 1% BSA + 2% gelatina porcina, 30' a temperatura ambiente.	Anti-HIF1 $\alpha$ (fabricado y cedido por la Dra Berra, CIC bioGUNE) a concentración 1:1500 en solución de bloqueo. Incubación durante la noche (o/n) a 4°C.	Anti-IgG de conejo conjugado con biotina (Vector), a concentración 1:500 en solución de bloqueo. Incubación durante 1h en oscuridad a temperatura ambiente.	Avidina d conjugada con Texas-Red (Vector), a concentración 1:500 en solución de bloqueo. Incubación durante 30' en oscuridad a temperatura ambiente.
HIF2 $\alpha$	Triton X-100 al 0.1% en TBS, 15' a temperatura ambiente.	TBS + 5% de suero de cabra + 1% gelatina porcina + 1% BSA, 15' a temperatura ambiente.	Anti-HIF2 $\alpha$ (Abcam) a concentración 1:100 en solución de bloqueo. Incubación o/n a 4°C.	Anti-IgG de conejo conjugado con biotina (Vector), a concentración 1:500 en solución de bloqueo. Incubación durante 1h en oscuridad a temperatura ambiente.	Avidina D conjugada con Texas-Red (Vector), a concentración 1:500 en solución de bloqueo. Incubación durante 30' en oscuridad a temperatura ambiente.
p-PDH	Triton X-100 al 0.2% en PBS, 5' a temperatura ambiente.	PBS + 5% BSA, 30' a temperatura ambiente.	Anti-pPDH (Abcam) a concentración 1:400 en PBS + 0.1% BSA. Incubación o/n a 4°C.	Anti-IgG de conejo conjugado con biotina (Vector), a concentración 1:200 en PBS + 0.1% BSA. Incubación durante 1h en oscuridad a temperatura ambiente.	Avidina D conjugada con fluoresceína (Vector), a concentración 1:500 en PBS + 0.1% BSA. Incubación durante 30' en oscuridad a temperatura ambiente.

c-Myc	Triton X-100 al 0.2% en PBS, 15' a temperatura ambiente.	PBS + 0.1% Triton X-100 + 10% suero de cabra, 30' a temperatura ambiente.	Anti-c-Myc (Santa Cruz) a concentración 1:25 en PBS + 1% BSA. Incubación o/n a 4°C.	Anti-IgG de conejo conjugado con biotina (Vector), a concentración 1:400 en solución de bloqueo. Incubación durante 1h en oscuridad a temperatura ambiente.	Avidina D conjugada con Texas Red (Vector), a concentración 1:500 en PBS + 0.1% BSA. Incubación durante 30' en oscuridad a temperatura ambiente.
Klf4	Triton X-100 al 0.2% en PBS, 10' a temperatura ambiente.	PBS + 1% BSA + 10% suero de caballo, 30' a temperatura ambiente.	Anti-Klf4 (R&D) a concentración 1:100 en PBS + 1% BSA. Incubación o/n a 4°C.	Anti-IgG de cabra conjugado con biotina (Vector), a concentración 1:500 en PBS + 1% BSA. Incubación durante 1h en oscuridad a temperatura ambiente.	Avidina D conjugada con Texas Red (Vector), a concentración 1:500 en PBS + 1% BSA. Incubación durante 30' en oscuridad a temperatura ambiente.
Nanog	Triton X-100 al 0.2% en TBS, 15' a temperatura ambiente.	TBS + 20% suero de cabra, 30' a temperatura ambiente.	Anti-Nanog (Abcam) a concentración 1:100 en solución de bloqueo. Incubación o/n a 4°C.	Anti-IgG de conejo conjugado con biotina (Vector), a concentración 1:500 en solución de bloqueo. Incubación durante 1h en oscuridad a temperatura ambiente.	Avidina D conjugada con Texas Red (Vector), a concentración 1:500 en solución de bloqueo. Incubación durante 30' en oscuridad a temperatura ambiente.

Tabla 2. Listado de los procedimientos seguidos para cada una de las inmunofluorescencias realizadas.

Posteriormente, se añadió una gota de DAPI+Vectashield (Vector) con el fin de teñir los núcleos y de evitar la pérdida de fluorescencia. Finalmente, se montaron las preparaciones y se obtuvieron las imágenes en un microscopio Nikon Axiovert 200 a 40 y 60 aumentos, o bien mediante microscopía confocal en un microscopio Leica TCS-SPE. Las imágenes fueron finalmente analizadas con el programa ImageJ.

También se realizaron inmunofluorescencias frente a las sondas JC-1 (Life Technologies) y CellROX Green (Life Technologies). En el caso de la primera, se incubó el cultivo de PGCs en presencia de JC-1 disuelto en el medio a una concentración de 2 $\mu$ M para visualizar el estado de activación mitocondrial. La sonda JC-1 es capaz de marcar en verde las mitocondrias inactivas y en rojo, las activas. Tras una incubación de 30 minutos, el cultivo fue fijado en PFA al 4%, pH=7.4, durante 20 min a temperatura ambiente. Se añadió DAPI+Vectashield y el cultivo fue visualizado mediante microscopía confocal.

Por su parte, la sonda CellROX Green marca en verde las ROS. Esta inmunofluorescencia tuvo que ser realizada sin fijar. Para ello, se añadió la sonda al cultivo a una concentración 1:500 en DMEM y se mantuvo durante 30 minutos a 37°C. Durante ese tiempo, se preincubaron los anticuerpos anti-SSEA1 y anti-IgM de ratón conjugado con Texas Red a una concentración de 1:50 y 1:175 respectivamente, ambos diluidos en DMEM. Transcurrido el tiempo de incubación con la sonda, se añadió la mezcla de los anticuerpos preincubados y se dejó el cultivo durante 30 minutos adicionales a 37°C. Finalmente, se añadió DAPI+Vectashield y se procedió al montaje para visualizar las preparaciones al microscopio.

### **Citometría de flujo**

Para estudiar la función mitocondrial utilizamos de nuevo la sonda JC-1. Para contabilizar las mitocondrias inactivas, las PGCs fueron cultivadas sobre monocapas confluentes de células STO en pocillos de placas de 24. El medio de cultivo fue cambiado a diario durante 5 días, momento de la citometría. Para tal efecto, el medio de cultivo fue cambiado por DMEM, donde se disolvió la sonda a una concentración de 2 $\mu$ M. Se realizó una incubación de 30 minutos a 37°C, tras lo cual se retiró el DMEM y se añadió tripsina al 0.5%. Las placas se incubaron con 250  $\mu$ L tripsina durante 10 minutos a 37°C y acto seguido se añadieron 0.5mL de medio PGCs para neutralizar el efecto de la tripsina. A continuación, se dieron golpes de pipeta para disgregar las células y separarlas del fondo de la placa y dicha suspensión fue centrifugada a 400g durante 5 minutos a 4°C. Seguidamente, las células fueron resuspendidas y fijadas con paraformaldehído al 4% a pH=7.4 durante 20 minutos. Transcurrido ese tiempo, las células fueron centrifugadas una vez más en las condiciones descritas anteriormente para después ser incubadas con dos anticuerpos (preincubados a 37°C durante 30 minutos) con el fin de identificar las PGCs: mouse IgM anti-SSEA1 (R&D) y anti-mouse IgM conjugado con APC (eBioscience). Tras incubar las PGCs con los anticuerpos durante 30 minutos a concentración 1:100 para el primario y 1:200 para el secundario en PBS + 10% FBS, las células fueron centrifugadas una vez más en las condiciones descritas anteriormente y finalmente resuspendidas en PBS + 2% FBS + 5mM EDTA. Por último,

las células fueron pasadas por un citómetro BD FACSCalibur (Becton Dickinson) y analizada su fluorescencia para el canal verde y el rojo lejano a través del programa Cell Quest Pro (Becton Dickinson).

Posteriormente se quiso analizar la señal correspondiente tanto a mitocondrias inactivas como a mitocondrias activas. Con motivo de poder diferenciar bien entre la emisión fluorescente en verde y rojo por parte de la sonda en los estudios con factores solubles, se realizó una compensación de color utilizando en primer lugar células de la línea E14TG2a, de tamaño y complejidad relativamente similar a las PGCs, y finalmente con PGCs para afinar bien la compensación. Para ello, se siguió el mismo protocolo que el descrito anteriormente y fueron pasadas por el citómetro con el fin de discriminar bien entre las dos señales.

Además, se realizó una citometría más para detectar los niveles de expresión de GFP, bajo la influencia del promotor de Oct4. Para ello, se siguió el mismo procedimiento que para la citometría anterior, con la excepción de que las PGCs no fueron fijadas y la incubación con los anticuerpos se redujo a 20 minutos. Las señales analizadas fueron el rojo lejano para la detección de las PGCs con anti-SSEA1 y el verde para el GFP.

### **Cuerpos embrioides**

Para la obtención de cuerpos embrioides con la subsecuente diferenciación de las células reprogramadas en células de las tres hojas embrionarias se utilizaron dos estrategias: condiciones de adherencia y de baja adherencia. Las células reprogramadas fueron aisladas como se describió anteriormente y se sembraron en placas de 24 pocillos. A partir del día 3 de cultivo se observaron las placas a diario con el fin de detectar la presencia de cuerpos embrioides.

En el caso del cultivo en condiciones de adherencia, los cuerpos embrioides fueron extraídos del cultivo, transferidos a placas convencionales de 24 pocillos y mantenidos en medio de PGCs sin factores adicionales ni LIF para favorecer su diferenciación. Se monitorizó el cultivo a diario hasta que dejó de apreciarse crecimiento del cuerpo embrioide o hasta que se empezó a detectar necrosis. En dicho momento se procedió a la fijación con paraformaldehído al 4%,  $p=7.4$ , durante 20 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se realizaron inmunofluorescencias frente a cada una de las hojas germinales sobre los cuerpos embrioides fijados.

Para los cultivos sin adherencia, se transfirieron los cuerpos embrioides de forma análoga al procedimiento anterior, pero en este caso se usaron placas de 24 pocillos de baja adherencia (Corning). Se cultivaron de forma similar al párrafo anterior y cuando no se detectó más

crecimiento se extrajeron y fueron incluidos en OCT Tissue-Tek y almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, fueron seccionados en criocortes realizados en un criostato (Leica) y fijados en acetona fría a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos. Finalmente, se dejaron secar a temperatura ambiente. A la hora de utilizarlos, se aplicó un paso de rehidratación en agua destilada durante 10 minutos para proceder a la inmunofluorescencia. Seguidamente, se realizaron dos incubaciones de 8 minutos cada una en borohidrato de sodio (Sigma) a  $1\text{mg/mL}$  en PBS con el fin de reducir al mínimo la autofluorescencia.

Los anticuerpos elegidos fueron:

Anti-albúmina (Dako) para endodermo. Se realizó un bloqueo con TBS+5% suero de caballo durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se añadió el anticuerpo primario anti-albúmina a concentración 1:20 en TBS y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo secundario: o bien anti-IgG de conejo conjugado con fluoresceína a concentración 1:100 en TBS, o bien anti-IgG de conejo a concentración 1:500 en TBS para después añadir avidina D conjugada con Texas Red a concentración 1:500 en TBS. Finalmente, se añadió DAPI+Vectashield (Vector).

Anti-Vimentina (Dako) para mesodermo. Se realizó un bloqueo con TBS+1% BSA+5% suero de caballo durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se añadió el anticuerpo primario anti-vimentina diluido 1:20 en TBS+1% BSA y se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo secundario: o bien anti-IgG de ratón conjugado con Texas Red a concentración 1:100 en TBS+1% BSA o bien anti-IgG de ratón conjugado con fluoresceína a concentración 1:100 en TBS+1% BSA. Finalmente, se añadió DAPI+Vectashield.

Anti-citoqueratinas AE1/AE3 (Dako) para ectodermo. Se realizó un bloqueo con TBS+1% BSA+5% suero de caballo durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se añadió el anticuerpo primario anti-AE1/AE3 diluido 1:20 en TBS+1% BSA y se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo secundario: o bien anti-IgG de ratón conjugado con Texas Red a concentración 1:100 en TBS+1% BSA o bien anti-IgG de ratón conjugado con fluoresceína a concentración 1:100 en TBS+1% BSA. Finalmente, se añadió DAPI+Vectashield.

# *Resultados*

### La hipoxia conduce a un fenotipo pluripotente poco robusto

Como ya se ha mencionado anteriormente, las PGCs cultivadas en hipoxia son capaces de dar lugar a células pluripotentes denominadas hiEGLs. Dichas células proceden de la población con niveles bajos de Oct4 y forman colonias positivas para SSEA1, TNAP, Oct4 y Sox2. Estas colonias son capaces de dar lugar a las tres hojas embrionarias *in vitro* y de integrarse en mórulas y blastocistos *in vivo*, pero no poseen capacidad de autorrenovación ilimitada ni expresan Klf4 ni c-Myc (López-Iglesias, Alcaina et al., 2015).

El primer paso de este estudio fue caracterizar la expresión génica de las hiEGLs en lo que concierne a los genes relacionados con la pluripotencia. Para ello, nos basamos en la relación de genes mencionados en Durcova-Hills et al., 2008 (Fig. 3). Por otro lado, incluimos dos genes muy característicos de la identidad de línea germinal, en particular de las PGCs: *Dppa3* y *Blimp1*. Los resultados muestran una disminución en la expresión de *Blimp1* y *Dppa3*, sugiriendo que las hiEGLs pierden su identidad de PGCs como resultado de la reprogramación mediada por la hipoxia (Fig. 10A). Se consiguió validar satisfactoriamente *Sall4* del grupo de genes compartidos por PGCs y EGCs; y *Ecat1*, *Fthl17* y *Klf4* del grupo de genes que no se expresan en PGCs pero sí en EGCs, es decir, relacionados con la pluripotencia. A pesar de que se ha detectado mínima expresión, la gráfica puede inducir a error, ya que los datos se encuentran normalizados respecto a la normoxia (Fig. 10B). En cualquier caso, la poca expresión que pudiera haber se ve aún más reducida en condiciones de hipoxia, lo cual indica que las hiEGLs no alcanzan un estado plenamente pluripotente. En el caso de *Eras*, no se detectó la expresión del gen en ninguna de las dos condiciones (Fig. 10B). En resumen, los resultados apuntan a que las PGCs en hipoxia alteran el desarrollo normal correspondiente a su tipo celular y se reprograman, pero fracasan al expresar a niveles muy bajos genes presentes en tipos celulares plenamente pluripotentes.

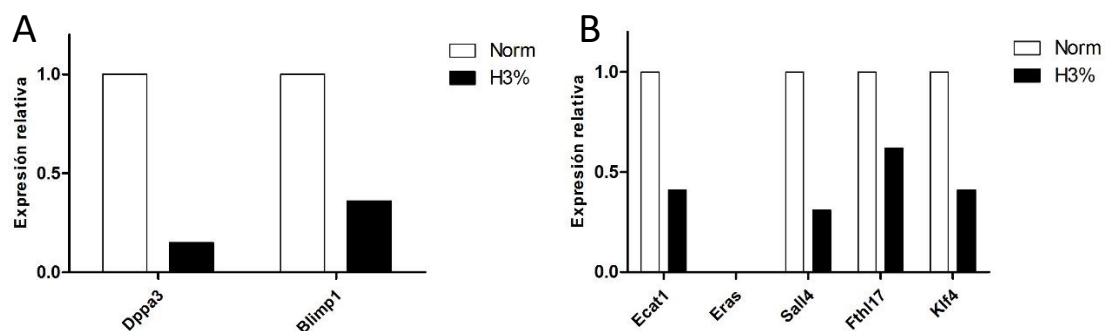


Figura 10. A: Expresión relativa de los genes *Dppa3* y *Blimp1*, en condiciones de normoxia e hipoxia al 3%. B: Expresión relativa de los genes *Ecat1*, *Eras*, *Sall4*, *Fthl17* y *Klf4*, en condiciones de normoxia y de hipoxia al 3%. Los datos se muestran normalizados con respecto a la normoxia.



Adicionalmente, se realizó un estudio de expresión de varios genes implicados en proliferación celular: *Trp53*, *Cdkn1a*, *Rb1*, *c-Jun*, *Dusp2* y *Perp*. *P53 (Trp53)* y *Rb1* mostraron un nivel de expresión similar en ambas condiciones. Se aprecia que *Trp53* no disminuye su expresión, lo cual representa un probable freno a una mayor proliferación. Al mismo tiempo, *Rb1*, un gen esencial en transición G1/S, también muestra una expresión equivalente en ambas condiciones experimentales. El resto de genes implicados en la progresión del ciclo celular mostraron una expresión más reducida en hipoxia a las 48h, en la fase temprana de la reprogramación de las PGCs (Fig. 11). En conjunto, y sumado a lo expuesto anteriormente, se deduce que las hiEGLs no alcanzan la capacidad de autorrenovación, probablemente debido a la baja expresión de estos genes entre otros.

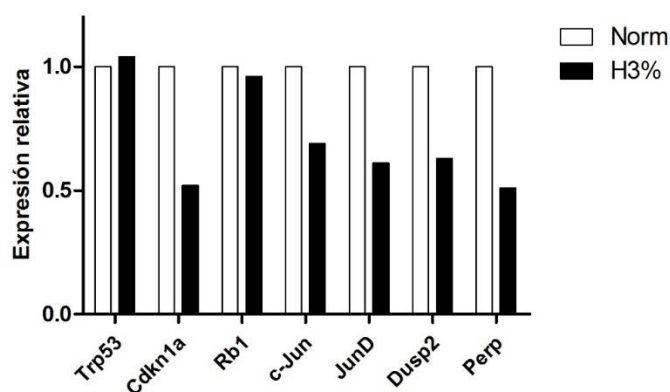


Figura 11. Cambio en la expresión relativa de *Trp53*, *Cdkn1a*, *Rb1*, *c-Jun*, *JunD*, *Dusp2* y *Perp* en condiciones de normoxia e hipoxia. Los datos se muestran normalizados con respecto a la normoxia.

### La reprogramación de PGCs implica una reprogramación metabólica

Tal y como se ha mostrado en estudios previos del laboratorio, las PGCs y las EGCs muestran variación en la expresión de genes relacionados con la glicolisis (López-Iglesias, Alcaina et al., 2015). Por este motivo, se realizaron una serie de experimentos encaminados a dilucidar si las PGCs sufren una reprogramación metabólica durante su reprogramación.

La primera aproximación fue el estudio de la inactivación mitocondrial mediante el uso de la sonda fluorescente JC-1, que emite fluorescencia en verde si la mitocondria se encuentra inactiva y en rojo si funciona correctamente (Fig. 12).

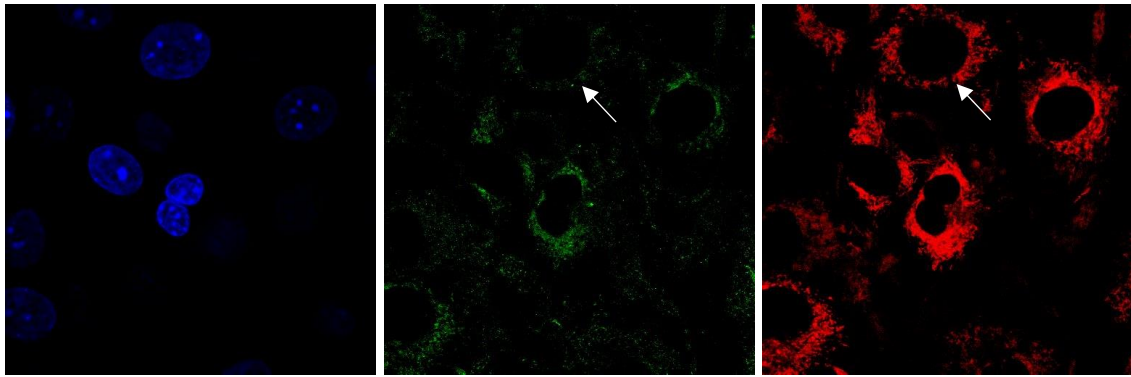


Figura 12. Imágenes de microscopía confocal correspondientes a la tinción de mitocondrias utilizando la sonda JC-1 en células STO. En azul, pueden visualizarse los núcleos de las células. En verde, las mitocondrias inactivas. En rojo, las mitocondrias activas. Como puede apreciarse, en algunas células hay emisión de señal tanto en verde como en rojo. Dichas células serán consideradas como dobles positivas que presentan mitocondrias activas e inactivas, interpretándose que poseen un metabolismo bivalente que no es ni completamente glicolítico ni completamente oxidativo. Las flechas señalan una célula STO que únicamente presenta mitocondrias activas.

Después, se procedió a realizar una citometría de flujo en condiciones de normoxia y de hipoxia con el fin de detectar una posible variación en el porcentaje de mitocondrias inactivas. La citometría mostró que en condiciones de hipoxia hay un aumento considerable en el porcentaje de PGCs con mitocondrias inactivas, emergiendo una importante población SSEA1<sup>+</sup> que no se apreció en normoxia, y que supuso un 10% del cultivo (Fig. 13).

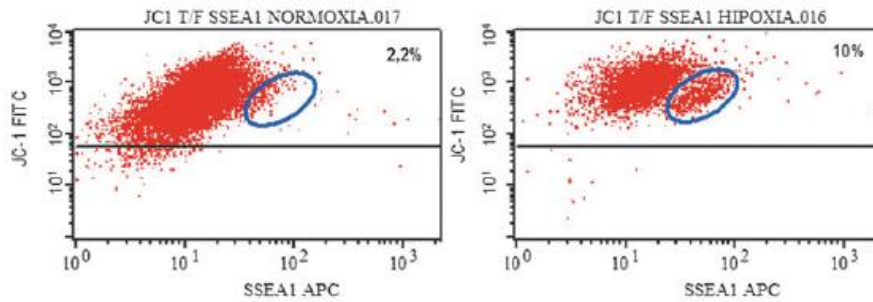


Figura 13. Datos de citometría de flujo frente a mitocondrias inactivas (JC-1 FITC) y SSEA1 para diferenciar las PGCs (círculo azul) de las células STO, en condiciones de normoxia (izquierda) e hipoxia (derecha) a 5 días de cultivo.

A la luz de los datos recogidos en la Fig. 13, se dedujo que en hipoxia tiene una mayor importancia el metabolismo glicolítico frente a la fosforilación oxidativa como era de esperar. Seguidamente, nos planteamos si este cambio metabólico podría ser un agente causal que promoviera la reprogramación de las PGCs y, por tanto, un mayor flujo glicolítico podría actuar como mimético de la hipoxia e inducir la reprogramación. Para ello, cultivamos las PGCs en presencia de DASA en normoxia e hipoxia. Este compuesto es un activador de la enzima piruvato kinasa M2, enzima limitante en glicolisis y cuya activación conduciría a una mayor obtención de piruvato a partir de PEP, lo cual desembocaría en una mayor velocidad del proceso glicolítico. Se realizó un conteo de PGCs y células reprogramadas (Fig. 14): el primero con el fin de descartar posibles efectos positivos o negativos de los compuestos sobre la supervivencia y proliferación de las PGCs que pudieran enmascarar los resultados en células reprogramadas, y el segundo para analizar la eficiencia de reprogramación.

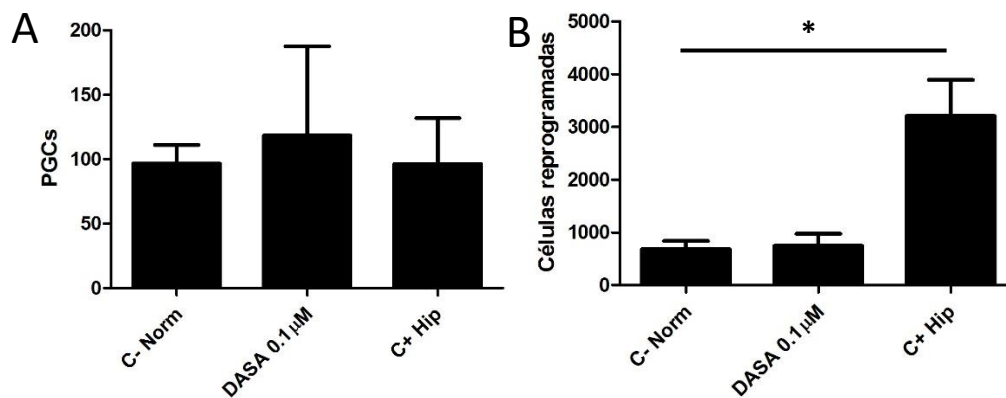


Figura 14. Número de PGCs (izquierda) y de células reprogramadas (derecha) en condiciones de normoxia, DASA en normoxia e hipoxia. El asterisco indica un valor  $p < 0.05$ .

Los resultados muestran en primer lugar que DASA no altera la supervivencia ni la proliferación de las PGCs, y en segundo, que el aumento del flujo glicolítico en condiciones de normoxia no es suficiente para inducir la reprogramación de PGCs (Fig. 14). Por lo tanto, se planteó la cuestión de si acelerar el flujo glicolítico en hipoxia podría conducir a un mayor número de células reprogramadas. El resultado mostró que el aumento del flujo glicolítico en un cultivo de PGCs en hipoxia favorece aún más la reprogramación (Fig. 15).

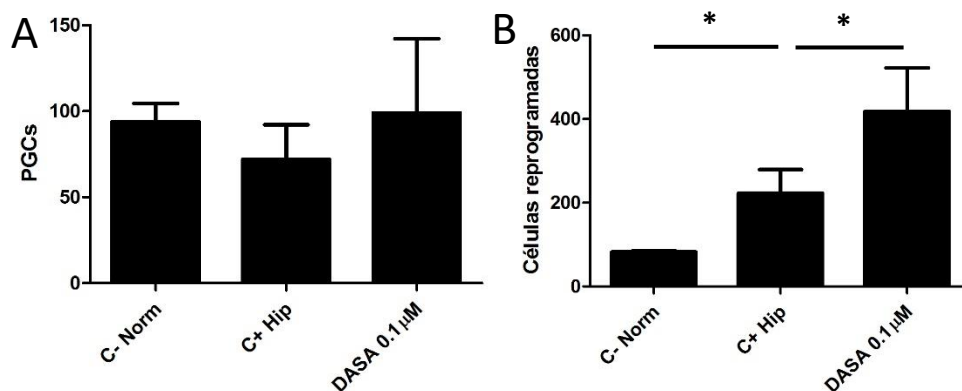


Figura 15. Número de PGCs (A) y de células reprogramadas (B) en condiciones de normoxia, hipoxia y DASA en hipoxia. Un asterisco indica un valor  $p < 0.05$ .

Dado que favorecer el flujo glicolítico en un contexto donde ya existe un mayor porcentaje de mitocondrias inactivas induce una elevación en el número de células reprogramadas, nos preguntamos si la inactivación de estos orgánulos podría desencadenar un efecto mimético de la hipoxia. Para ello, diseñamos una serie de experimentos en los cuales inactivamos las mitocondrias utilizando el desacoplador CCCP y la antimicina A, inhibidor de la transferencia de

electrones en el complejo III de la cadena respiratoria. De forma análoga a lo obtenido en los experimentos con DASA en normoxia, la inhibición de la fosforilación oxidativa no fue suficiente para alcanzar una reprogramación significativamente superior con respecto a la situación control de normoxia (Fig. 16). En el caso del CCCP, esto puede deberse a un efecto tóxico sobre las PGCs, como se aprecia en la gráfica A, no siendo así para la antimicina (C).

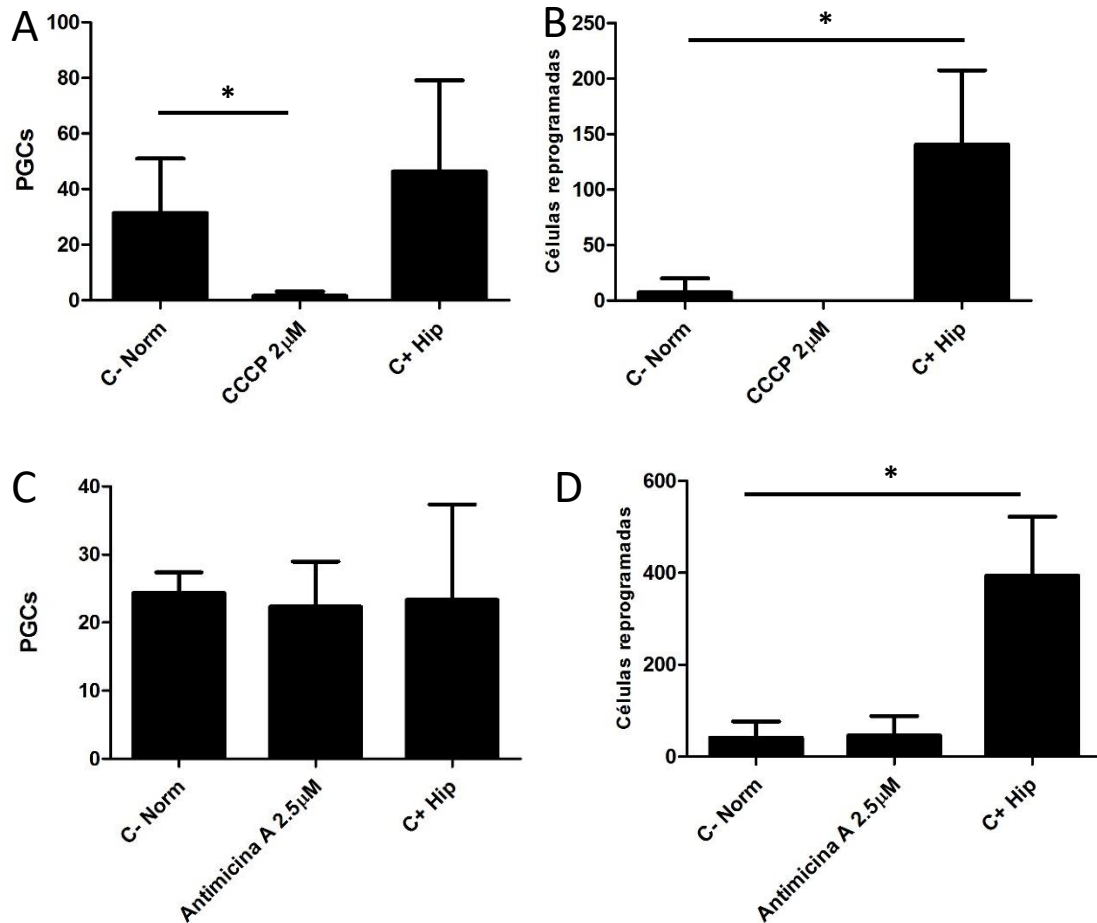


Figura 16. Número de PGCs en normoxia, normoxia en presencia de CCCP e hipoxia (A) y de células reprogramadas en las mismas condiciones (B). Número de PGCs en normoxia, normoxia en presencia de antimicina A e hipoxia (C) y de células reprogramadas en las mismas condiciones (D). Un asterisco indica un valor  $p < 0.05$ .

Con estos datos, se aprecia que la reprogramación producida por la hipoxia va acompañada de una reprogramación a nivel metabólico donde tiene lugar una importante inactivación mitocondrial. Si esta detención del metabolismo oxidativo inducida por la hipoxia se ve acompañada de un mayor flujo glicolítico, se obtiene una mayor eficiencia en la reprogramación. Por otro lado, si se intentan estas aproximaciones en condiciones de normoxia,

ni la activación glicolítica ni la inactivación mitocondrial consiguen disparar la reprogramación celular.

Por este motivo, se estudió el estado de activación de la piruvato deshidrogenasa, la enzima que hace de nexo entre la glicolisis y la fosforilación oxidativa, en normoxia e hipoxia. Como puede apreciarse en la Fig. 17, la enzima no está fosforilada en condiciones de normoxia en PGCs. Por lo tanto, está activa y cataliza la descarboxilación del piruvato y su conversión en acetil CoA, que se incorpora al ciclo de los ácidos tricarboxílicos como primer paso de la actividad mitocondrial que culminará con la fosforilación oxidativa. Por contra, las colonias crecidas en hipoxia presentan el estado fosforilado de la PDH (Fig. 17), lo cual implica que el paso de piruvato a acetil CoA está bloqueado y que el TCA está frenado.

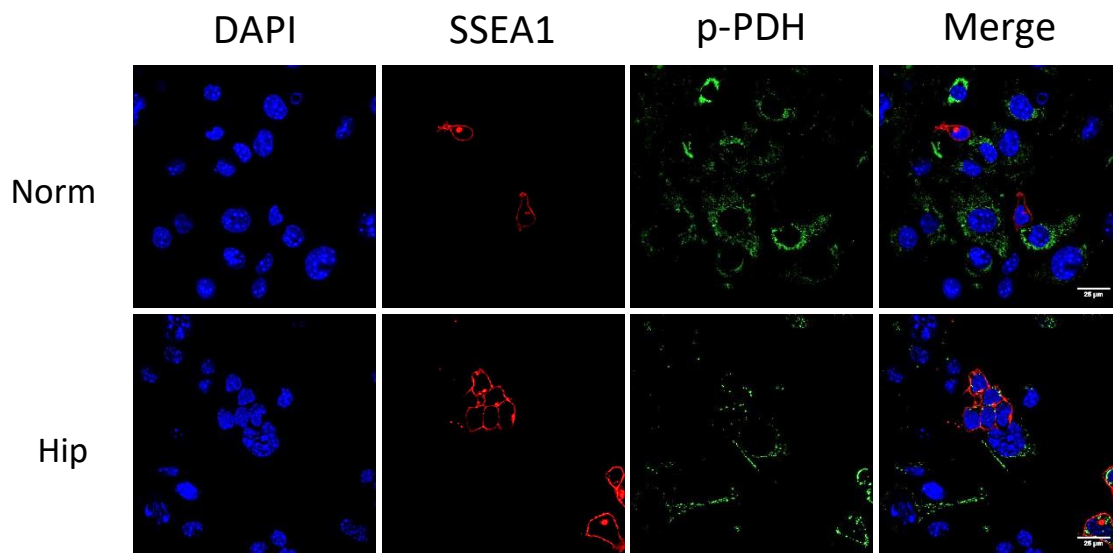


Figura 17. Inmunofluorescencia frente a la forma fosforilada de PDH (p-PDH) en condiciones de normoxia (norm) e hipoxia (hip). De izquierda a derecha: en azul, los núcleos teñidos con DAPI; en rojo las PGCs teñidas frente al antígeno de membrana SSEA1; en verde, la tinción frente a la forma fosforilada de PDH (p-PDH); a la derecha, la superposición de las imágenes anteriores. La barra de escala corresponde a 25 micras.

Como siguiente paso, se consideró si la inhibición de la fosforilación de la PDH por parte de la piruvato deshidrogenasa kinasa (PDK), y la consecuente derivación hacia un metabolismo oxidativo interrumpiría el proceso de reprogramación. De igual manera, al haber obtenido resultados en el sentido de que el metabolismo oxidativo era necesario en normoxia, se realizó el mismo experimento en condiciones de normoxia. Para realizar este experimento se utilizaron concentraciones decrecientes de dicloroacetato (DCA), un inhibidor de la PDK, con el fin de

detectar una concentración que no tuviera un efecto tóxico sobre las PGCs. Los resultados mostraron que la derivación hacia un metabolismo oxidativo no tiene un efecto significativo sobre la reprogramación de PGCs en condición de normoxia, mientras que bajo hipoxia sí tuvo lugar una disminución significativa sobre la reprogramación al utilizar una concentración de 500 $\mu$ M (Fig. 18A-B). Esta observación va en consonancia con la necesidad de un metabolismo glicolítico en hipoxia, donde el bloqueo de la actividad de la PDH es necesaria.

Sin embargo, al utilizar una dosis de DCA un orden de magnitud inferior sí se apreció un aumento significativo en la reprogramación de las PGCs (Fig. 18C-D). En resumen, el DCA provoca un desplazamiento hacia el metabolismo oxidativo que inhibe la reprogramación de las PGCs inducida por la hipoxia. Sin embargo, una disminución en la concentración de DCA induce la reprogramación de las PGCs en normoxia.

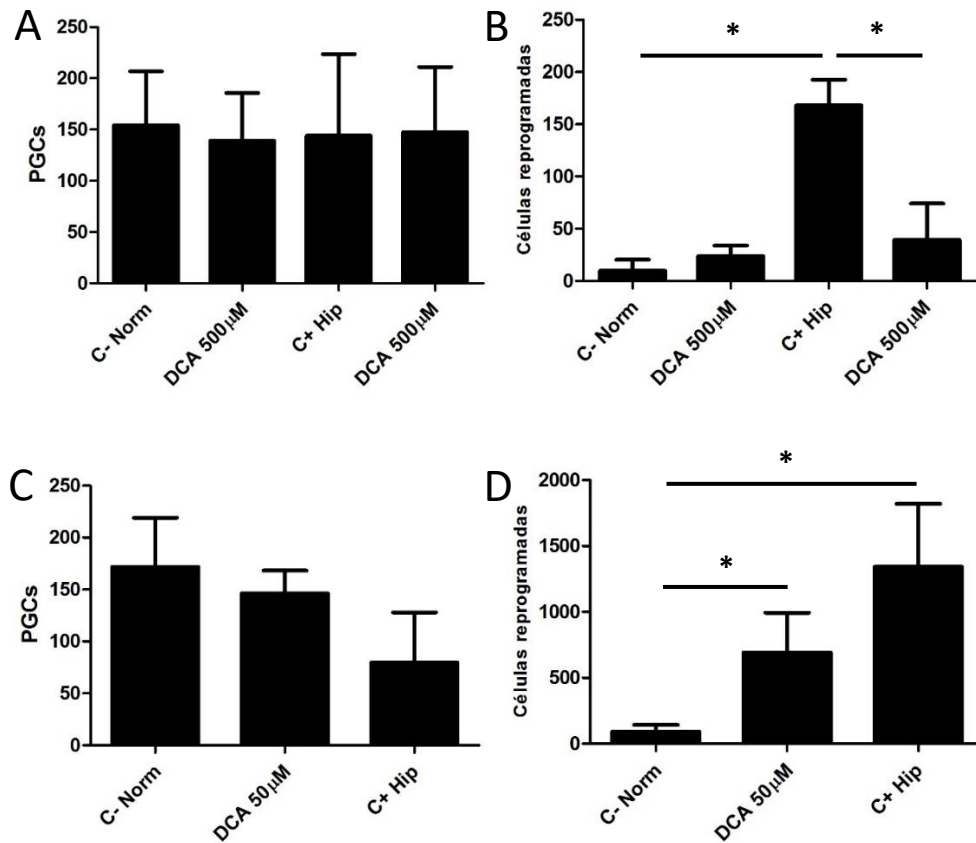


Figura 18. Número de PGCs y células reprogramadas en condiciones de normoxia, dicloroacetato en normoxia, hipoxia y dicloroacetato en hipoxia utilizando una concentración de dicloroacetato de 500 $\mu$ M (A, B). Número de PGC y células reprogramadas en condiciones de normoxia, hipoxia y dicloroacetato en normoxia a una concentración de 50 $\mu$ M (C, D). Un asterisco representa un valor  $p < 0.05$ .

Dado que el DCA desvía el metabolismo hacia OXPHOS, quisimos analizar el estado metabólico de las PGCs reprogramadas por la presencia de p-PDH. Los resultados muestran que el DCA, a una concentración de 50µM, no impide la predominancia del metabolismo glicolítico, ni en normoxia ni en hipoxia. En ambas condiciones, se detectó la presencia de p-PDH a pesar de la adición de DCA al medio de cultivo (Fig. 19). Por lo tanto, el DCA a la concentración utilizada no altera el perfil glicolítico de las PGCs e induce su reprogramación mediante otro mecanismo.

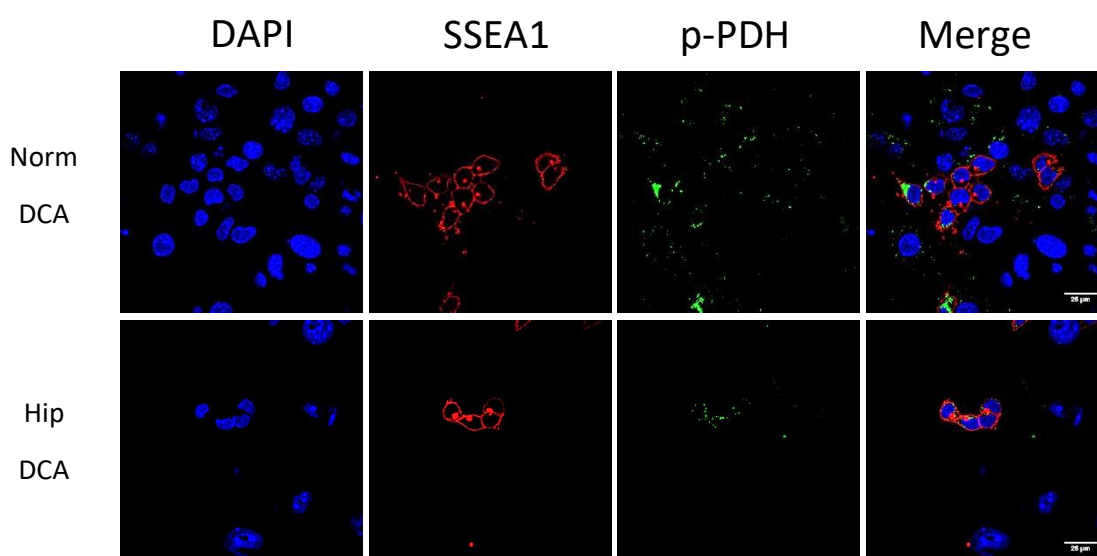


Figura 19. Inmunofluorescencia frente a la forma fosforilada de PDH (p-PDH) en condiciones de normoxia e hipoxia en presencia de DCA (norm+DCA e hip+DCA respectivamente). De izquierda a derecha: en azul, los núcleos teñidos con DAPI; en rojo las PGCs teñidas frente al antígeno de membrana SSEA1; en verde, la tinción frente la forma fosforilada de PDH (p-PDH); a la derecha, la superposición de las imágenes anteriores. La barra de escala corresponde a 25 micras.

Para ahondar en el mecanismo de la reprogramación metabólica que tiene lugar en las PGCs en hipoxia, decidimos estudiar la expresión de un regulador maestro del metabolismo, PPAR $\gamma$ , implicado en la homeostasis de glucosa. PPAR $\gamma$  puede incrementar la captación de glucosa por parte de la célula induciendo el aumento de GLUT4 en membrana, además de incrementar la expresión de las enzimas glucoquinasa y piruvato deshidrogenasa kinaasa 4 (El Akoum, 2014). La expresión de PPAR $\gamma$  mostró un aumento en condiciones de hipoxia (Fig. 20), lo cual abunda en la idea de que existe una reprogramación metabólica en hipoxia.



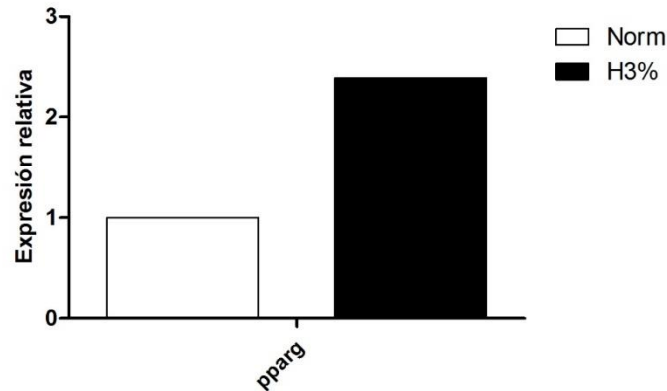


Figura 20. Expresión de *PPARγ* en condiciones de normoxia e hipoxia al 3% por RT-qPCR. Los datos se muestran normalizados frente a la normoxia.

Debido a las razones expuestas anteriormente, se utilizó un agonista de *PPARγ*, el ciglitazone, en cultivo. Con este experimento se pretendía conseguir la reprogramación celular potenciando la actividad de dicha molécula en normoxia, esperando mimetizar el efecto de la hipoxia. Sin embargo, la activación de *PPARγ* no fue suficiente para inducir la reprogramación de las PGCs en normoxia ni tampoco consiguió potenciar la reprogramación en hipoxia (Fig. 21A-B). Por lo tanto, la activación de *PPARγ* no es suficiente para inducir la reprogramación metabólica y, en último término, la reprogramación celular de las PGCs cultivadas en hipoxia. Además, su activación tampoco potencia la reprogramación en condiciones de hipoxia, sugiriendo que el aumento de la expresión de *PPARγ* en hipoxia (Fig. 21C-D) por si misma ya consigue el efecto necesario para la reprogramación celular.

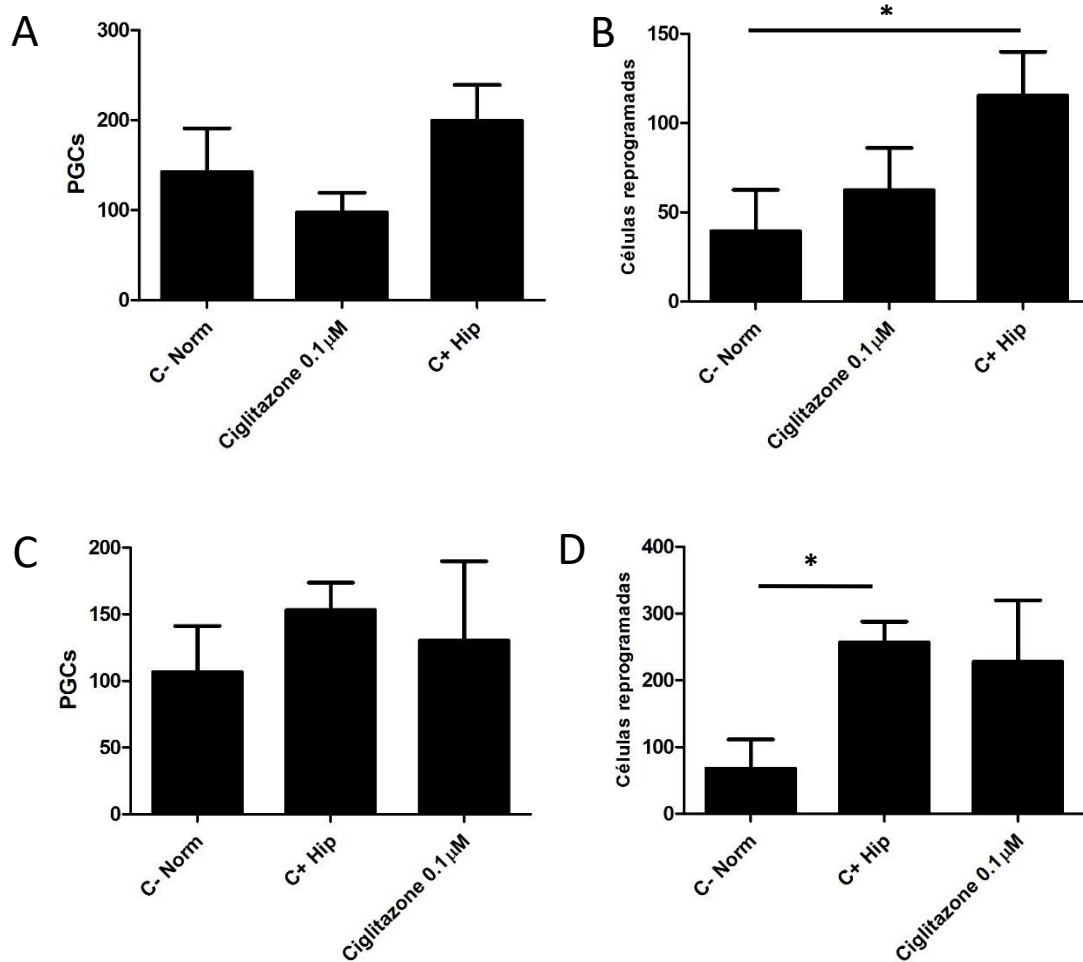


Figura 21. Número de PGCs y células reprogramadas en normoxia, normoxia en presencia de ciglitazone e hipoxia (A, B). No se observa reprogramación por el ciglitazone. Número de PGCs y células reprogramadas en normoxia, hipoxia e hipoxia en presencia de ciglitazone (C, D). No se observa efecto aditivo con la hipoxia. Un asterisco representa un valor  $p < 0.05$ .

### HIF1 es necesario para la reprogramación de PGCs

Dado que las PGCs pueden llegar a mantener la expresión de HIF1 $\alpha$  durante 7 días (López-Iglesias, Alcaina et al., 2015), se procedió a investigar si la inhibición de la acción de HIF utilizando mitramicina y 2-metoxiestradiol, previene la reprogramación inducida por la hipoxia. De esta manera, si HIF es necesario para la reprogramación, el cultivo en presencia de estos compuestos debería interrumpir el proceso. Ambos inhibidores ejercieron un efecto tóxico sobre las PGCs, y al disminuir la concentración no se obtuvo efecto sobre la reprogramación, sugiriendo que actividad HIF es esencial tanto para la supervivencia como para la reprogramación de las PGCs (Fig. 22). Por este motivo, vemos una ausencia de efecto si la concentración es baja, pero si ésta es aumentada y el factor ejerce su efecto, las PGCs ni siquiera sobreviven, enmascarando el posible efecto sobre la reprogramación.

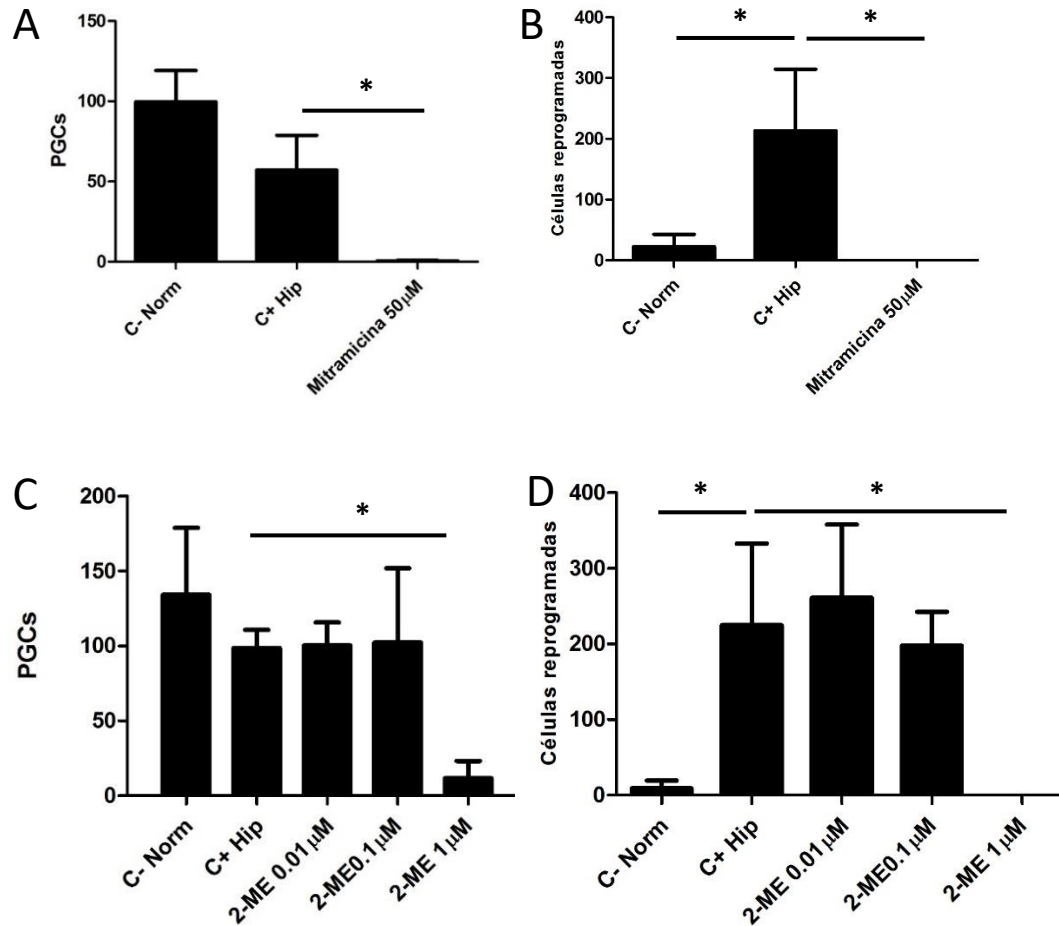


Figura 22. Número de PGCs y células reprogramadas en normoxia, hipoxia e hipoxia en presencia de mitramicina (A, B) y 2-metoxiestradiol (2-ME) a diferentes concentraciones (C, D). Un asterisco representa un valor  $p < 0.05$ .

Debido a que las células que se reprograman son aquellas con bajos niveles de Oct4 y que el perfil de citometría bajo condiciones de hipoxia muestra una mayor heterogeneidad en la expresión (López-Iglesias, Alcaina et al., 2015), se procedió a alterar la función de HIF para estudiar si ello conducía a una alteración en los niveles de Oct4. Para ello, se utilizó DMOG en normoxia con el fin de estabilizar HIF, y mitramicina en hipoxia para inhibir su función. Como resultado, se vio que la estabilización de HIF en normoxia asemejó el perfil de Oct4 al observado en hipoxia, mientras que la inhibición de HIF en hipoxia asimiló el patrón de Oct4 obtenido en normoxia (Fig. 23).

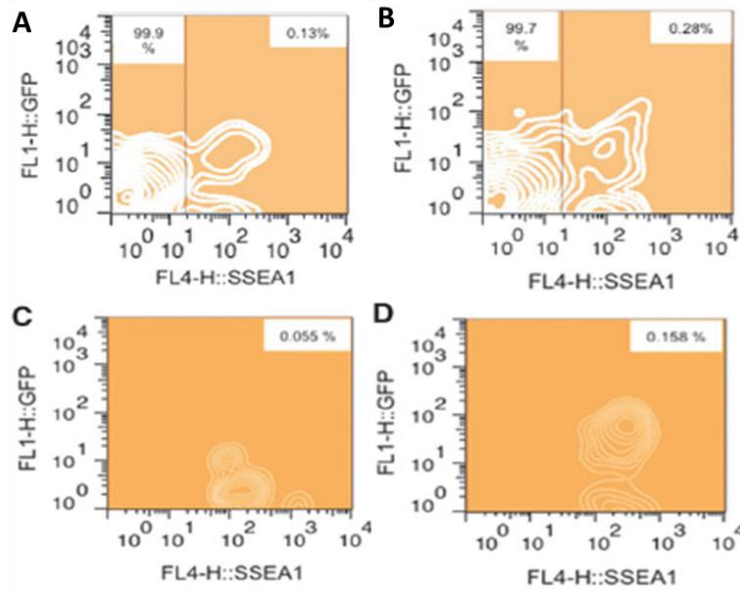


Figura 23. Representaciones de densidad de citometría de flujo frente a SSEA1 y GFP (Oct4) en normoxia (A), hipoxia (B), hipoxia+mitramicina (C) y normoxia+DMOG (D). En (A) y (B) se muestra el cultivo en su totalidad, STO+PGCs, donde ambos tipos celulares se separan en base a la proteína de membrana SSEA1. Los porcentajes en la esquina superior izquierda de (A) y (B) representan el porcentaje del cultivo correspondiente a las células STO, mientras que los de la esquina superior derecha corresponden a las PGCs. En (C) y (D) sólo se muestran las PGCs. Como se aprecia en (A) y (C), la población de PGCs muestra un rango más estrecho en los niveles de GFP, mientras que son más dispares en (B) y (D), mostrando una mayor heterogeneidad.

Seguidamente nos planteamos si HIF2 $\alpha$  tendría importancia en la reprogramación de PGCs, ya que los niveles de Oct4 parecen ser importantes y HIF2 $\alpha$  regula la expresión de Oct4 (Covello et al., 2006). Los experimentos de inmunofluorescencia para detectar HIF2 $\alpha$  mostraron que este factor de transcripción se encuentra en el núcleo de PGCs aisladas y también de las colonias que surgen en hipoxia tras 48 horas de cultivo (Fig. 24). De estos resultados se deduce que ya que HIF2 $\alpha$  no muestra diferencias tras 48h de cultivo entre ambas condiciones experimentales su posible implicación podría ser la inducción de la expresión constitutiva de Oct4, dejando a HIF1 $\alpha$  el papel reprogramador, ya que HIF1 $\alpha$  ve inducida su expresión únicamente en hipoxia.

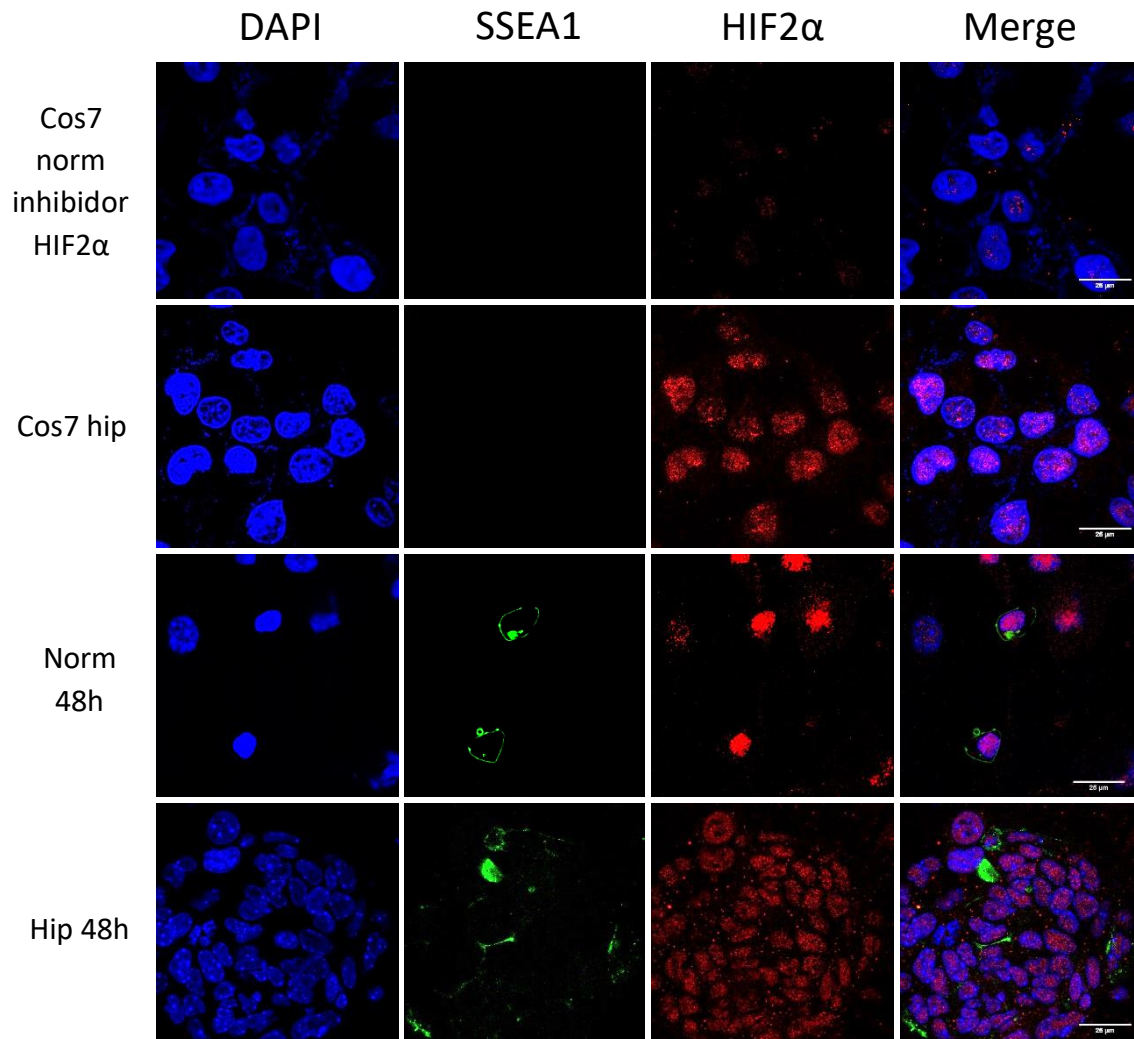


Figura 24. Imágenes de inmunofluorescencia frente a HIF2 $\alpha$  obtenidas mediante microscopía confocal. Como controles se utilizaron células de la línea Cos7, cultivadas en normoxia en presencia de un inhibidor de la traducción de HIF2 $\alpha$  (control negativo) y en hipoxia (control positivo). Se muestran también imágenes de PGCs aisladas en normoxia y colonias de PGCs reprogramadas en hipoxia tras 48 horas de cultivo. Las barras de escalas corresponden a 25 $\mu$ m.

### **Gsk3 $\beta$ interviene en la proliferación de las PGCs reprogramadas**

La ruta canónica de Wnt, gobernada por eje Wnt/Gsk3 $\beta$ / $\beta$ -catenina, es muy importante tanto en el desarrollo embrionario como en el proceso de reprogramación. Además, Gsk3 $\beta$ , implicada en gran variedad de rutas de señalización tales como la síntesis de glucógeno o la gluconeogénesis, es inhibida junto con las MAP kinasas en el cóctel denominado 2i+LIF en las fases finales de la inducción de pluripotencialidad para alcanzar una mayor robustez en el estado pluripotente y generar iPSCs de mayor calidad. Se decidió estudiar la expresión de *Gsk3 $\beta$*  y  $\beta$ -

*catenina* para averiguar si la ruta canónica de Wnt desempeña algún papel en la reprogramación de PGCs. Los resultados mostraron una leve variación al alza en la expresión de  $\beta$ -*catenina* y de *Gsk3 $\beta$* , algo mayor en el caso de esta última (Fig. 25).

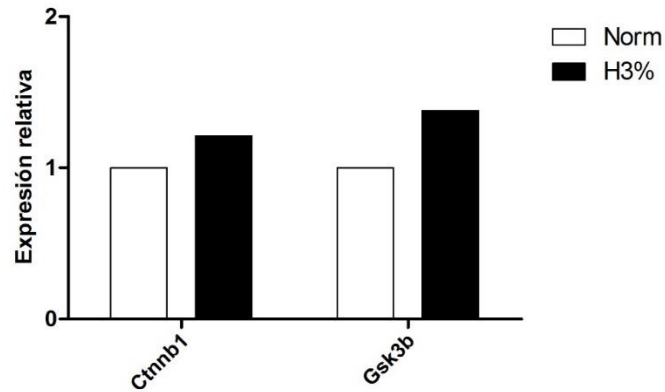


Figura 25. Expresión relativa de *Ctnnb1* ( $\beta$ -catenina) y *Gsk3b* en condiciones de normoxia e hipoxia. Los datos se muestran normalizados con respecto a la normoxia.

Teniendo en cuenta lo aventurado de poder extraer conclusiones a partir de cambios tan sutiles en la expresión en una ruta tan gobernada por modificaciones post-transcripcionales y post-traduccionales, se decidió inhibir *Gsk3 $\beta$*  mediante el compuesto CHIR99021, ya que las PGCs reprogramadas por la hipoxia no tienen capacidad de autorrenovación y a que la hipoxia induce este leve aumento en la expresión de *Gsk3 $\beta$* . Como resultado se obtuvo que el cultivo en hipoxia en presencia de CHIR tiene un efecto de sinergia con la hipoxia, obteniéndose un mayor número de células reprogramadas (Fig. 26), lo que sugiere que *Gsk3 $\beta$*  está implicada en el proceso de reprogramación de las PGCs.

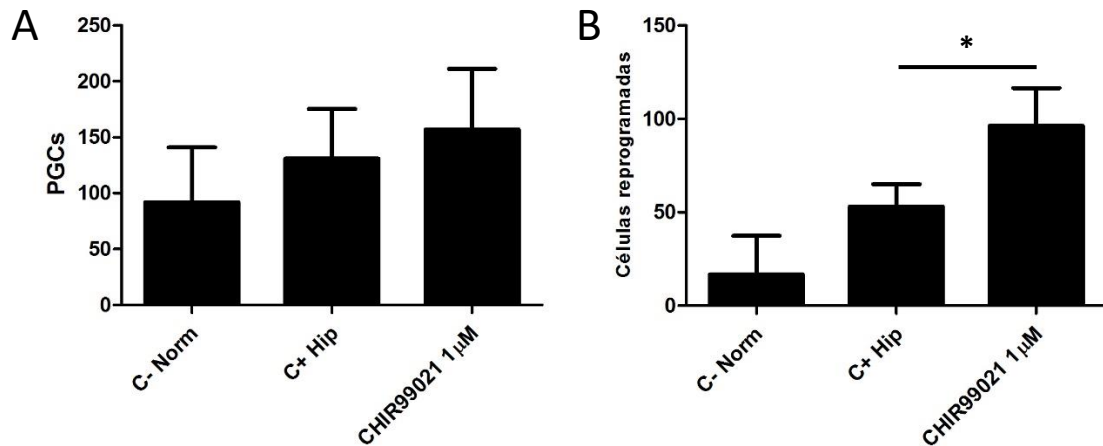


Figura 26. Número de PGCs (A) y células reprogramadas (B) en condiciones de normoxia, hipoxia e hipoxia en presencia de CHIR99021. Un asterisco representa un valor  $p < 0.05$ .

### Akt podría intervenir en el proceso de reprogramación celular

Las PGCs de ratones  $PTEN^{-/-}$ , que presentan una activación constitutiva de la ruta Akt, tienen potenciadas sus capacidades de generar EGs y teratoma testicular (Kimura et al, 2003). Además, la activación de la ruta Akt aumenta la capacidad de proliferación de las PGCs (De Miguel et al, 2002; Moe-Behrens et al, 2003). Por estas razones, se utilizó el compuesto SC79, capaz de activar la ruta Akt. Como resultado, se obtuvo una tendencia de sinergia con la hipoxia, con un mayor número de células reprogramadas (Fig. 27). Hasta la fecha, se han realizado 7 experimentos en los que se han cultivado PGCs en hipoxia en presencia de SC79, y en todos ellos se ha observado una tendencia al alza evidente en cuanto al número de células reprogramadas, a pesar de no haber conseguido una significación por las elevadas desviaciones estándar obtenidas.

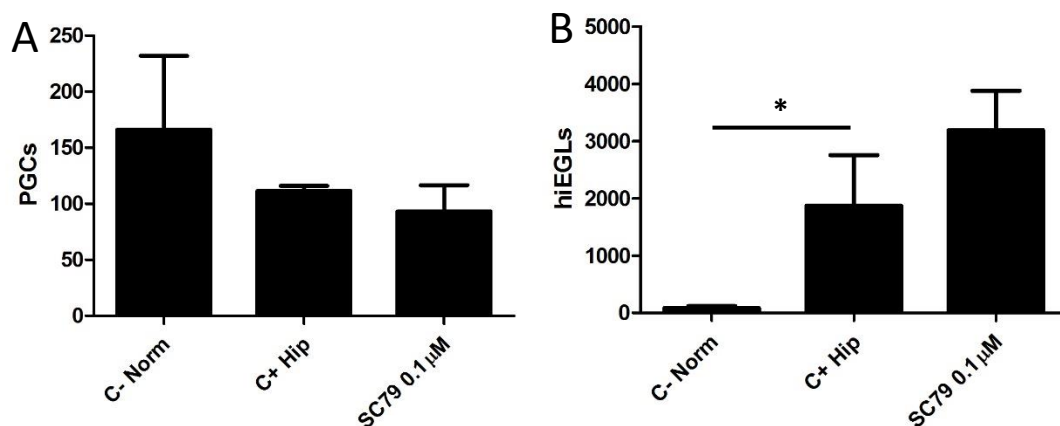


Figura 27. Número de PGCs (izquierda) y células reprogramadas (derecha) en condiciones de normoxia, hipoxia e hipoxia en presencia de SC79. Un asterisco representa un valor  $p < 0.05$ .

### La autofagia es necesaria para la reprogramación de PGCs

Como ya se ha mencionado en la introducción, la autofagia es un proceso que se ve favorecido en condiciones de hipoxia y que, además, interviene en los primeros momentos de la inducción de iPSCs. Estas razones, unidas a la reprogramación metabólica que tiene lugar durante la reprogramación de PGCs, nos hicieron preguntarnos si la autofagia, y en particular la mitofagia, tendrían un papel en dicho proceso. Para tal efecto, se realizó un estudio comparativo de la expresión de *Bnip3*, que además de estar implicado en autofagia en general tiene un importante papel en mitofagia y además es una diana de HIF1 $\alpha$ . Se consideró de especial relevancia el estudio de este gen por unir los procesos de autofagia, mitofagia y por tanto reprogramación metabólica, y señalización por hipoxia. Los resultados mostraron un aumento de la expresión de este gen de casi 15 veces en hipoxia respecto a la normoxia (Fig. 28).

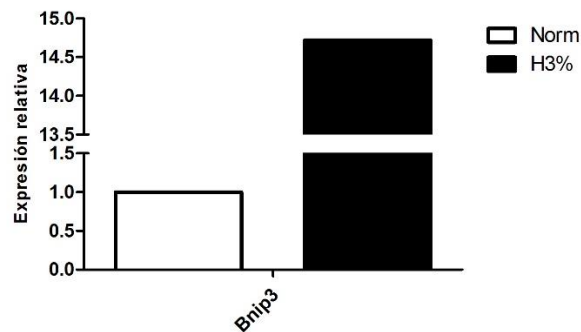


Figura 28. Expresión relativa del gen *Bnip3* realizado por PCR cuantitativa a partir de PGCs cultivadas en normoxia e hipoxia al 3%. Los resultados se muestran normalizados frente a la condición de normoxia.

Para comprobar si la autofagia tiene un papel en la reprogramación de PGCs se utilizó un inhibidor de la misma, la cloroquina. Los resultados confirmaron que la reprogramación por hipoxia es inhibida al impedir la autofagia (Fig. 29). Por lo tanto, la autofagia es un proceso necesario para la reprogramación de PGCs por la hipoxia.



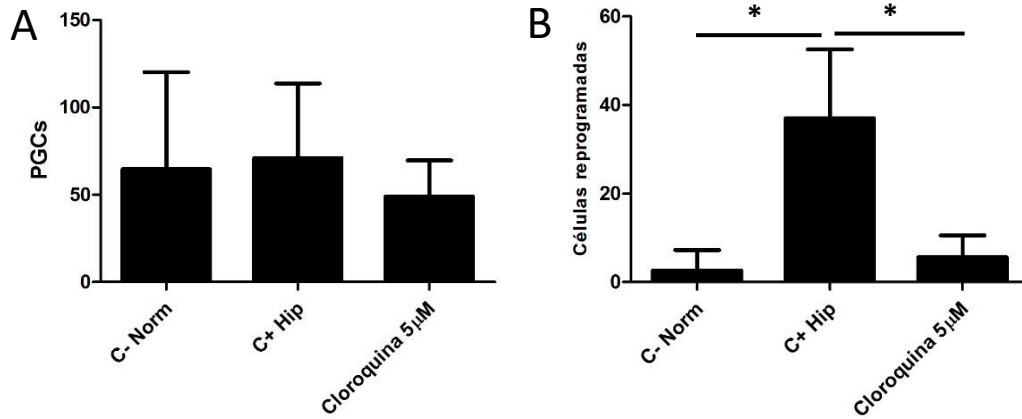


Figura 29. Número de PGCs (A) y células reprogramadas (B) en condiciones de normoxia, hipoxia e hipoxia en presencia de cloroquina. Un asterisco representa un valor  $p < 0.05$ .

Siguiendo con la hipótesis, nos planteamos interferir en la mitofagia para dilucidar si este es un proceso que tiene lugar durante la reprogramación. Para tal fin, actuamos sobre la fisión mitocondrial, ya que en ocasiones la división mitocondrial puede ser necesaria para disminuir el tamaño del orgánulo y que pueda ser fagocitado. Se cultivaron PGCs en presencia de mdivi-1, un inhibidor de la proteína Drp1, de gran importancia en la fisión mitocondrial. Tal y como se puede apreciar en la Fig. 30, la fisión mitocondrial no interviene en la reprogramación, con lo que se dedujo que probablemente las mitocondrias ya sean lo suficientemente pequeñas y no requieran de la fisión para ser autofagocitadas.

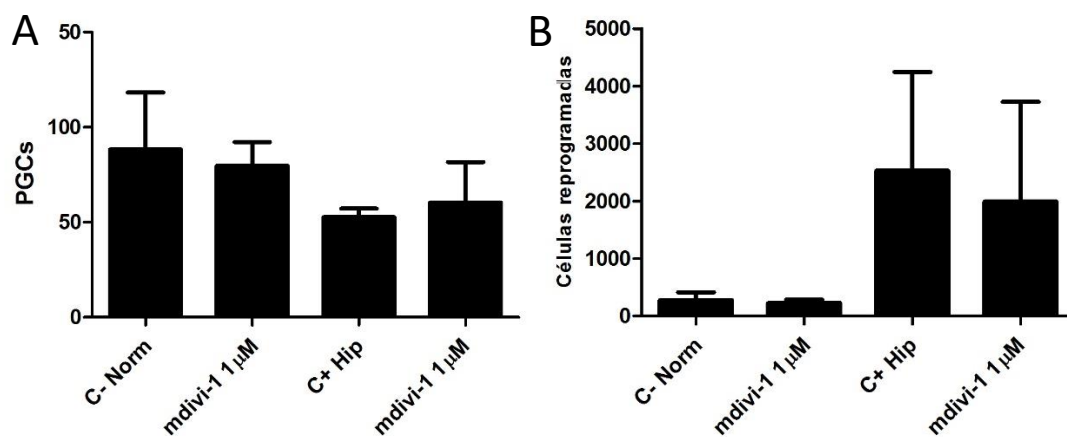


Figura 30. Número de PGCs (A) y células reprogramadas (B) en condiciones de normoxia, normoxia en presencia de mdivi-1, hipoxia e hipoxia en presencia de mdivi-1.

Como siguiente paso, se planteó si la inducción de la autofagia en general en PGCs cultivadas en normoxia podría ser suficiente para inducir la reprogramación de las mismas. Para ello se cultivaron PGCs primero en presencia de espermidina, un activador de la autofagia que opera inhibiendo la acetiltransferasa EP300 (Pietrocola et al, 2015). El resultado obtenido fue que la espermidina no fue suficiente para conseguir la reprogramación celular (Fig. 31A-B). Sin embargo, al cultivarlas en presencia de resveratrol, que induce la autofagia mediante la activación de Sirt1 (Morselli et al, 2011), sí que se observó una reprogramación significativamente superior (Fig. 31C-D). Por lo tanto, se deduce que la autofagia a través de Sirt1 es suficiente para inducir la reprogramación de PGCs incluso en condiciones de normoxia.

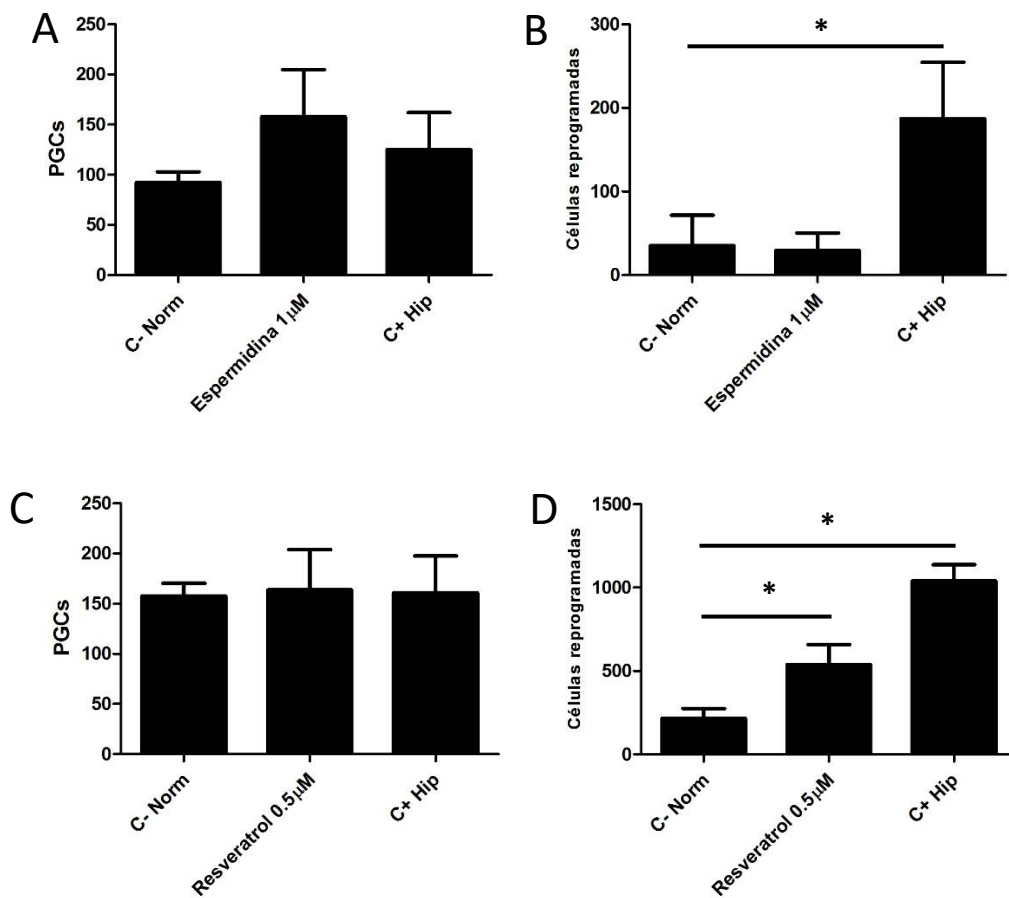


Figura 31. Número de PGCs (A) y células reprogramadas (B) en condición de normoxia, normoxia en presencia de espermidina e hipoxia. Número de PGCs (C) y células reprogramadas (D) en

condición de normoxia, normoxia en presencia de resveratrol e hipoxia. Un asterisco representa un valor  $p < 0.05$ .

### **Las especies reactivas de oxígeno disminuyen en hipoxia pero su eliminación no induce la reprogramación**

Debido a las propiedades antioxidantes del resveratrol además de la inducción de la autofagia, se quiso estudiar si las especies reactivas de oxígeno (ROS) podrían tener un papel en la reprogramación y dilucidar así si el mecanismo por el que el resveratrol induce la reprogramación es únicamente la autofagia.

Para ello, en primer lugar, se obtuvieron imágenes de fluorescencia utilizando una sonda que reaccionó ante los ROS en condiciones de normoxia e hipoxia. Como se muestra en la Fig. 32, los ROS no están presentes en PGCs en hipoxia, mientras que sí aparecen en normoxia.

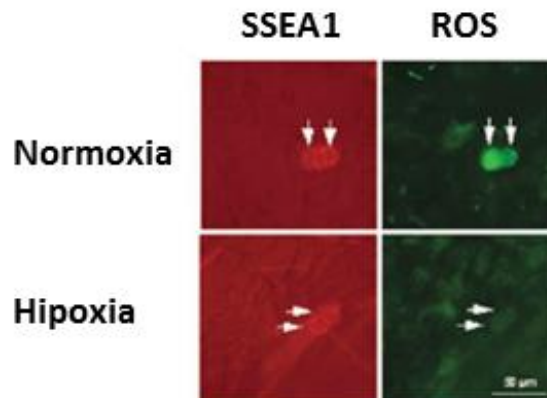


Figura 32. Inmunofluorescencia frente a especies reactivas de oxígeno (en verde) en condiciones de normoxia e hipoxia. La detección de PGCs se realizó mediante el marcaje con Texas Red frente a SSEA1. La barra de escala corresponde a  $50\mu\text{m}$ .

Seguidamente se analizó si la eliminación de las ROS del medio era suficiente como para reprogramar las PGCs y si su uso en hipoxia mejoraba la reprogramación. Para ello, se realizaron cultivos en presencia de ácido ascórbico, que cede electrones a las ROS y las reduce, anulando su alta capacidad oxidante. Los resultados mostraron que la ausencia de especies reactivas de oxígeno no es un agente causal que dispare la reprogramación de PGCs ni contribuye a aumentar la reprogramación en condiciones de hipoxia (Fig. 33).

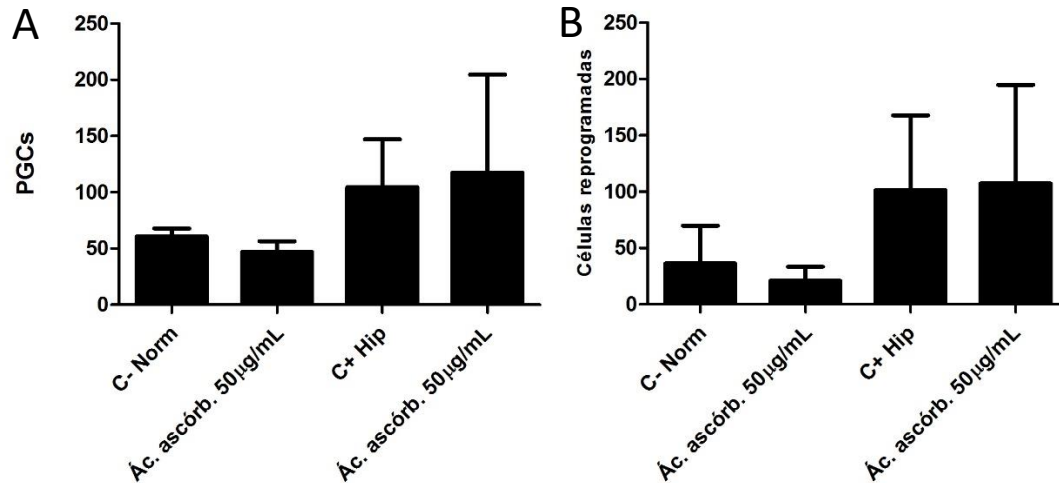


Figura 33. Número de PGCs (A) y células reprogramadas (B) en condiciones de normoxia, normoxia en presencia de ácido ascórbico, hipoxia e hipoxia en presencia de ácido ascórbico.

#### La señalización por PKCs no clásicas interviene en la reprogramación de PGCs

Paralelamente se estudió la posible implicación de la señalización por calcio en la reprogramación de PGCs. La razón fue que uno de los primeros sucesos que tienen lugar tras la fertilización, y que por tanto conducen a la reprogramación fisiológica de las células germinales, es una alteración en los niveles de calcio. Como primera aproximación para detectar una posible implicación del calcio, alteramos los niveles intracelulares de calcio. Para ello, se utilizó el quelante intracelular de calcio BAPTA-AM para disminuir dichos niveles, y no se apreciaron efectos sobre la reprogramación de las PGCs, ni en normoxia ni en hipoxia (Fig. 34A-B). También se intentó el efecto contrario de aumentar el calcio intracelular. Para ello, se inhibió la bomba que introduce calcio en el retículo endoplásmico retirándolo del citoplasma utilizando la tapsigargina. Como se aprecia en la Fig. 34C-D, en este experimento se apreció un efecto tóxico sobre las PGCs que impidió sacar conclusiones sobre la reprogramación.

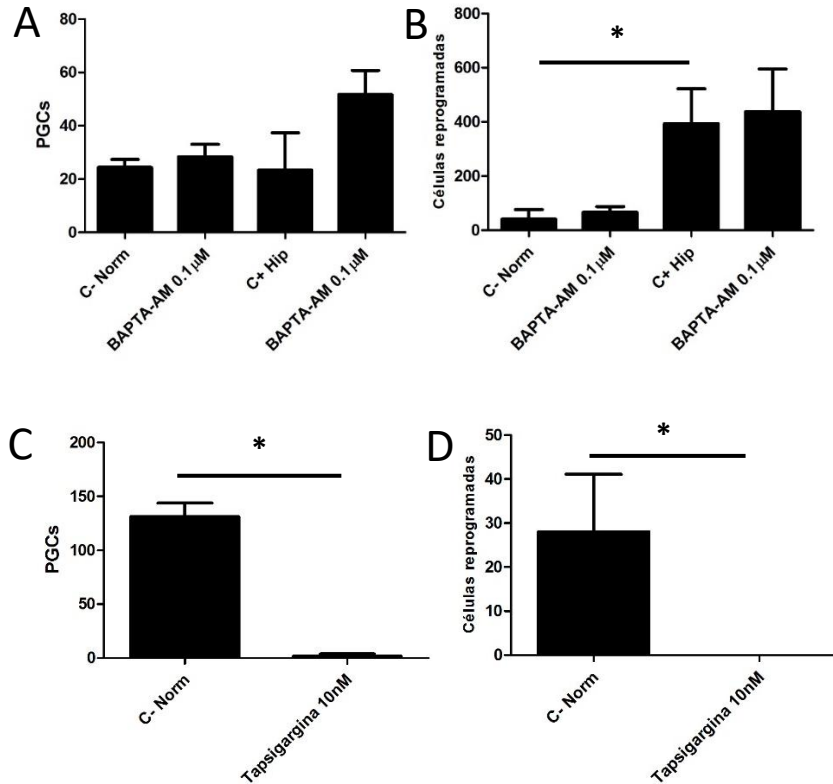


Figura 34. Número de PGCs (A) y de células reprogramadas (B) en condiciones de normoxia, normoxia en presencia del quelante intracelular de calcio BAPTA-AM, hipoxia e hipoxia en presencia de BAPTA-AM. Número de PGCs (C) y células reprogramadas (D) en condiciones de normoxia y normoxia en presencia de tapsigargina, inhibidor de la bomba de calcio que introduce dicho ion desde el citoplasma al retículo endoplásmico. Un asterisco representa un valor  $p < 0.05$ .

Sin embargo, dado que muchos tipos celulares son extremadamente sensibles a los niveles de calcio y que las PGCs entran en apoptosis con mucha facilidad, decidimos estudiar el posible papel del calcio fijándonos en su cascada de señalización y así evitar posibles efectos de toxicidad. Dos de los principales transductores de señales mediadas por el calcio son la familia de las proteínas kinasa tipo C (PKCs) y las kinasas y fosfatasa dependientes de calcio, como la kinasa dependiente de  $Ca^{2+}$ /Calmodulina y la calcineurina. Centrándonos en las PKCs, se utilizó la estaurosporina, un inhibidor de esta familia de proteínas, y obtuvimos reprogramación en presencia del inhibidor en normoxia (Fig. 35).

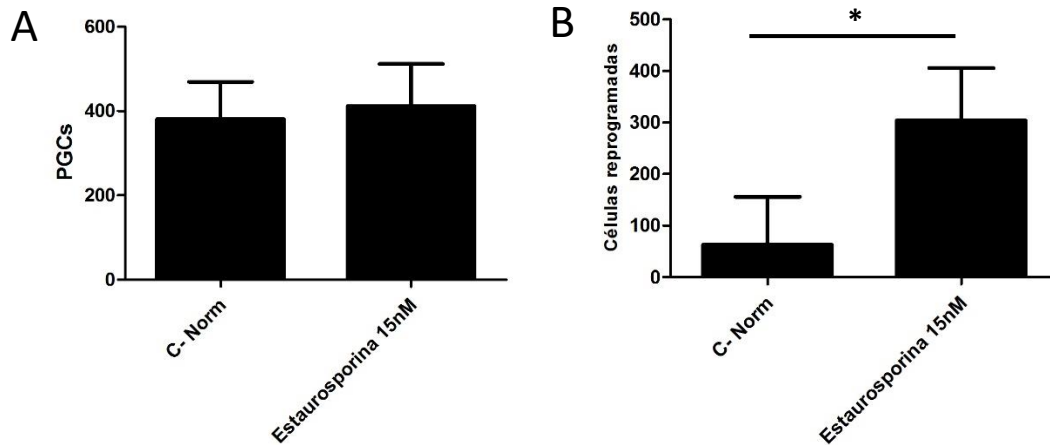


Figura 35. Número de PGCs (A) y células reprogramadas (B) en condiciones de normoxia y de normoxia en presencia de estaurosporina. Un asterisco representa un valor  $p < 0.05$ .

Dado que la retirada del calcio intracelular no tiene un efecto sobre la reprogramación, mientras que la inhibición de las PKCs sí que es capaz de inducir la reprogramación, nos preguntamos si este aumento en la reprogramación estaría relacionado con las PKCs que no dependen de calcio. Dentro de la familia de las PKCs, que comparten los dominios catalíticos, existen distintos subtipos según los dominios reguladores que posean: las PKCs clásicas ( $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\gamma$ ) poseen dominios de unión a calcio y a diacilglicerol (DAG), mientras que las nuevas ( $\theta$ ,  $\eta$ ,  $\epsilon$ ,  $\delta$ ) no poseen el dominio de unión a calcio y sólo pueden ser activadas por su unión a DAG. Las PKCs atípicas ( $\zeta$ ,  $\iota/\lambda$ ) carecen tanto del dominio de unión a calcio como del de unión a DAG (Kishimoto et al, 1989; Cenni et al, 2002; Duquesnes et al, 2011).

Primero, se analizó la expresión génica por RT-PCR cuantitativa de la isoforma  $\epsilon$  de la familia de las PKCs (*Prkce*), que es activada por diacilglicerol, pero no por calcio. El objetivo del estudio era incorporar un número mayor de PKCs nuevas y atípicas, pero el resto de dichos genes no superaron satisfactoriamente los requisitos fijados y no fueron validados. Además de la *Prkce*, se incluyeron las subunidades catalíticas de la quinasa II dependiente de calcio/calmodulina (*Camk2g*) y de la calcineurina (*Ppp3cc*).

Como se aprecia en la Fig. 36, se produce una leve disminución de la expresión de *Prkce* en condiciones de hipoxia. Por su parte, *Camk2g* y *Ppp3cc* mostraron un leve aumento en su expresión.

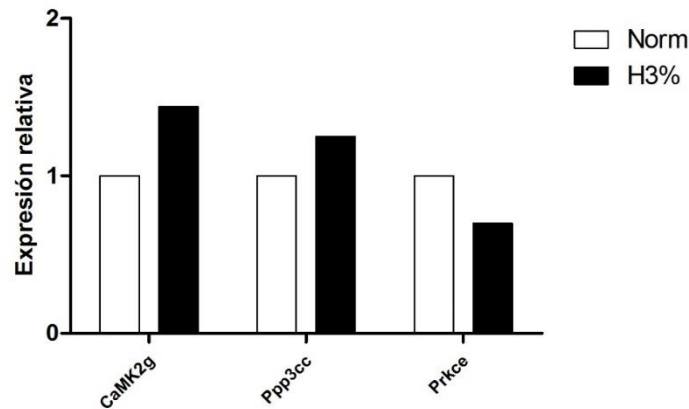


Figura 36. Expresión relativa en normoxia e hipoxia para los genes *Camk2g* (subunidad gamma de la proteína quinasa dependiente de calcio-calmodulina II), *Ppp3cc* (subunidad gamma de la proteína fosfatasa 3) y *Prkce* (isoforma epsilon de la proteína quinasa C). Los datos se muestran normalizados con respecto a la normoxia.

Debido a que tanto la quinasa dependiente de calmodulina como la calcineurina son dependientes de calcio pero la proteína quinasa C tipo  $\epsilon$  no, decidimos centrarnos en el estudio de esta última enzima por los resultados negativos obtenidos previamente en cuanto a los niveles de calcio y por la dificultad de diseñar nuevos experimentos que eviten el efecto tóxico de este catión en un tipo celular tan sensible como las PGCs.

Se realizaron experimentos utilizando tanto un inhibidor (protein kinase c  $\epsilon$  translocation inhibitor peptide, PIP) como un activador (FR236924) de dicha enzima. Dado que su expresión disminuye en hipoxia, se cultivaron PGCs en normoxia en presencia de un inhibidor de la translocación de *Prkce* (PIP) y en hipoxia en presencia de un activador de dicha isoforma. Los resultados mostraron que la activación de *Prkce* en hipoxia no inhibe la reprogramación, mientras que la inhibición de la misma sí es capaz de inducir la reprogramación de las PGCs en normoxia (Fig. 37).

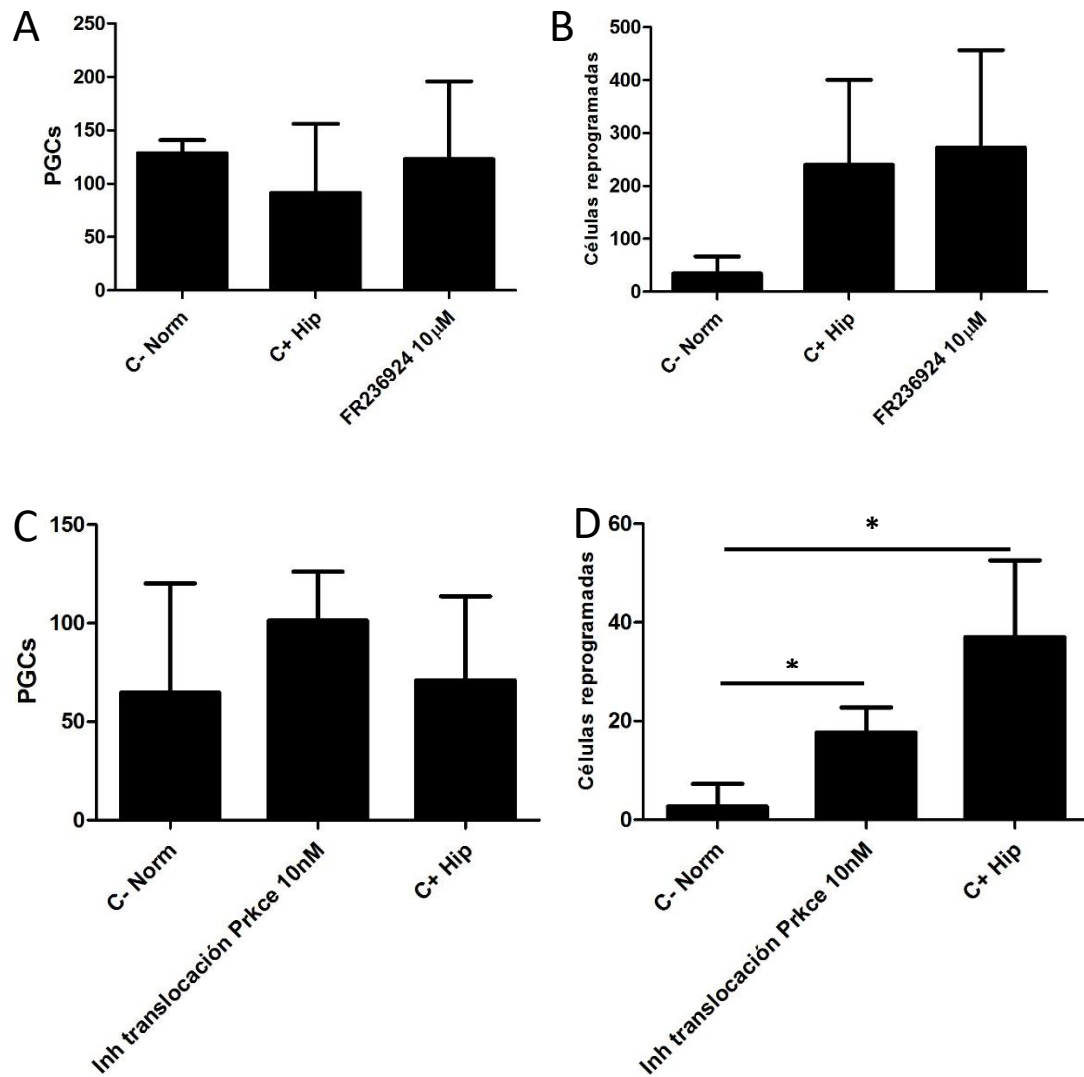


Figura 37. Número de PGCs (A) y células reprogramadas (B) en condiciones de normoxia, hipoxia e hipoxia en presencia de FR236924 (activador de prkce). Número de PGCs (C) y células reprogramadas (D) en condiciones de normoxia, normoxia en presencia del inhibidor de la translocación de prkce e hipoxia. Un asterisco representa un valor  $p < 0.05$ .

En resumen, tanto el calcio como la transducción de señales mediada por este catión no parecen tener un papel reseñable en la reprogramación de PGCs. Sin embargo, la inhibición de la translocación de una PKC no regulada por calcio es capaz de generar un número estadísticamente superior de PGCs reprogramadas.



### Las modificaciones epigenéticas intervienen en la reprogramación de las PGCs y aumentan su proliferación en condiciones de hipoxia

Dada la importancia que tiene la epigenética durante el desarrollo de las PGCs, y teniendo en cuenta que ya se ha descrito su reprogramación utilizando modificadores epigenéticos como el inhibidor de deacetilasas de histonas TSA (Durcova-Hills et al, 2008), se decidió realizar una serie de experimentos para investigar la influencia de otras alteraciones epigenéticas en la reprogramación de PGCs.

En primer lugar, se planteó el estudio de la variación en la expresión de enzimas implicadas en varias modificaciones epigenéticas provocadas por la hipoxia. En concreto, se analizaron las metiltransferasas de histonas *Ehmt1* y *Ehmt2*, y la demetilasa de la lisina 27 de la histona 3 *Jmjd3*. Como se puede apreciar, prácticamente no hubo diferencias en la expresión de las tres enzimas en hipoxia (Fig. 38).

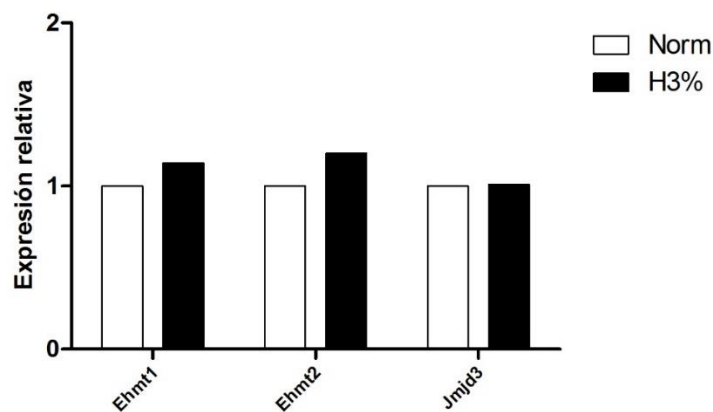


Figura 38. Expresión relativa de *Ehmt1*, *Ehmt2* y *Jmjd3* en normoxia y en hipoxia. Los datos se muestran normalizados con respecto a la normoxia.

Teniendo en cuenta que estas tres enzimas dejan muchas modificaciones epigenéticas fuera del estudio y que otros modificadores epigenéticos como la TSA ya han mostrado capacidad de reprogramar las PGCs, se decidió utilizar compuestos que cubrieran un abanico más amplio de modificaciones. Los reactivos elegidos fueron el butirato sódico, el ácido valproico, el DZNep y la tranilcipromina. Los dos primeros son inhibidores de las enzimas histona deacetilasas (HDACs) y han sido utilizados en otros estudios como factores solubles integrantes de cócteles de reprogramación (Hou et al., 2013). Los resultados mostraron que, mientras que el butirato sódico no mostró ningún efecto al añadirse al cultivo, el ácido valproico indujo un mayor número

de células reprogramadas en condiciones de normoxia (Fig. 39). Este resultado es curioso, ya que ambos modificadores, junto con TSA, son inhibidores de deacetilasas de histonas pero sólo dos de ellos inducen reprogramación, lo cual hace pensar que no comparten el mismo mecanismo de acción.

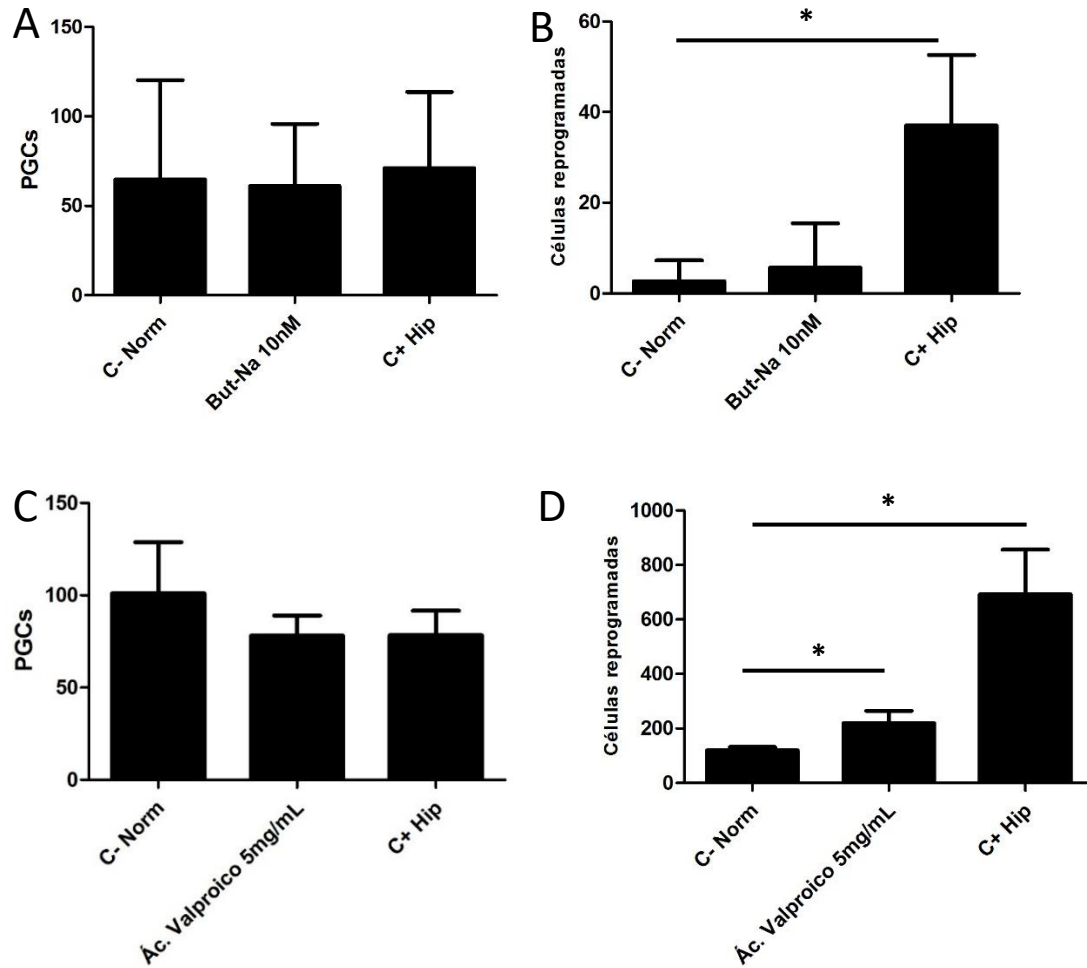


Figura 39. Número de PGCs (A) y células reprogramadas (B) en condiciones de normoxia, normoxia en presencia de butirato sódico e hipoxia. Número de PGCs (C) y células reprogramadas (D) en condiciones de normoxia, normoxia en presencia de ácido valproico e hipoxia. Un asterisco representa un valor  $p < 0.05$ .

También se quiso evaluar el posible papel del complejo represor Polycomb, que actúa a nivel la metilación del DNA. Para ello, se cultivaron PGCs en presencia de 3-Deazaneplonocina A (DZNep), inhibidor de la metiltransferasa EZH2, que forma parte de dicho complejo. Los resultados mostraron que el cultivo en presencia de DZNep no tiene efecto sobre la reprogramación de las PGCs ni en condiciones de normoxia ni de hipoxia (Fig. 40). Por lo tanto,

la metilación del DNA mediada por el complejo Polycomb no es una modificación epigenética relevante en la reprogramación de PGCs.

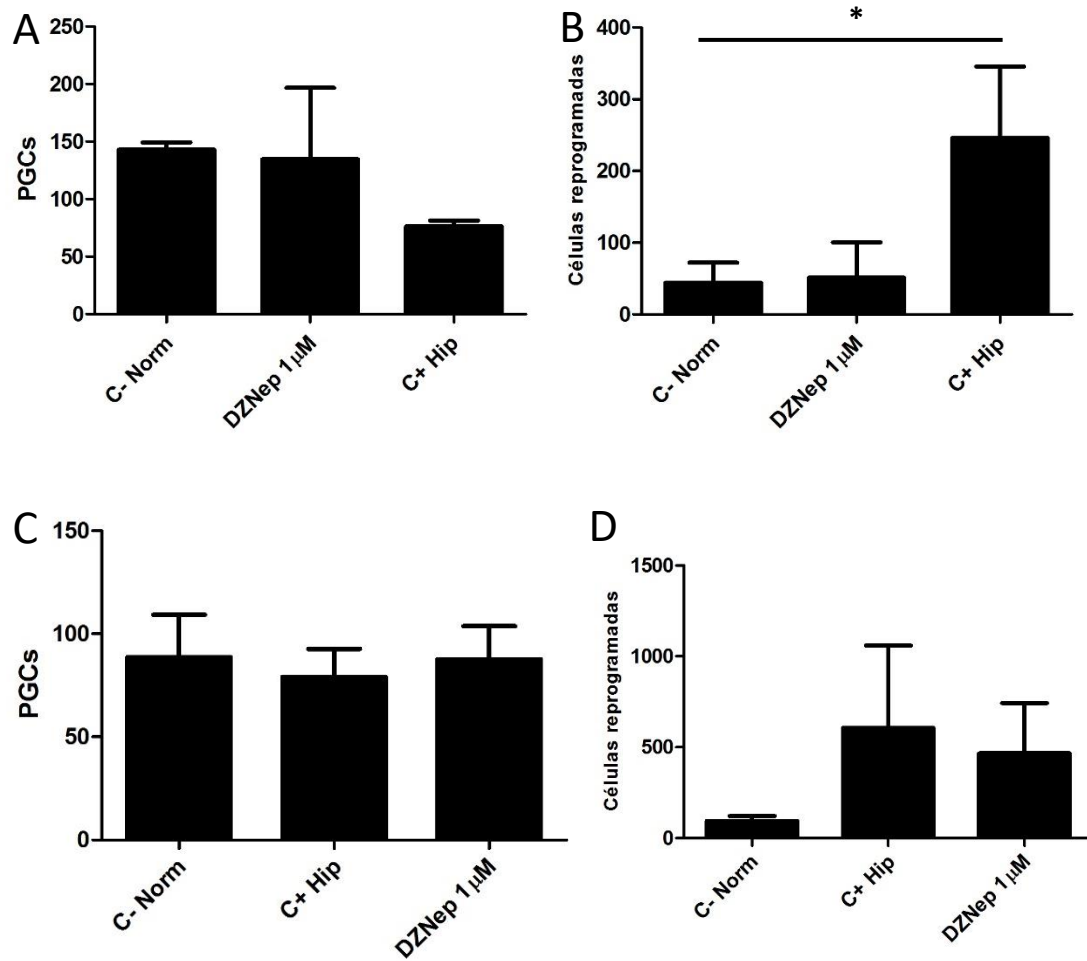


Figura 40. Número de PGCs (A) y células reprogramadas (B) en condiciones de normoxia, normoxia en presencia de DZNep e hipoxia. Número de PGCs (C) y células reprogramadas (D) en condiciones de normoxia, hipoxia e hipoxia en presencia de DZNep. Un asterisco representa un valor  $p < 0.05$ .

La siguiente modificación epigenética objeto de estudio fue la metilación de histonas. Para ello, se cultivaron PGCs en presencia de tranilcipromina (tranil), un inhibidor de la demetilasa de histonas específica para lisinas 1A (Kdm1a). En este caso, la tranilcipromina no mostró ningún efecto en normoxia, pero sí que fue capaz de realizar sinergia con la hipoxia y dar lugar a un mayor número de células reprogramadas (Fig. 41). Por lo tanto, la inhibición de la metilación de histonas provoca una mayor reprogramación de las PGCs en hipoxia.

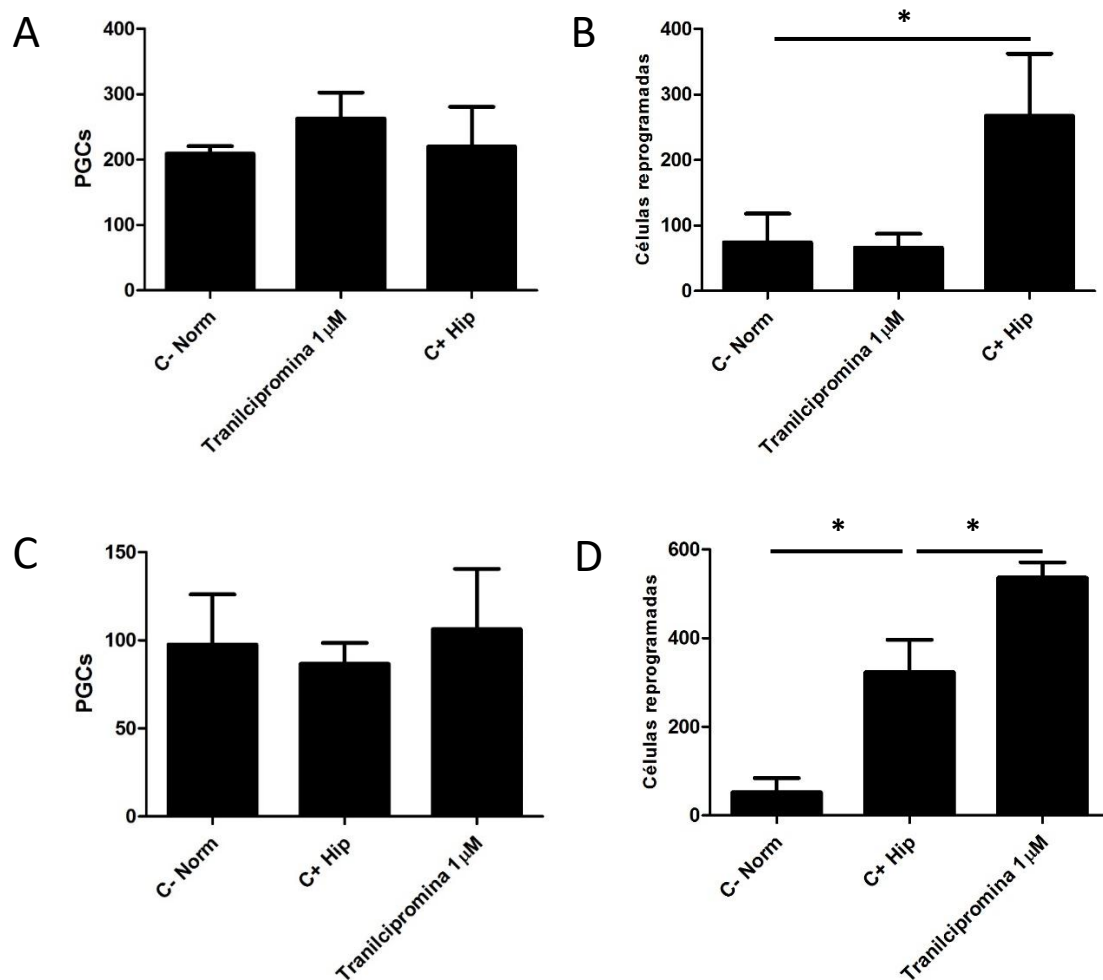


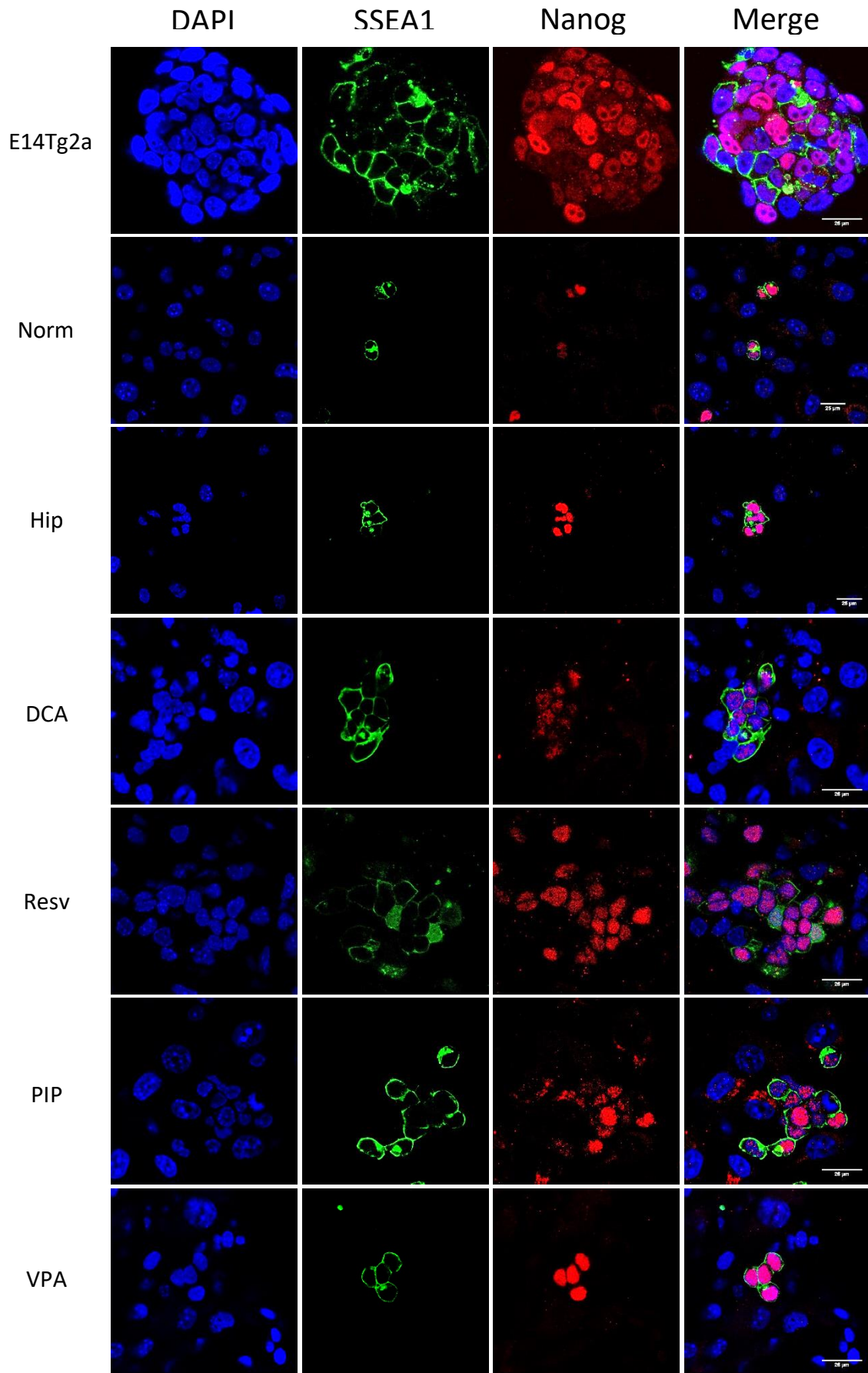
Figura 41. Número de PGCs (A) y células reprogramadas (B) en condiciones de normoxia, normoxia en presencia de tranilcipromina e hipoxia. Número de PGCs (C) y células reprogramadas (D) en condiciones de normoxia, hipoxia e hipoxia en presencia de tranilcipromina. Un asterisco representa un valor  $p < 0.05$ .

### Los compuestos reprogramadores son capaces de inducir pluripotencia *in vitro*

En este estudio se han identificado 8 nuevos compuestos con capacidad reprogramadora sobre las PGCs, ya sea en condiciones de normoxia o de sinergia con la hipoxia. Dichos compuestos son, para la normoxia: DCA, Resv, PIP y VPA. Para el caso de la hipoxia, los factores son: CHIR, Tranil, DASA y SC79. Los siguientes experimentos detallados en esta tesis doctoral van encaminados a caracterizar las células obtenidas mediante la adición de cada uno de estos 8 compuestos de forma aislada.

En primer lugar, se utilizó Nanog como marcador de pluripotencia. Como ya se ha mencionado, las PGCs expresan Nanog, de forma que una eventual diferenciación tanto en normoxia como en hipoxia podría ser visualizada mediante la pérdida de este marcador. Tras analizar la

presencia de Nanog mediante inmunofluorescencia, se vio que el cultivo en presencia de cada uno de los 8 compuestos, así como en normoxia e hipoxia, mantiene la expresión nuclear de Nanog (Fig. 42). Se recogieron también imágenes de colonias parcialmente diferenciadas, comprobándose que este escenario puede identificarse mediante la pérdida de marcaje frente a SSEA1 y a Nanog (Fig. 43). De esta forma, quedan validados los resultados de la Figura 42, donde el marcaje frente a estas dos moléculas indica que las células reprogramadas que mantienen el estado desdiferenciado expresan SSEA1 en membrana y Nanog en núcleo. De hecho, puede apreciarse que en alguna célula que conserva sólo parcialmente el marcaje en membrana no hay presencia de Nanog (Fig. 43). En conclusión, la presencia o ausencia de Nanog es un buen indicador de diferenciación y permite argumentar que las colonias obtenidas en presencia de todos los compuestos reprogramadores mantienen un fenotipo desdiferenciado.



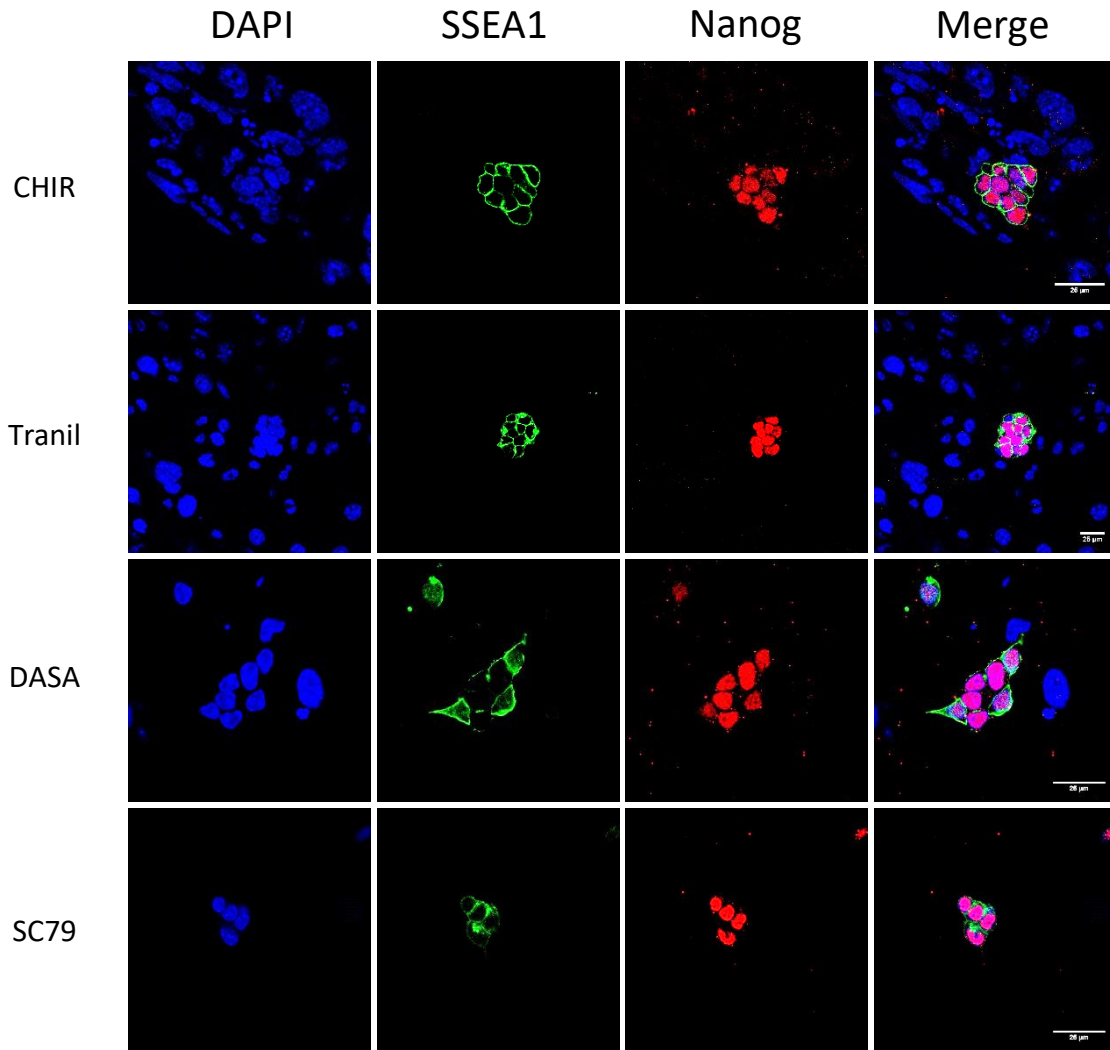


Figura 42. Inmunofluorescencias frente a Nanog en condiciones de normoxia, hipoxia, en presencia de DCA, Resv, PIP y VPA en condición de normoxia y en presencia de CHIR, Tranil, DASA y SC79 en condición de hipoxia tras 4 días de cultivo. Se incluye como control positivo la línea celular de ESCs E14TG2a. Las barras de escala corresponden a 25  $\mu\text{m}$ .

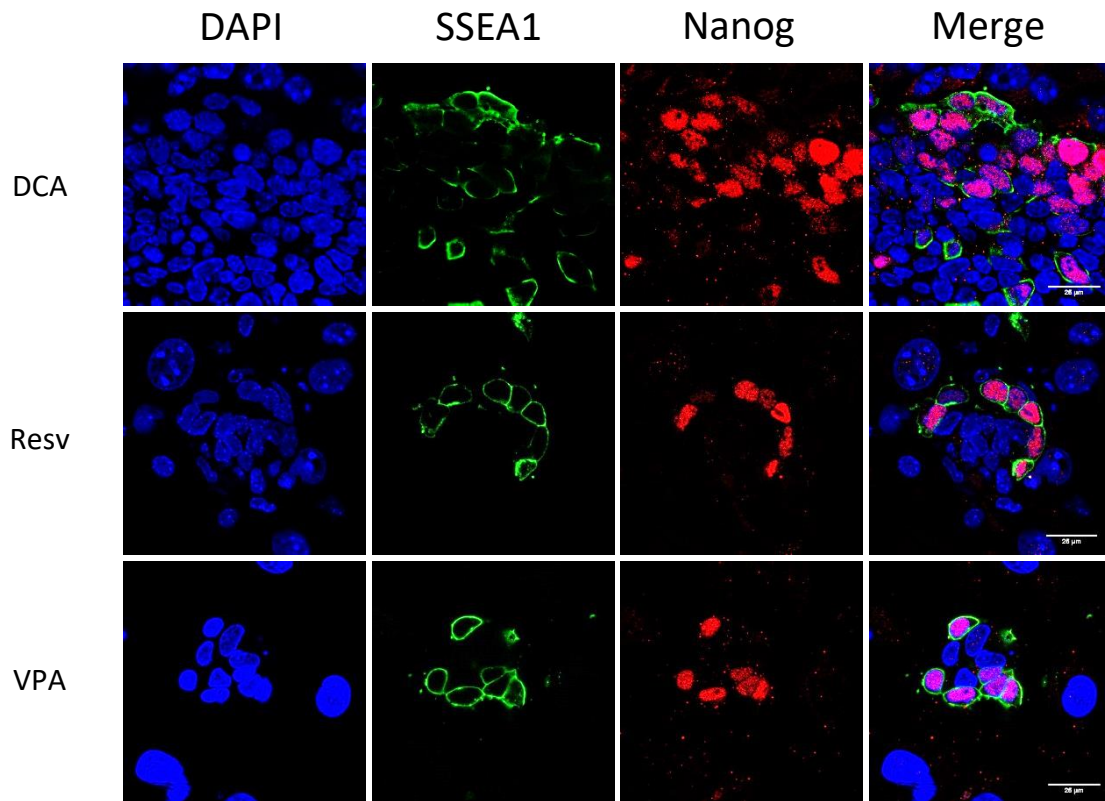
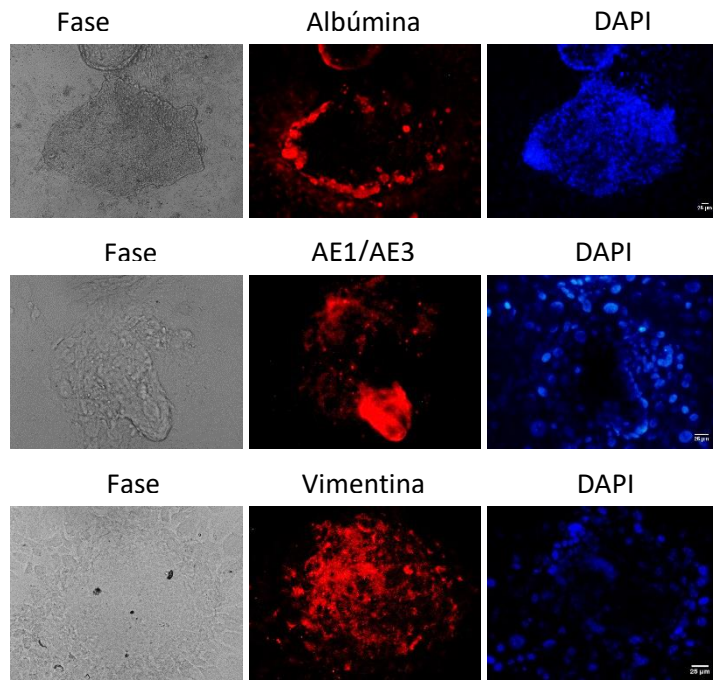


Figura 43. Representación de colonias parcialmente diferenciadas obtenidas en presencia de distintos reprogramadores. Las barras de escala corresponden a 25  $\mu\text{m}$ .

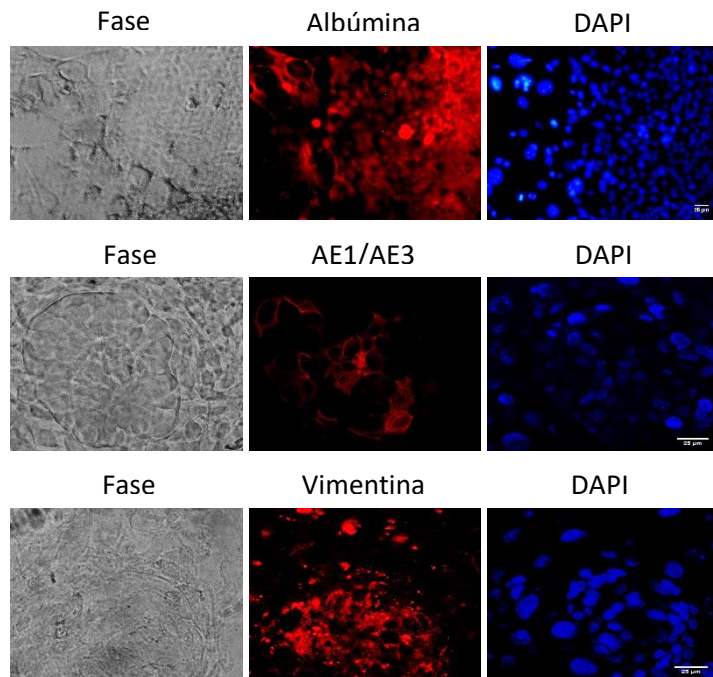
A continuación, se analizó de forma funcional la pluripotencia *in vitro* de DCA, Resv, PIP y VPA. Para ello, se obtuvieron cuerpos embrioides y se realizaron inmunofluorescencias frente a marcadores de las tres hojas embrionarias. Todos los compuestos mostraron pluripotencia *in vitro*, obteniéndose marcaje positivo para los marcadores elegidos para las tres hojas embrionarias: albúmina como marcador de endodermo; citoqueratinas AE1/AE3 para ectodermo y vimentina como marcador de mesodermo (Fig. 44).



### DCA



### Resv



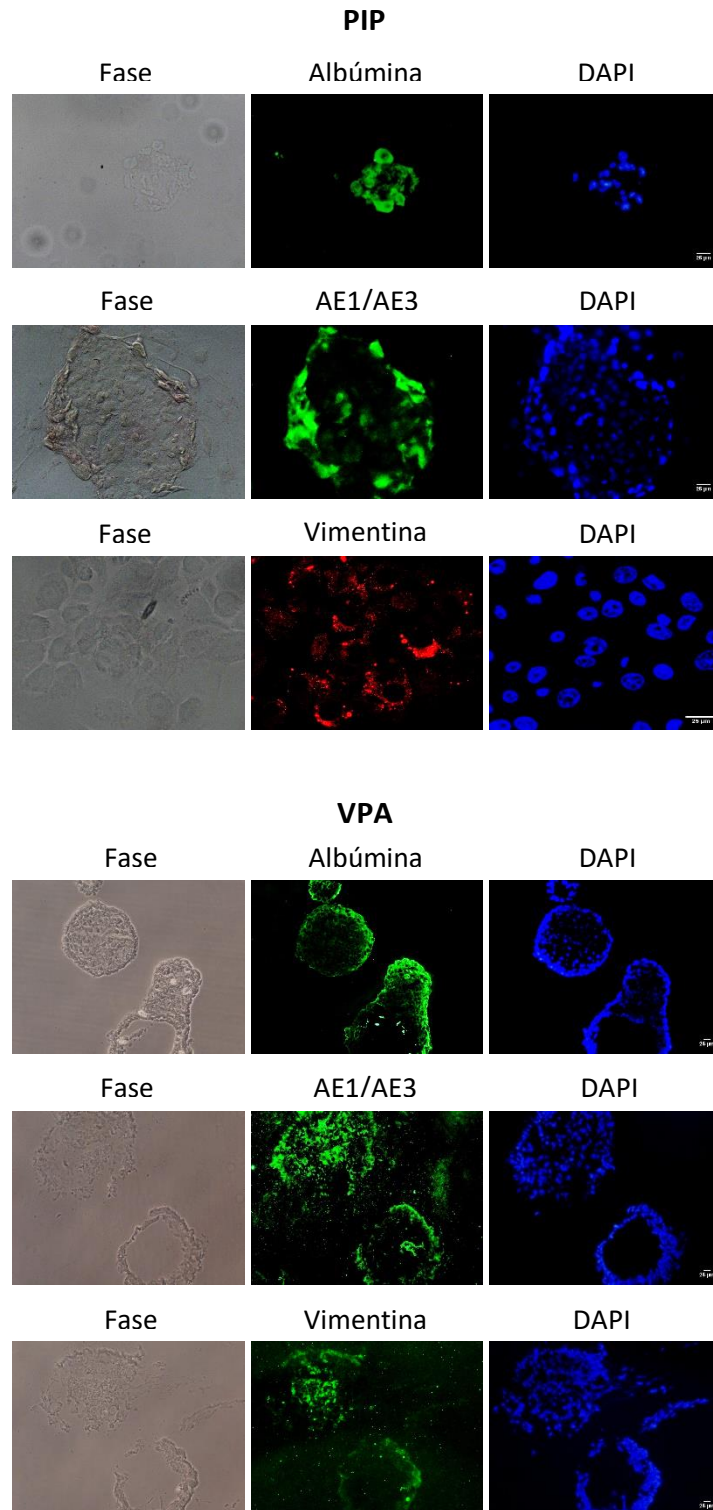


Figura 44. Microfotografías de contraste de fase (fase) e inmunofluorescencias frente a las tres hojas germinales realizadas sobre cuerpos embrioides originados de células reprogramadas con dicloroacetato (DCA), resveratrol (Resv), péptido inhibidor de la translocación de Prkce (PIP) y ácido valproico (VPA). Los marcadores frente a endodermo, ectodermo y mesodermo fueron, respectivamente, albúmina, citoqueratinas AE1/AE3 y vimentina. Las barras de escala corresponden a 25µm.

**DCA, Resv, PIP y VPA inducen la expresión de HIF1 $\alpha$  en normoxia y ningún compuesto reprogramador es capaz de mantener la expresión de HIF2 $\alpha$**

Puesto que las hiEGLs expresan HIF1 $\alpha$ , y tanto las PGCs cultivadas en normoxia como las hiEGLs expresan HIF2 $\alpha$ , quisimos comprobar si este fenotipo era compartido al cultivar las PGCs en presencia de los compuestos reprogramadores DCA, Resv, PIP y VPA en normoxia. Los resultados muestran que estos compuestos inducen la expresión de HIF1 $\alpha$  (Fig. 45), que se va perdiendo hacia el día 6 de cultivo (Fig. 46). De igual manera, DCA, Resv, PIP y VPA mantiene la expresión de HIF2 $\alpha$  (Fig. 47), que también se va perdiendo hacia el día 6 de cultivo (Fig. 48). La coincidencia del fenotipo en hipoxia y de los 4 compuestos reprogramadores en normoxia hace pensar que la ruta de reprogramación converge en el patrón de expresión de los HIFs y de Nanog.

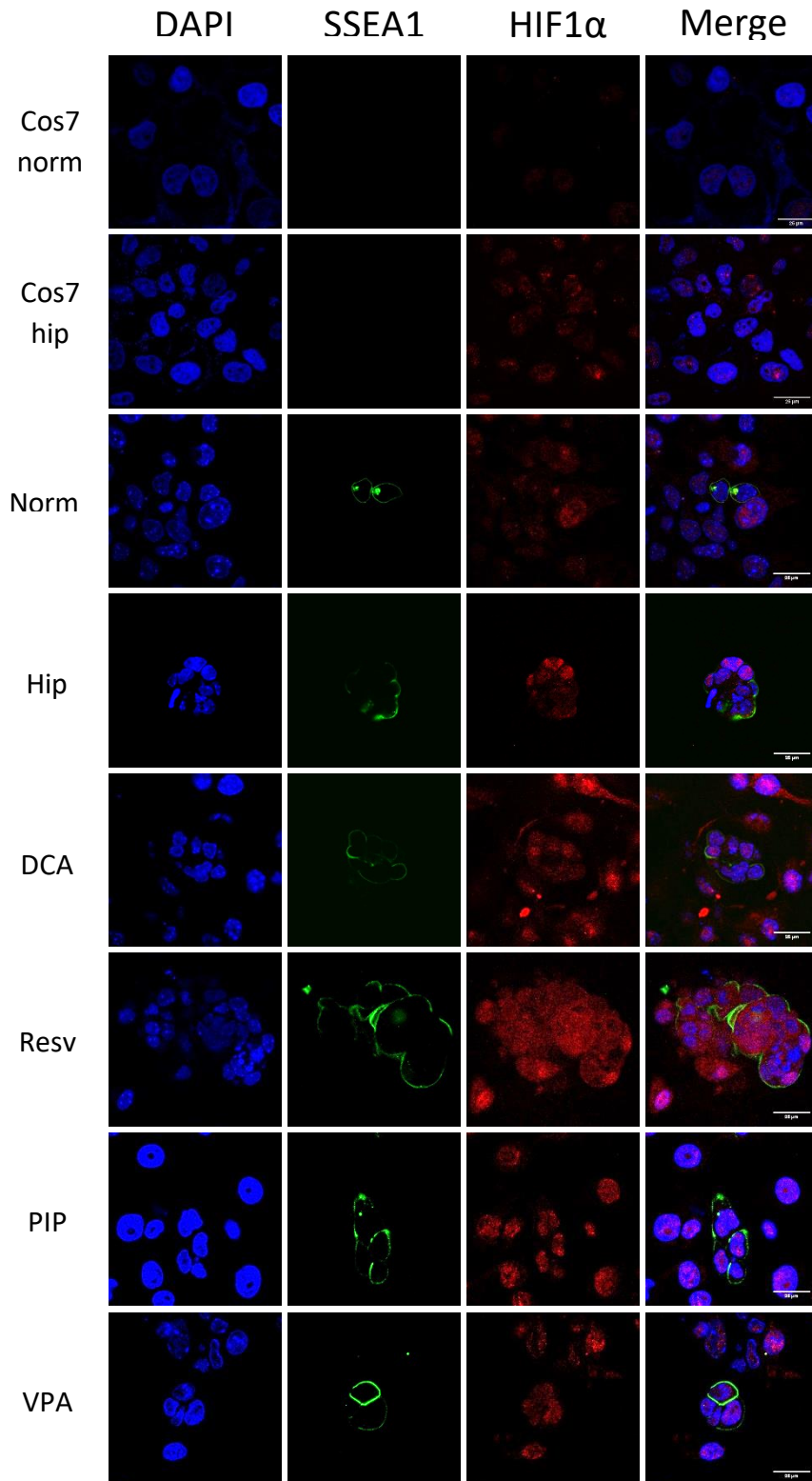


Figura 45. Imágenes de microscopía confocal e inmunofluorescencia frente a HIF1 $\alpha$ . Las muestras incluyen controles de células Cos7 cultivadas en normoxia (control negativo) y en hipoxia (control positivo) y PGCs cultivadas en normoxia y en hipoxia durante 48h, así como cultivadas en presencia de DCA, Resv, PIP y VPA durante el mismo tiempo. Las barras de escala corresponden a 25  $\mu$ m.

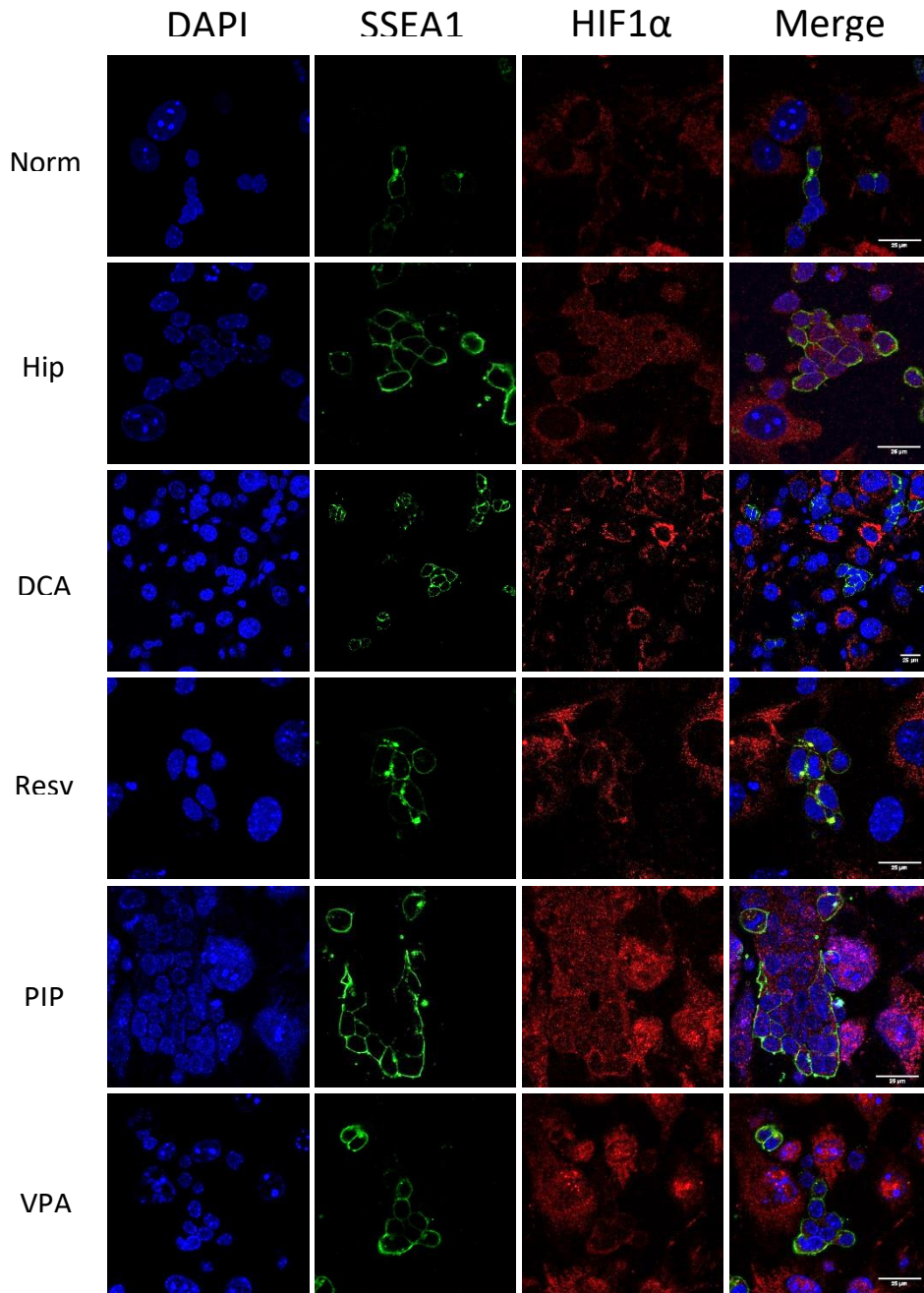


Figura 46. Imágenes de microscopía confocal e inmunofluorescencia frente a HIF1 $\alpha$ . Las muestras incluyen células Cos7 cultivadas en normoxia (control negativo) y en hipoxia (control positivo) y PGCs cultivadas en normoxia y 6 días en hipoxia, así como cultivadas en presencia de DCA, Resv, PIP y VPA durante el mismo periodo de tiempo. Las barras de escala corresponden a 25  $\mu$ m.

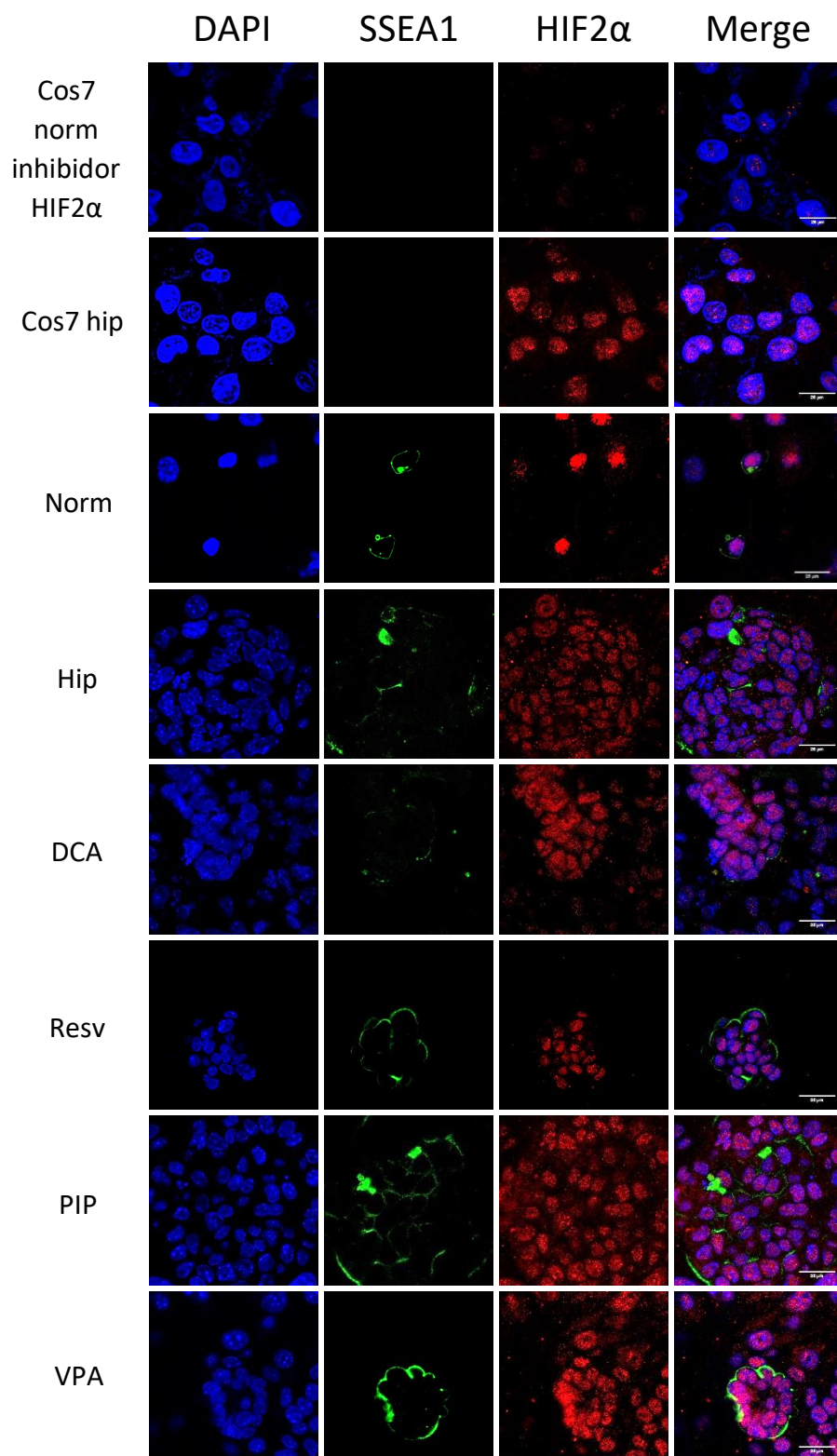


Figura 47. Imágenes de microscopía confocal e inmunofluorescencia frente a HIF2 $\alpha$ . Las muestras incluyen células Cos7 cultivadas en normoxia en presencia de un inhibidor de la traducción de HIF2 $\alpha$  (control negativo) y en hipoxia (control positivo). Además, se incluyen PGCs cultivadas en normoxia y en hipoxia durante 48h, así como cultivadas en presencia de DCA, Resv, PIP y VPA durante el mismo periodo de tiempo. Las barras de escala corresponden a 25  $\mu$ m.

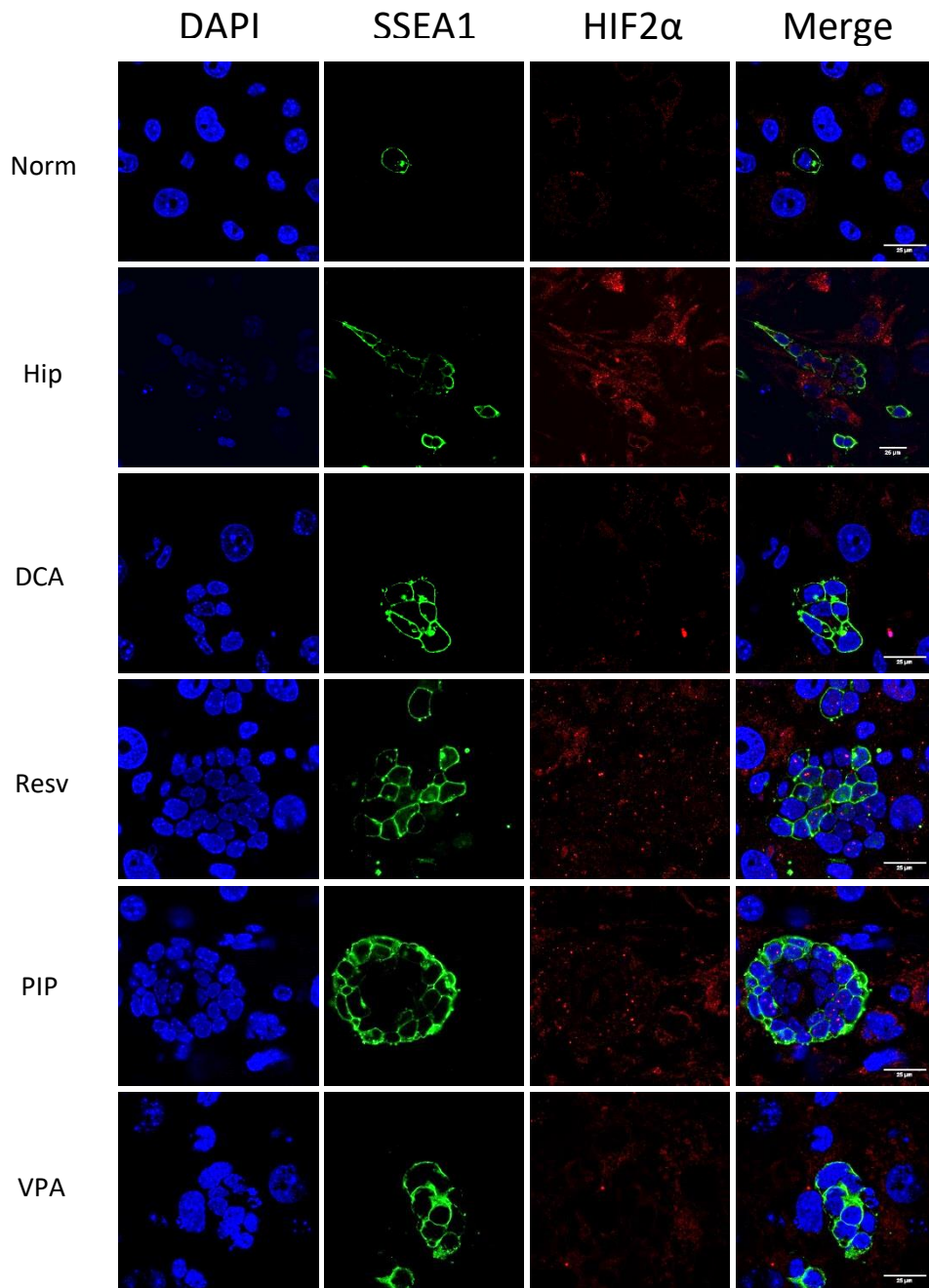


Figura 48. Imágenes de microscopía confocal e inmunofluorescencia frente a HIF2 $\alpha$ . Las muestras incluyen células Cos7 cultivadas en normoxia en presencia de un inhibidor de la traducción de HIF2 $\alpha$  (control negativo) y en hipoxia (control positivo). Además, se incluyen PGCs cultivadas en normoxia y en hipoxia durante 6 días, así como cultivadas en presencia de DCA, Resv, PIP y VPA durante el mismo periodo de tiempo. Las barras de escala corresponden a 25  $\mu$ m.

### El cultivo en presencia de DCA, Resv, PIP y VPA provoca un cambio en el perfil metabólico y en los niveles de Oct4 equivalentes a los observados en hiEGLs

Visto que DCA, Resv, PIP y VPA inducen un patrón de expresión de los HIFs similar al obtenido con la hipoxia, quisimos comprobar si estos compuestos también compartían con la hipoxia la inducción de un cambio metabólico. Para ello, se realizó una citometría marcando las mitocondrias con la sonda JC-1, similar a la de la Fig. 13, pero incluyendo la señal en rojo para detectar las mitocondrias activas además de las inactivas. Efectivamente, el cultivo en presencia de cada uno de los compuestos DCA, Resv, PIP y VPA elevó la población SSEA1<sup>+</sup> con mitocondrias inactivas e hizo desaparecer la pequeña población que únicamente contenía mitocondrias activas, de forma análoga a lo ocurrido en condiciones de hipoxia (Fig. 49).

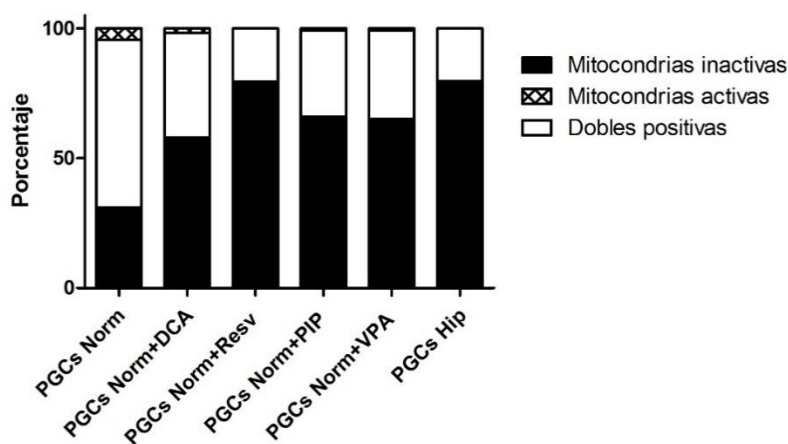


Figura 49. Representación mediante diagrama de barras de los resultados de citometría de flujo de las células SSEA1<sup>+</sup>, repartidas entre células con señal para mitocondrias inactivas, células con señal para mitocondrias activas y células con ambas señales, de los cultivos de PGCs sometidos a los diferentes compuestos reprogramadores indicados, además de los controles de normoxia e hipoxia.

De igual manera, se realizó la misma comprobación en lo relativo a la expresión de Oct4 para ver si el mismo patrón de expresión de HIFs entre cada uno de los compuestos DCA, Resv, PIP y VPA y la hipoxia también se correspondía con una mayor heterogeneidad en los niveles de Oct4 en relación a la normoxia. Los perfiles obtenidos (Fig. 50) fueron analizados para obtener la varianza intragrupo de cada una de las condiciones experimentales, obteniendo un estadístico F-Snedecor, tal y como se hizo en el experimento anterior con la hipoxia (Fig. 23). La comparación de todas las condiciones experimentales frente a la normoxia dio como resultado



una significación estadística entre todas las condiciones salvo entre el PIP y la normoxia. Esto significa que las varianzas de la normoxia frente a las de DCA, Resv, VPA y la hipoxia son diferentes y, por tanto, presentan una distribución distinta y una heterogeneidad diferente respecto a los niveles de Oct4. Como puede apreciarse en la Fig. 50, la condición de normoxia muestra dos poblaciones diferenciadas: una con bajos niveles de Oct4 y otra con niveles altos, sin casi eventos que muestren niveles intermedios. Sin embargo, en el resto de condiciones experimentales, sí aparecen poblaciones con niveles de Oct4 intermedios entre las dos poblaciones detectadas en normoxia. Este resultado concuerda con los resultados previos en hipoxia, ya que son las PGCs con niveles intermedios o bajos de Oct4, siempre dentro de un estrecho rango, las que son capaces de reprogramarse.

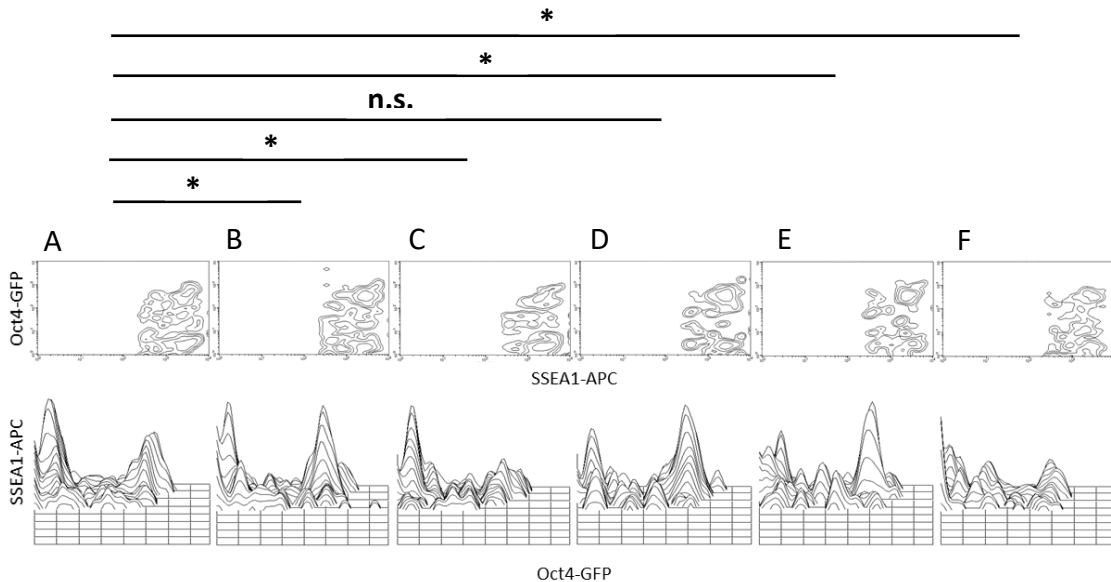


Figura 50. Patrón de expresión de Oct4 en las poblaciones SSEA1<sup>+</sup> cultivadas en normoxia (A), normoxia en presencia de DCA (B), normoxia en presencia de Resv (C), normoxia en presencia de PIP (D), normoxia en presencia de VPA (E) e hipoxia (F). En el panel superior se muestran los gráficos de contorno de las PGCs, positivas para SSEA1, frente a la señal obtenida para GFP, bajo la influencia del promotor de Oct4. En el panel inferior se muestran los mismos datos, reorientados. Los datos muestran diferencias estadísticamente significativas entre la normoxia y el resto de condiciones experimentales, salvo en el caso de PIP. Un asterisco representa un valor  $p < 0.05$ .

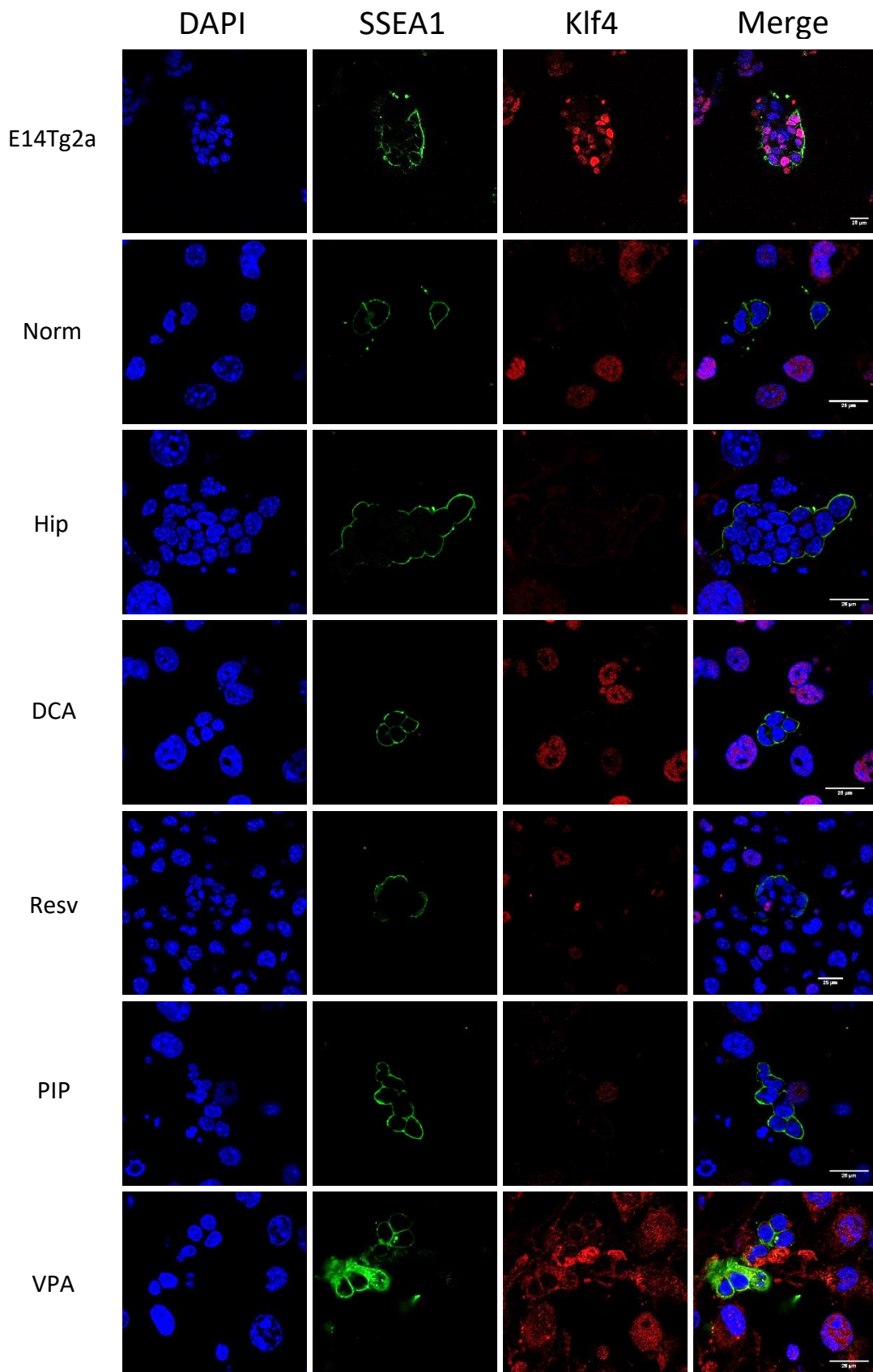
En conclusión, la adición de DCA, Resv, PIP y VPA en normoxia provoca una reprogramación de las PGCs que se asemeja a la reprogramación de PGCs hacia hiEGLs en su capacidad pluripotente

*in vitro* y en el patrón de expresión de HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$  y Nanog. También presentan un patrón similar de actividad mitocondrial y, además, DCA, Resv y VPA muestran una desregulación de los niveles de Oct4 similar a la inducida por hipoxia.

### **Ninguno de los compuestos reprogramadores consigue inducir la autorrenovación de las PGCs reprogramadas**

Como ya se ha mencionado las hiEGLs no poseen capacidad de autorrenovación, probablemente debido a que no expresan ni Klf4 ni c-Myc (López-Iglesias, Alcaina et al, 2015). Se ha descrito en las figuras anteriores que la reprogramación alcanzada mediante el uso de DCA, Resv, PIP y VPA comparte todas las características descritas para el caso de las hiEGLs, con la salvedad de la heterogeneidad de Oct4 para el factor PIP. Sin embargo, los compuestos reprogramadores en normoxia, aunque converjan en tantos puntos con las hiEGLs, ejercen su acción en un contexto radicalmente distinto, ya que los niveles de oxígeno son tremendamente dispares. De igual manera, los compuestos que mostraron sinergia con la hipoxia y que aumentaron el número de células reprogramadas lo hicieron previsiblemente estimulando la proliferación, ya que las hiEGLs muestran capacidad pluripotente y ninguno de los compuestos CHIR, Tranil, DASA y SC79 inducen una proliferación causada por la diferenciación, como muestran las inmunofluorescencias frente a Nanog (Fig. 43). Por estas razones se planteó un estudio de la capacidad de autorrenovación de las células reprogramadas mediante los 8 compuestos.

En primer lugar, se estudió la presencia de Klf4 en los cultivos en presencia de todos los compuestos reprogramadores. Como se puede apreciar en las Fig. 51, ninguna de las 8 condiciones fue capaz de inducir la expresión de Klf4, manteniendo esa característica en común con las hiEGLs. Sin embargo, sí se apreciaron diferencias en cuanto a la presencia de c-Myc, detectándose marcaje nuclear con VPA en condiciones de normoxia y con todos los compuestos que mostraron capacidad reprogramadora en condiciones de hipoxia (Fig. 52). En conclusión, ninguno de los 8 compuestos consigue activar la expresión de Klf4, compartiendo esa característica con las hiEGLs. En cambio, las PGCs cultivadas en presencia de VPA, CHIR, Tranil, DASA y SC79 sí son positivas para c-Myc, dando una posible explicación al mayor número de células reprogramadas obtenidas en estas condiciones.



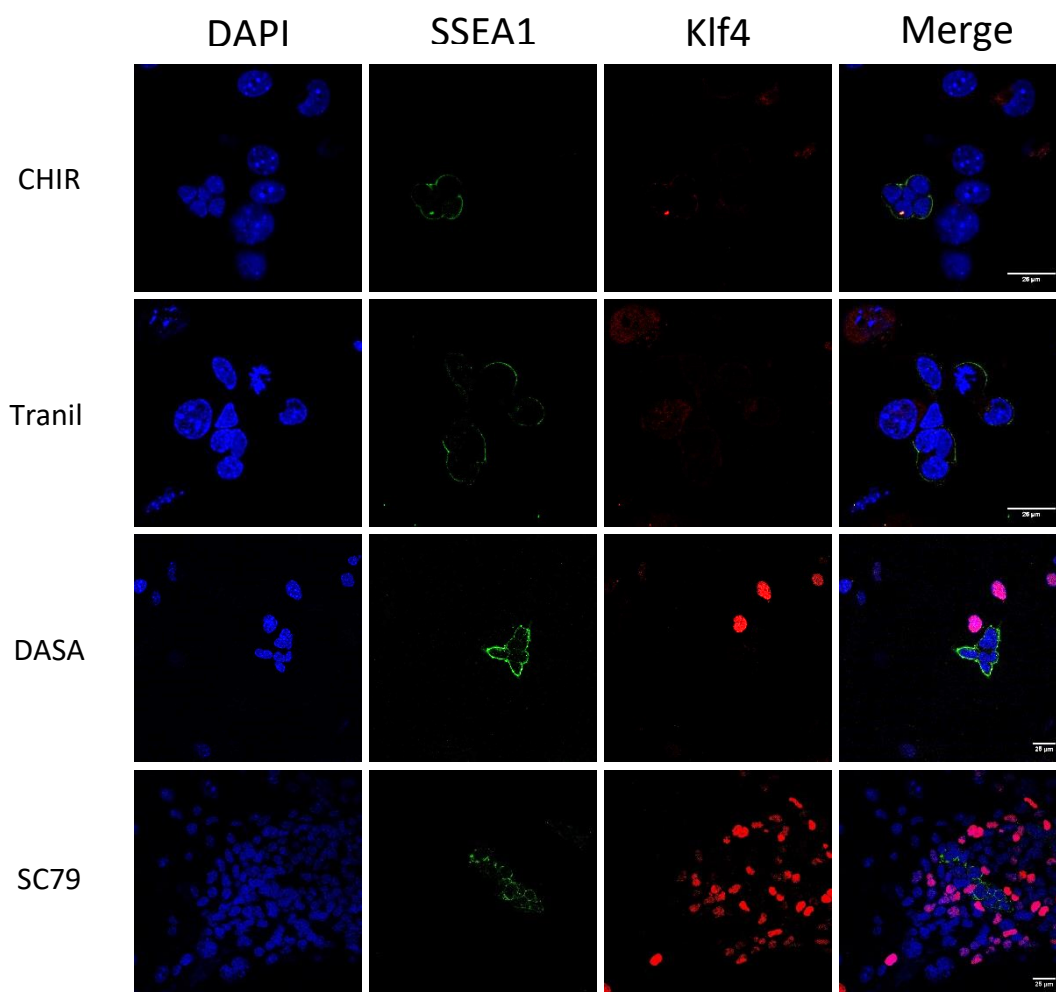
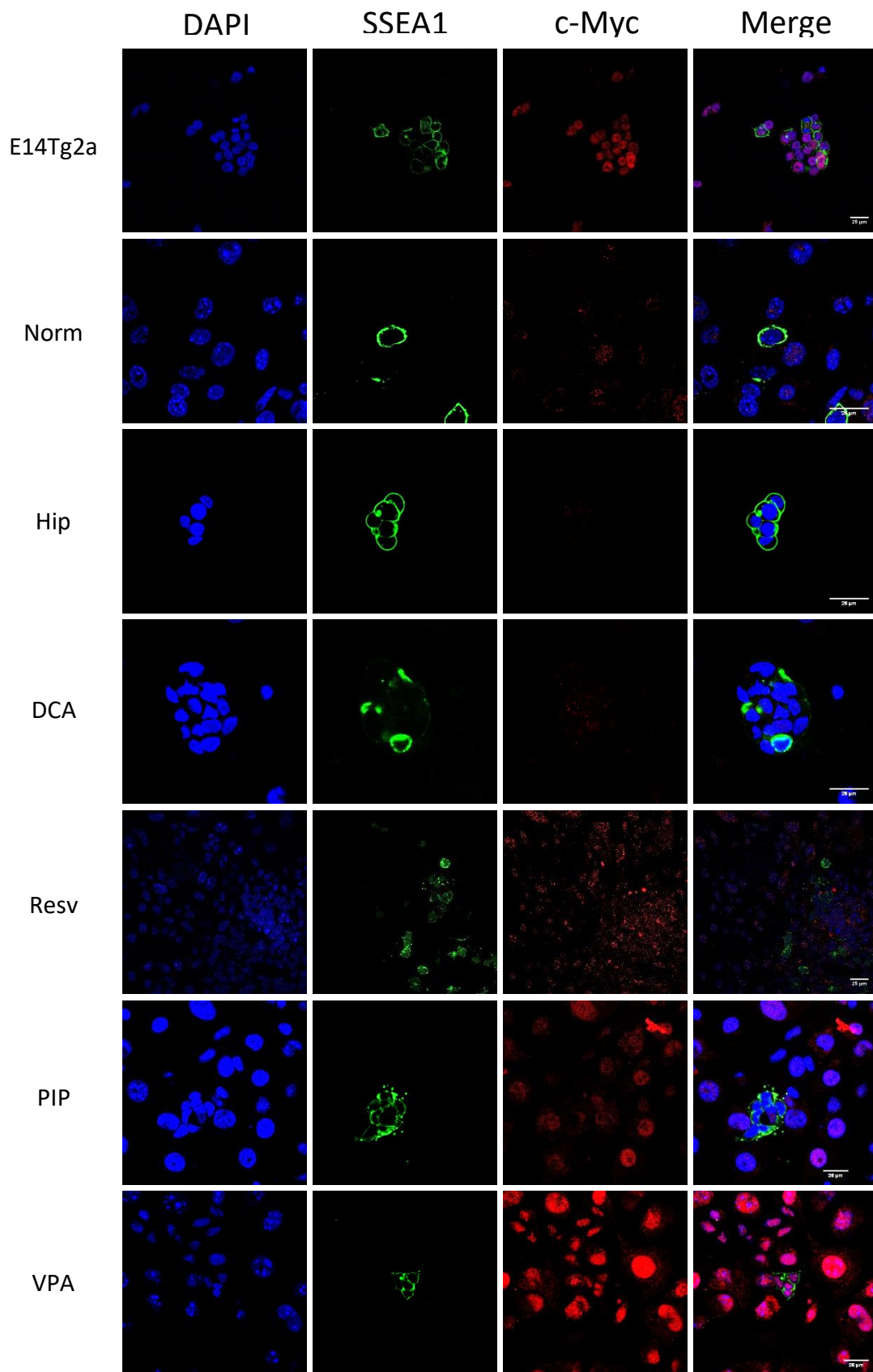


Figura 51. Imágenes de microscopía confocal e inmunofluorescencia frente a Klf4. Las muestras incluyen células E14TG2a como control positivo. Además, se incluyen PGCs cultivadas en normoxia y en hipoxia durante 4 días, así como PGCs cultivadas en presencia de todos los compuestos reprogramadores. A pesar de que su negatividad para Klf4 es evidente, sí se aprecia la presencia de Klf4 en células distintas a las STO al cultivar las PGCs con SC79. Sin embargo, las células que presentan esta positividad no muestran marcaje para SSEA1, por lo que son probablemente células diferenciadas que también son negativas para Nanog y que no son objeto de este estudio. Las barras de escala corresponden a 25  $\mu\text{m}$ .



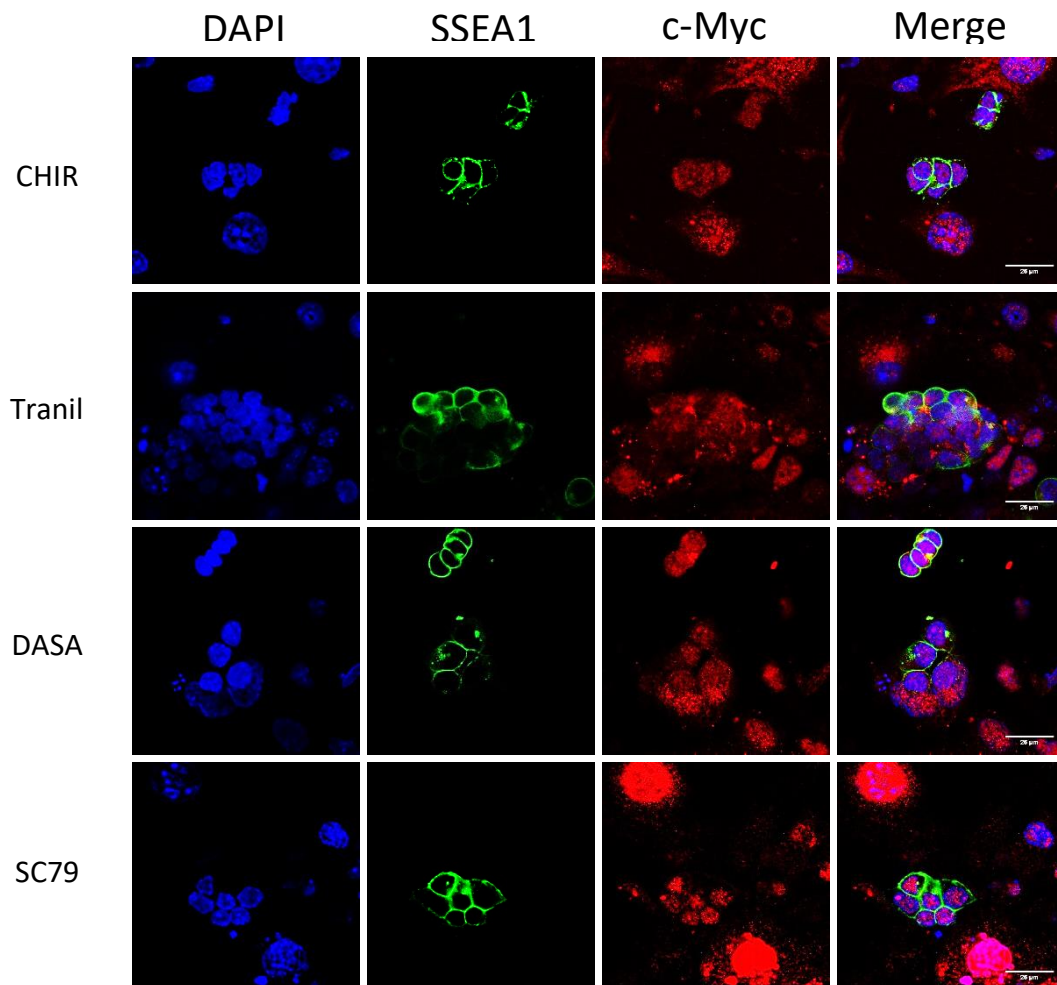


Figura 52. Imágenes de microscopía confocal e inmunofluorescencia frente a c-Myc. Las muestras incluyen células E14TG2a como control positivo. Además, se incluyen PGCs cultivadas en normoxia y en hipoxia durante 4 días, así como PGCs cultivadas en presencia de los 8 compuestos reprogramadores durante el mismo periodo de tiempo. Las barras de escala corresponden a 25  $\mu\text{m}$ .

Como prueba funcional para comprobar la capacidad de autorrenovación de las células reprogramadas con cada uno de los 8 compuestos se intentaron propagar en cultivo más allá de 3 pases, el cual fue el límite alcanzado con las hiEGLs. Los resultados (Fig. 53) muestran que las células reprogramadas en normoxia con DRPV aguantaron hasta el pase 3 y fueron capaces de seguir formando colonias.

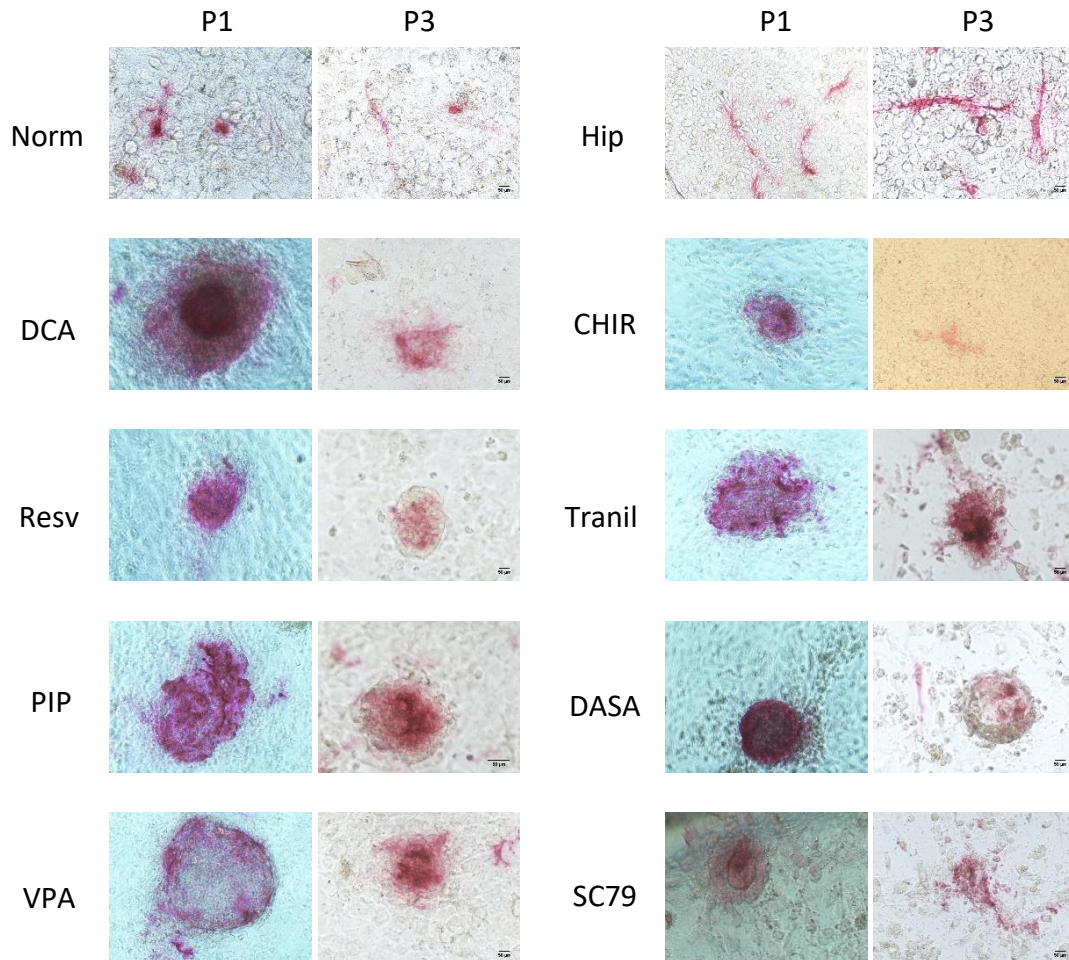


Figura 53. Fotografías representativas del cultivo en condiciones de normoxia (Norm), con cada uno de los compuestos reprogramadores en normoxia (DCA, Resv, PIP y VPA), en condiciones de hipoxia (Hip) y en presencia de cada uno de los compuesto reprogramadores en hipoxia (CHIR, Tranil, DASA y SC79) a pase 1 (P1) y pase 3 (P3) teñidas para fosfatasa alcalina. Las barras de escala corresponden a 50µm.

En el caso de la reprogramación en hipoxia, parece existir una tendencia progresiva hacia la diferenciación al utilizar CHIR, Tranil, DASA y SC79, al igual que sucede con las hiEGLs en hipoxia. Será necesario llevar todas las condiciones a pases más avanzados para extraer conclusiones más sólidas, pero por lo pronto es esperanzador que en el pase 3 se puedan visualizar colonias positivas para TNAP, lo cual no ocurría en el caso de las hiEGLs. En conclusión, ninguno de los compuestos reprogramadores permite una expansión al uso del cultivo, que debería crecer exponencialmente. Es probable que aún no se haya alcanzado una reprogramación completa, corroborada por la ausencia de expresión de Klf4 (Fig. 51) y de los genes de pluripotencia presentes en EGCs (Fig. 10). Sin embargo, sí se ha dado un paso más hacia la autorrenovación,

ya que 5 de los 8 compuestos reprogramadores han conseguido inducir la expresión de c-Myc, y todos ellos han desarrollado colonias hasta pase 3 (Fig. 53). Como puede apreciarse en la Figura 53, los compuestos reprogramadores en normoxia generan colonias positivas para fosfatasa alcalina, que mantienen un considerable tamaño tras el pase 1, lo cual no sucede en la situación control en normoxia. Sin embargo, las fotos a pase 3 muestran que las colonias disminuyen su tamaño y la positividad para fosfatasa alcalina, apuntando a que probablemente las células reprogramadas no tienen capacidad de autorrenovación y van muriendo o más probablemente diferenciándose, como se aprecia en la formación de colonias semejantes a cuerpos embrioides. En cuanto a los compuestos reprogramadores en hipoxia, también se aprecian colonias en pase 1, lo cual no sucede en la situación control, mientras que las colonias obtenidas con los compuestos reprogramadores en hipoxia muestran un tamaño más reducido tras el primer pase y también una mayor diferenciación tras el pase 3.



## *Discusión*

En este estudio se han puesto de manifiesto diversos procesos celulares y rutas de señalización implicados en la reprogramación celular de las PGCs. Entre estos procesos se encuentran el metabolismo energético, los niveles de Oct4, la autofagia mediada por Sirt1, la señalización mediante la isoforma  $\epsilon$  de la PKC, las rutas de señalización de Akt y Gsk3 $\beta$  y la acetilación y la metilación de histonas. La alteración del metabolismo energético, la activación de Sirt1, la inhibición de Prkce y el mantenimiento de las histonas acetiladas son capaces de inducir pluripotencia *in vitro*, tal y como muestran los experimentos de cuerpos embrioides. Por su parte, la alteración del flujo glicolítico, la activación de la ruta de Akt, la inhibición de Gsk3 $\beta$  y el mantenimiento de la metilación de histonas probablemente consiguen una mayor proliferación de las células reprogramadas por la hipoxia y mantienen la expresión de Nanog.

Además, los compuestos reprogramadores en normoxia inducen un fenotipo similar al obtenido en la reprogramación mediante hipoxia, caracterizado por la expresión de HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$  y Nanog y por una menor actividad mitocondrial. Además, todos ellos menos la actuación sobre Prkce también provocan una expresión más heterogénea de Oct4.

Además, 5 de los 8 compuestos utilizados son capaces de dar lugar a colonias positivas para c-Myc, si bien es cierto que no consiguen inducir la expresión de Klf4. Este dato es de especial relevancia, ya que las colonias obtenidas mediante el cultivo únicamente en hipoxia son negativas para c-Myc y este gen está implicado en la progresión del ciclo celular. Es probable que el mayor número de células reprogramadas al cultivar las PGCs en presencia de VPA, CHIR, Traniil, DASA y SC79 esté causada por la expresión de c-Myc, aunque ello no sea suficiente para alcanzar la capacidad de autorrenovación ilimitada y que esto guarde relación con la ausencia de Klf4. Todo esto explicaría el no haber conseguido obtener un cultivo celular a largo plazo en ninguna de las condiciones experimentales ensayadas.

### **La reprogramación de las PGCs muestra una predominancia del metabolismo glicolítico sobre el oxidativo manteniendo una cierta bivalencia**

En esta tesis se muestra que el cultivo de PGCs en hipoxia conduce a un mayor porcentaje de células con las mitocondrias inactivas y al bloqueo de la fosforilación oxidativa mediante la fosforilación de PDH, reacción catalizada por la PDK1. Teniendo en cuenta que PDK1 es una diana directa de HIF1, parece lógico pensar que la expresión de HIF1 $\alpha$  que se aprecia en el cultivo de PGCs en hipoxia conduce a una inhibición del metabolismo mitocondrial en una situación en la que hay una cantidad de oxígeno sensiblemente inferior (Kim et al., 2006; Papandreou et al., 2006). Esta observación hecha en primer lugar comparando la normoxia y la hipoxia, fue después puesta de manifiesto también para los 4 compuestos reprogramadores en normoxia (DCA, Resv,

PIP y VPA), lo cual muestra que la reprogramación de PGCs va acompañada de una inactivación del metabolismo oxidativo en la que HIF1 $\alpha$  juega un papel esencial. En concreto, resulta llamativo que, a pesar de lo variadas que son las rutas modificadas mediante los compuestos reprogramadores, todas confluyen en la activación de HIF1 $\alpha$  y en la inactivación mitocondrial. Sin embargo, el hecho de que el uso de la antimicina A (inhibidor del complejo III mitocondrial) no muestre un efecto sobre la reprogramación y que el CCCP (desacoplador del gradiente de protones mitocondrial) sea tóxico, pone de manifiesto que las PGCs en normoxia no son capaces de desviar completamente su metabolismo hacia la glicolisis y necesitan mantener una cierta bivalencia. El uso de antimicina A ha mostrado contribuir a consolidar el estado pluripotente de ESCs humanas aumentando los niveles de Nanog (Varum et al., 2009). Nuestra observación podría ser indicativa, una vez más, de que la reprogramación de PGCs conseguida con estos compuestos es únicamente parcial y que el metabolismo oxidativo sigue siendo de algún modo necesario para las PGCs aunque su reprogramación pase por adquirir un fenotipo más glicolítico. Es posible que la presencia de oxígeno a concentración atmosférica no permita el proceso de reprogramación metabólica y que el desvío forzado hacia la glicolisis no consiga satisfacer el requerimiento energético de las PGCs. Sin embargo, conviene recordar que, como se ha mencionado en la introducción, las ESCs humanas naive son más dependientes del metabolismo oxidativo que las ESCs humanas “primadas”, teniendo estas últimas una menor capacidad pluripotente (Takashima et al., 2014). Podría haber por tanto diferencias en lo relativo a la eficiencia de reprogramación según el perfil metabólico y la plasticidad a la reprogramación metabólica según se parta de células OXPHOS (como en el caso de la inducción de iPSCs) o de un cultivo primario de células embrionarias menos diferenciadas (como en nuestro caso). De hecho, las células que se encuentran en un estado más primitivo resultan más fáciles de reprogramar, como es el caso de las NPCs (Eminli et al., 2008; Kim et al., 2009).

En este contexto, resulta sorprendente que el DCA, que inhibe a la PDK1, diana de HIF1 $\alpha$ , produzca la reprogramación de las PGCs; más aún después de haber observado que la reprogramación hacia hiEGLs tiene como uno de sus pasos la inhibición de la PDH mediante la PDK1, es decir, el paso contrario al mecanismo de acción del DCA. De hecho, la mera introducción de los genes reprogramadores clásicos OSKM tiene como resultado un aumento en la expresión de PDK1 (Prigione et al., 2014). Abundan en la bibliografía ejemplos de cómo el DCA provoca un viraje en el perfil metabólico, dando preponderancia al metabolismo oxidativo frente al glicolítico, y cómo este hecho influye en la diferenciación de células pluripotentes o en la disminución de la eficiencia en la obtención de iPSCs, así como en la apoptosis de células cancerosas que hacen descansar su metabolismo en la glicolisis (Bonnet et al., 2007; Vander

Heiden et al., 2009; Folmes et al., 2011; Morfouace et al., 2014). Repasando cuidadosamente los resultados obtenidos para el cultivo en presencia de DCA, se aprecia que el uso de una dosis de 500 $\mu$ M tiene los efectos esperados de inhibición de la reprogramación. Sin embargo, al disminuir la concentración a 50 $\mu$ M se aprecia el efecto contrario en normoxia. Dado que en las colonias generadas en presencia de DCA a 50 $\mu$ M la inmunofluorescencia muestra que la PDH esta inactivada, la conclusión más plausible es que a esa concentración el DCA no esté actuando a nivel de la PDK1 y esté ejerciendo algún otro efecto que resulta decisivo en la reprogramación de PGCs. De hecho, no todos los tipos celulares son igual de sensibles a la acción del DCA. Por ejemplo, las células troncales del cáncer (CSCs) de glioma son sensibles al DCA, mostrando un cambio hacia un perfil metabólico oxidativo que induce su diferenciación e incluso muerte, mientras que las células troncales neurales (NSCs) no muestran este comportamiento (Morfouace et al., 2012; Morfouace et al., 2014). En este sentido, el DCA promueve la proliferación de células de neuroblastoma en un modelo de xenotransplante en ratón (Feuerecker et al., 2015).

Por otro lado, la reprogramación metabólica inactivando las mitocondrias en respuesta a los bajos niveles de oxígeno protege a las células de la generación de ROS, que se generan en la mitocondria como resultado de la fosforilación oxidativa (Cairns et al., 2011). Es conocido que las células pluripotentes en general tienen reducidos sus niveles de ROS, evitando así el daño oxidativo (Armstrong et al., 2010) e incluso que la presencia de ácido ascórbico en el medio de cultivo aumenta la eficiencia de la inducción de iPSCs utilizando OSK y OSKM, mientras que el resveratrol no mostró ningún efecto (Esteban et al., 2010).

Nuestros resultados cuadran con esta línea de pensamiento, ya que las PGCs cultivadas en normoxia presentan ROS, mientras que las PGCs cultivadas en hipoxia, no. Sin embargo, la eliminación de las ROS no es suficiente para inducir la reprogramación de las PGCs, como muestran nuestros experimentos en presencia de ácido ascórbico, una de las sustancias antioxidantes por antonomasia. Por lo tanto, la eliminación de las ROS parece ser un factor que contribuye a mejorar la supervivencia de las PGCs en hipoxia. Volviendo a los resultados de DCA, este compuesto puede incrementar los niveles de ROS al derivar hacia el metabolismo oxidativo y ello puede influir sobre la diferenciación de células T de forma independiente de la actividad de PDK y dependiente de los ROS (Bonnet et al., 2007; Makita et al., 2016). Podría ser que estas moléculas jugaran un papel en PGCs. El hecho de que el DCA re programe a baja concentración y en las primeras horas de cultivo podría significar que DCA induce una pequeña y transitoria elevación de ROS que estabiliza a HIF1 $\alpha$ . Posteriormente, HIF1 $\alpha$  induciría una reprogramación metabólica que se aprecia en la PDH inactivada, en la cantidad de mitocondrias inactivas y,

probablemente, en una disminución de ROS, tal y como se observó en las hiEGLs (López-Iglesias, Alcaina et al., 2015) y como observaron otros autores en células de carcinoma mamario (Zhao et al., 2014). En la reprogramación de fibroblastos humanos, justo antes del pico de HIF1, se observa una elevación de ROS a los dos días del proceso de reprogramación. Esta elevación produce un aumento en la expresión de nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (NRF2), un regulador maestro de la respuesta a ROS que promueve el cambio metabólico desde OXPHOS a glicolisis a través de HIF1 (Hawkins et al., 2016). Según esta teoría, apoyada por el hecho de que el ácido ascórbico no induce una reprogramación de las PGCs, parece poco probable que el resveratrol ejerza su efecto reprogramador mediante sus propiedades antioxidantes y que su mecanismo de acción sea promoviendo la autofagia, quizá mediante la inhibición de mTOR (Park et al., 2016).

### **El flujo glicolítico contribuye a la reprogramación en hipoxia pero no en normoxia**

Uno de los pasos más importantes de la glicolisis es el paso de fosfoenol piruvato (PEP) a piruvato y ATP, catalizado por la piruvato kinasa (PK). La importancia de esta reacción radica en que es la última de la glicolisis y en su carácter irreversible. La PK tiene 4 isoformas: L, R, M1 y M2. Mientras que las tres primeras forman tetrámeros estables, PKM2 es capaz de fluctuar entre una forma dimérica menos activa y otra tetramérica más activa, además de ser la única capaz de regularse alostéricamente (Mazurek et al., 2005; Mazurek, 2011), y es un regulador crucial del metabolismo de células embrionarias y tumorales (Christofk et al., 2008). Estas células proliferantes establecen un equilibrio entre ambas formas de acuerdo a sus necesidades metabólicas, favoreciendo un flujo glicolítico menor si se requieren metabolitos intermedios que puedan ser utilizados en rutas biosintéticas necesarias para la proliferación (Luo y Semenza, 2012; Gui et al., 2013; Wong et al., 2013).

Aparte de su rol metabólico, la forma dimérica puede desempeñar otras funciones como la interacción con Oct4 o HIF1 y actuar como coactivador de la transcripción (Lee et al., 2008; Luo et al., 2011). De igual manera, tanto Oct4 como HIF1 pueden inducir la expresión de PKM2 y la sobreexpresión de esta enzima puede mantener el estado desdiferenciado de ESCs en ausencia de LIF (Luo et al., 2011; Kim et al., 2015).

El compuesto utilizado en nuestros estudios para manipular la PKM2, DASA, favorece la activación de PKM2 impidiendo la disociación del tetrámero. Nuestros resultados muestran que un aumento del flujo glicolítico no promueve la reprogramación en normoxia, mientras que hace sinergia con la hipoxia. Dado que uno de los inductores de la expresión de PKM2 es HIF1, es probable que la ausencia de HIF1 $\alpha$  en normoxia sea la causante de que no haya PKM2 en este

contexto o que haya bajos niveles, haciendo imposible la activación del flujo glicolítico actuando sobre esta enzima. En cambio, en hipoxia es probable que sí haya PKM2, ya que tanto HIF1 como PPAR $\gamma$  pueden inducir su expresión (Luo et al., 2011; Panasyuk et al., 2012), y por esta razón un mayor flujo glicolítico sí conduzca a un mayor número de células reprogramadas. De hecho, se ha visto que la expresión de PKM2 es significativamente inferior en hESCs cultivadas en 20% de oxígeno en comparación con las mismas células cultivadas en 5% de oxígeno (Christensen et al., 2015).

Sin embargo, es llamativo que el efecto reprogramador se aprecie desplazando a PKM2 hacia su forma tetramérica, ya que la acción coactivadora de la transcripción la ejerce en su forma dimérica. La explicación podría radicar en que el desplazamiento hacia la forma tetramérica, además de inducir un mayor flujo glicolítico, disminuya la transcripción mediada por Oct4. En este sentido, cabe recordar que las PGCs que se reprograman hacia hiEGLs presentan unos niveles bajos de Oct4 y que tanto las hiEGLs como las PGCs en presencia de los compuestos reprogramadores DCA, Resv, PIP y VPA muestran durante su reprogramación una desregulación en los niveles de Oct4. La prevalencia de la forma tetramérica podría contribuir a consolidar una baja actividad de Oct4 que haga sinergia con la hipoxia y consiga un mayor número de células reprogramadas. En este sentido, el DCA podría jugar también un papel secuestrando a Oct4 y manteniendo bajos sus niveles, ya que se ha descrito que en presencia de DCA se detecta una mayor cantidad de Oct4 coprecipitado junto con PKM2 (Morfouace et al., 2014).

### **La autofagia es necesaria para la reprogramación de PGCs**

Se ha demostrado que la autofagia es necesaria durante el proceso de obtención de iPSCs, aunque existen discrepancias acerca de qué ruta es la esencial para la inducción de pluripotencialidad. Por un lado, se ha descrito que en los primeros días de la reprogramación hay una sobreexpresión transitoria de Sox2 que desencadena la autofagia a través de la ruta canónica, con Atg5 y LC3-II como sus componentes principales. De hecho, la inducción de pluripotencialidad en células sin Atg5 mostró un bloqueo de la reprogramación (Wang et al., 2013). Sin embargo, otro estudio argumenta que este bloqueo puede ser rescatado aumentando la expresión de OSKM y que la vía realmente esencial opera mediante un mecanismo independiente a Atg5, que es dependiente de las moléculas Rab9 y Syntaxina7, que puede inducirse mediante la activación de AMPK y que autofagocita retículo endoplásmico y mitocondrias (Nishida et al., 2009; Ma et al., 2015).

En nuestro caso, las PGCs y el modelo de reprogramación elegido comparten varias características con estas dos rutas. En primer lugar, tanto las PGCs como las hiEGLs son positivas

para Sox2, factor necesario para la inducción de autofagia. En segundo lugar, la hipoxia inhibe al complejo mTORC1 activando a la AMP-Kinasa (AMPK) debido a los bajos niveles de ATP resultantes de la dependencia glicolítica, mucho menos eficiente energéticamente que la OXPHOS. AMPK, que además se encuentra activa por acción de la forskolina añadida al medio, fosforila a los factores TSC2 y Raptor, inhibiendo la actividad del complejo (Liu et al., 2006). Cabe recordar que la inducción de iPSCs requiere una disminución en los niveles de mTOR en las primeras fases del proceso (Ma et al., 2015). Por lo tanto, mientras que la inhibición de mTOR puede hacer más fácil la actividad autofágica en hipoxia, dicha inhibición podría suponer un freno al crecimiento celular y, por tanto, a la proliferación (Hochachka y Lutz, 2001). Esta podría ser otra de las razones detrás de que las hiEGLs no muestren capacidad de autorrenovación.

Además, HIF1 $\alpha$  induce la expresión de Bnip3, que inhibe la actividad mTORC1 al unirse y secuestrar a Rheb, activador de mTOR. Como consecuencia, Bnip3 es capaz de activar la autofagia (Li et al., 2007). Nuestros resultados muestran una elevada inducción de Bnip3 por la hipoxia, lo cual contribuiría a la inhibición de mTOR y a la inducción de autofagia. Efectivamente, la interrupción de la autofagia mediante el uso de cloroquina en nuestros cultivos disminuyó significativamente el número de células reprogramadas. De modo análogo a lo que sucede en iPSCs, es lógico que el estrés energético y la reprogramación metabólica que sufren las PGCs al cultivarlas en hipoxia conduzca a un reaprovechamiento de estructuras celulares para adaptarse al nuevo ambiente, así como la eliminación de orgánulos inactivos como las mitocondrias mediante el proceso de autofagia selectiva denominado mitofagia, cuya reestructuración va acompañada de una menor producción de ROS y es una importante respuesta adaptativa que evita la muerte celular (Prigione et al., 2010; Rikka et al., 2011). La importancia de la mitofagia en la adaptación celular queda de manifiesto cuando en células que sobreexpresan Bnip3 se inhibe la autofagia y, como resultado, las células mueren, incapaces de desarrollar su respuesta protectora (Rikka et al., 2011).

Por otro lado, ya se ha hablado en el apartado anterior de la importancia de PPAR $\gamma$  como inductor de la expresión de PKM2 en hipoxia. En lo relativo a la autofagia vuelve a ser importante mencionar a PPAR $\gamma$ , ya que su mera activación muestra capacidad para inducir autofagia (Zhou et al., 2009). Sus niveles son sensibles a la concentración de oxígeno, ya que es una diana directa de HIF1 (Krishnan et al., 2009). A su vez, PPAR $\gamma$  puede inducir la expresión de distintos genes, entre los que destacan HIF1 $\alpha$ , PDK y Bnip3 (Zhou et al., 2009). El aumento de PPAR $\gamma$  en PGCs en hipoxia, que va acompañado de un aumento en la expresión de Bnip3, de un aumento en la actividad PDK y de la presencia de HIF1 $\alpha$  parece establecer un eje que fija un perfil metabólico acompañado de la inducción de autofagia y mitofagia con el fin alcanzar una adaptación a la

hipoxia. Esto iría en concordancia con la observación de que HIF1 $\alpha$  es necesario para la autofagia en hipoxia, también para la inducida por PPAR $\gamma$  (Bellot et al., 2009; Zhou et al., 2009).

En este estudio se utilizaron dos inductores de la autofagia: la espermidina y el resveratrol. Ambos han mostrado facilitar la generación de iPSCs humanas y de ratón (Chen et al., 2011). Nuestros resultados mostraron que el uso de la espermidina no induce la reprogramación de PGCs, mientras que el resveratrol sí muestra un efecto positivo. La explicación podría radicar en que ambos compuestos inducen la autofagia a través de rutas distintas. La espermidina ejerce su efecto inhibiendo a la acetilasa EP300, interrumpiendo por tanto la acetilación de LC3. Por su parte, el resveratrol ejerce su efecto mediante la activación de Sirt1, una deacetilasa dependiente de NAD<sup>+</sup> (Morselli et al., 2011; Pietrocola et al., 2015). Tanto EP300 como Sirt1 deacetilan a Atg5, Atg7 y LC3 (Lee et al., 2008; Lee y Finkel, 2009), lo cual hace pensar que la ruta canónica dependiente de Atg5 y LC3 no estaría implicada en la reprogramación de PGCs. Dado que Sirt1 es capaz de deacetilar a forkhead box O3 (FOXO3), lo cual puede inducir la expresión de genes proautofágicos como Bnip3 (Kume et al., 2010), y que este efecto ha sido observado en células de rata diabéticas, es probable que el resveratrol esté ejerciendo su efecto mediante esta ruta (Ma et al., 2016), o quizá mediante la inhibición que el resveratrol ejerce sobre mTOR (Park et al., 2016). Dado que el cultivo en presencia del antioxidante ácido ascórbico no fue suficiente para inducir la reprogramación de las PGCs, cabe pensar que el resultado positivo obtenido con el resveratrol no se debe a sus conocidas propiedades antioxidantes, siendo capaz de secuestrar radicales libres directamente o de inducir la expresión de la superóxido dismutasa mitocondrial (Hung et al., 2002; Valdecantos et al., 2010). Además, Sirt1 puede deacetilar p53, disminuyendo su actividad, y esta inactivación podría ser decisiva o al menos contribuir a la hora de conseguir una mayor reprogramación (Kim et al., 2007). Nuestros resultados mostraron que p53 mantenía una expresión prácticamente idéntica en hipoxia en relación con la normoxia. Sin embargo, dada la cantidad de modificaciones postraduccionales que sufre esta proteína podría ser que su deacetilación fuera un factor más en el efecto reprogramador del resveratrol.

Durante la reprogramación celular se ve favorecida la fisión mitocondrial, que está regulada a nivel de Drp1 y que favorece el proceso de mitofagia (Guido et al., 2012; Mao et al., 2013). Sin embargo, la fisión mitocondrial no parece ser un proceso importante en la reprogramación de PGCs. Nuestros experimentos utilizando mdivi-1, el inhibidor de Drp1, no tuvieron ningún efecto sobre la reprogramación de las PGCs. Es posible que la fisión mitocondrial tenga un papel importante en los protocolos convencionales de obtención de iPSCs, donde se parte de células diferenciadas con mitocondrias grandes con crestas mitocondriales desarrolladas. En este caso,



parece lógico pensar que la maquinaria mitofágica se ve incapaz de englobar toda esa estructura mitocondrial y necesita disminuir la superficie a fagocitar mediante la fisión mitocondrial. Sin embargo, las PGCs de 8.5dpc, aunque tengan su destino germinal especificado, siguen siendo células embrionarias y no poseen esas estructuras mitocondriales desarrolladas, sino mitocondrias pequeñas. Por ello, es probable que la inducción de la mitofagia gobernada por Bnip3 no requiera de la fisión mitocondrial.

### **La inhibición de la translocación de PKC $\epsilon$ induce la reprogramación de las PGCs**

Nuestros experimentos muestran que la liberación de calcio desde el retículo endoplásmico es tóxica para las PGCs, mientras que la retirada del calcio intracelular no ejerce un efecto sobre la reprogramación. Dado que otros transductores de señales dependientes de calcio no mostraron variaciones especialmente reseñables en su expresión y que la inhibición de las PKCs resultó en una reprogramación significativamente superior de las PGCs, nuestro estudio se centró en la acción de las PKC no clásicas, que no dependen del calcio. Se estudió la expresión y la manipulación de la isoforma  $\epsilon$ , cuya inhibición indujo de hecho la reprogramación de PGCs.

PKC $\epsilon$  se ha relacionado tradicionalmente con una mejor protección celular frente a hipoxia/reoxigenación tras procesos de isquemia-reperfusión en corazón y cerebro (Gray et al., 2004; Jain y Basu, 2014). También se ha descrito su implicación en la supervivencia celular activando Akt y en la inhibición de la apoptosis (Basu y Sivaprasad, 2007). Por otro lado, su sobreexpresión se detecta en varios tipos tumorales y se asocia a procesos de transformación, agresividad tumoral, proliferación o mantenimiento de la potencialidad, entre otros (Gorin y Pan, 2009; Liu et al., 2010; Jain y Basu, 2014). De entre todas sus funciones, llama especialmente la atención que PKC $\epsilon$  regule al factor Nanog, fosforilándolo y favoreciendo su localización nuclear y su estabilidad (Bourguignon et al., 2009; Xie et al., 2014). PKC $\epsilon$  también es capaz de inducir la expresión de PKM2 a través de la ruta NF- $\kappa$ B (Yang et al., 2012).

A pesar de todas estas evidencias en ese sentido, en este estudio fue la inhibición de la translocación de PKC $\epsilon$  lo que dio como resultado un aumento en la reprogramación de PGCs, mientras que su activación mediante FR236924 no mostró efecto alguno. Este resultado es llamativo, ya que lo esperable sería que la inhibición de la translocación impidiera la activación de PKC $\epsilon$  mediante la unión a DAG en membrana. Por lo tanto, esta inhibición debería impedir la estabilidad de Nanog y conducir hacia un estado diferenciado e impedir la inducción de la expresión de PKM2, lo cual supondría una barrera a la reprogramación, mientras que el resultado obtenido es justo el contrario.

Considerando los estudios mencionados anteriormente y que la hipoxia crónica parece inducir el silenciamiento del gen *Prkce* (Lawrence et al., 2011), una posible explicación es que la inhibición de *Prkce* deje disponible una mayor cantidad de proteínas adaptadoras a otras isoformas. De esta manera, otras PKCs nuevas distintas a *Prkce* dispondrían de más diacilglicerol en membrana para ejercer su función. Sin ir más lejos, se ha descrito que la delección de la enzima PKC $\lambda/\iota$  provoca la diferenciación de ESCs de ratón (Mahato et al., 2014). Así, las PKCs atípicas, no reguladas por calcio ni por DAG, como la isoforma  $\lambda/\iota$ , podrían ver también potenciada su acción y ejercer su efecto desdiferenciador.

Otra explicación podría ser que el péptido inhibitor utilizado tenga algún tipo de reactividad cruzada con la isoforma  $\lambda/\iota$  y se produzca una inhibición de esta isoforma que conduzca a un mayor número de células reprogramadas. Esta teoría podría verse apoyada por el hecho de que la disminución de la actividad de PKC $\lambda/\iota$  también puede favorecer la reprogramación metabólica hacia la glicolisis, la estabilización de HIF1 $\alpha$  y el estado pluripotente (Mahato et al., 2014). Incluso existe evidencia de que la inhibición de PKC $\lambda/\iota$  conduce a una mayor eficiencia en la obtención de células pluripotentes y multipotentes (Mah et al., 2015).

Será necesario un mayor número de experimentos comprobando a qué isotipo corresponde la inhibición generada incorporando ensayos de actividad para el resto de PKCs o inhibiendo específicamente cada isoforma por otros métodos.

### **Varias modificaciones epigenéticas son capaces de reprogramar las PGCs y de aumentar su proliferación**

Las células elegidas en este estudio fueron PGCs de embriones de ratón de 8.5 dpc, que, en este momento del desarrollo, están inmersas en una profunda reprogramación epigenética con el fin de eliminar la impronta y de avanzar en la especificación hacia la línea germinal. Concretamente, a 8.5dpc, las PGCs reducen las marcas H3K9me2 en histonas y la metilación a nivel de DNA, modificaciones represoras en ambos casos (Seki et al., 2007; Saitou y Yamaji, 2010). Además, se aprecia un aumento de la marca represora H3K27me3 (Seki et al., 2007).

Se ha descrito que el modificador epigenético TSA puede sustituir al bFGF en la reprogramación de PGCs hacia EGCs (Durcova-Hills et al., 2008). Por otra parte, se ha conseguido la reprogramación de fibroblastos hacia iPSCs utilizando únicamente factores solubles, y varios de los compuestos que formaban parte del cóctel fueron modificadores epigenéticos (Hou et al., 2013).

En nuestro estudio, se examinó en primer lugar la expresión de tres enzimas implicadas en la remodelación del estado de la cromatina: *Ehmt1*, *Ehmt2* y *Jmjd3*. En el momento en el que nuestras PGCs son aisladas, está teniendo lugar una represión de *Ehmt1* y *Ehmt2*, encargadas de metilar la lisina 9 de la histona H3, lo cual conduce a una progresiva pérdida de la marca represora H3K9me2 (Seki et al., 2007; Saitou y Yamaji, 2010). Nuestros resultados no muestran apenas variación en la expresión de estas dos enzimas, indicando que quizá las hiEGLs mantienen un cierto nivel de la marca H3K9me2 en comparación con las PGCs.

En cuanto a *Jmjd3*, esta es una enzima encargada de eliminar las marcas H3K27me2 y H3K27me3. Una vez que las PGCs se especifican y comienzan a progresar en el desarrollo, *Blimp1* actúa como regulador maestro e induce la expresión de *Jmjd3* (Günesdogan et al., 2014). Una vez más, no apreciamos el cambio en la expresión que sería esperable atendiendo al desarrollo de las PGCs, lo cual vuelve a apuntar en la dirección de que las hiEGLs alteran la reprogramación epigenética a nivel de la metilación de la histona 3. Dado que *Jmjd3* es una diana de *Blimp1* y este regulador vio disminuida su expresión en hipoxia, parece probable que la disminución de *Blimp1* es un evento importante que conduce a la alteración de las modificaciones epigenéticas que sufren las PGCs. Cabe pensar que el cambio en el patrón de metilación de la histona 3 influye en el reclutamiento de proteínas que reconocen esa marca y en la activación o represión de la transcripción.

Además, en este estudio se utilizó un inhibidor de *Ezh2*, el DZNep. *Ezh2* forma parte del complejo represor Polycomb 2 (PRC2), que actúa añadiendo grupos metilo a la lisina 27 de la histona 3 y al DNA (Seki et al., 2007). Ambas modificaciones resultan en una represión de la transcripción y, en concreto, H3K27me3 es una marca que, a 8.5 dpc, las PGCs están empezando a incorporar (Saitou y Yamaji, 2010). Sin embargo, nuestros experimentos muestran que el cultivo de PGCs en presencia de DZNep, tanto en normoxia como en hipoxia, no afecta a la reprogramación de las mismas. No parece por tanto que esta marca epigenética tenga un papel en la reprogramación de las PGCs por hipoxia. Ni *Jmjd3*, la enzima encargada de eliminarla, muestra una variación en su expresión, ni la inhibición de la proteína encargada de añadirla produce un efecto sobre las PGCs. Tampoco afecta a la reprogramación la interrupción de la metilación a nivel de DNA que lleva a cabo PRC2. Parece curioso que la inhibición de una de las principales marcas represoras no juegue un papel en la reprogramación de PGCs, ya que se ha observado que la inhibición del complejo Polycomb resulta en una disminución de la eficiencia en la obtención de iPSCs, probablemente debido a la necesidad de disponer de este complejo para reprimir el programa somático (Onder et al., 2012). En el caso de las PGCs, el hecho de que la inhibición de *Ezh2* no afecte a la reprogramación podría explicarse porque alrededor de 8 dpc,

las PGCs sufren una demetilación global del DNA que se mantendrá hasta etapas posteriores gracias a la represión de las metil transferasas de DNA Dnmt1, Dnmt3a y Dnmt3b (Seki et al., 2005; Yabuta et al., 2006; Seki et al., 2007). Por lo tanto, la posible influencia de la metilación del DNA sobre la reprogramación de las PGCs podría quedar enmascarada por el momento epigenético que atraviesan. Además, las PGCs, desde su especificación, tienen reprimido el programa somático, y quizá no dependan de su silenciamiento para reprogramarse, como sucede en el caso de las iPSCs (Onder et al., 2012), lo cual podría verse corroborado por el hecho de que las hiEGLs muestran unos niveles de Ezh2 más bajos que las EGCs y las ESCs (López-Iglesias, Alcaina et al, 2015).

En este estudio se utilizó también un inhibidor de la demetilasa de histonas Kdm1a, que actúa retirando los grupos metilo de las lisinas 4 y 9 de la histona 3. Este compuesto, la tranilcipromina, no mostró ningún efecto en normoxia, pero si indujo un mayor número de células reprogramadas en hipoxia. Una vez más, esta situación podría ser explicada recurriendo a Blimp1, que aparte de ser una molécula esencial en PGCs, también es de vital importancia en los linfocitos B. En este contexto, se ha descrito que Kdm1a está implicada en la represión génica orquestada por Blimp1 (Su et al., 2009). Trasladándolo a nuestro modelo experimental, parece probable que la represión incompleta de Blimp1 apreciada en hiEGLs esté manteniendo en parte un programa epigenético en el cual colabora Kdm1a. Al inhibir a esta enzima, se conseguiría una mayor reprogramación que se manifiesta en un mayor número de células reprogramadas. Es de especial relevancia que la tranilcipromina inhiba a Kdm1a, que también tiene entre sus blancos la marca H3K4me, que cuando está trimetilada favorece el crecimiento celular e impide la diferenciación (Shyh-Chang et al., 2013). Entra dentro de lo posible que el mecanismo de acción de la tranilcipromina en hiEGLs sea mantener esa marca, conduciendo a una mayor proliferación y a una menor diferenciación.

También se analizó el posible efecto de la acetilación de histonas sobre la reprogramación de PGCs. Esta modificación afecta a la expresión génica mediante la alteración de la estructura de la cromatina. La adición de un grupo acetilo a un residuo de lisina neutraliza la carga positiva del aminoácido e interrumpe la interacción entre la histona y el DNA. Como resultado, la cromatina queda en un estado más abierto que permite el acceso de la maquinaria enzimática que dispara la transcripción. Para evaluar el efecto de la deacetilación de histonas se utilizaron dos compuestos: el butirato sódico (NaB) y el ácido valproico (VPA). A pesar de que ambos compuestos son inhibidores de las deacetilasas de histonas y, por tanto, mantendrían la cromatina en un estado más abierto, únicamente el VPA en condiciones de normoxia mostró un efecto significativamente positivo sobre la reprogramación. La primera conclusión es que la

inhibición de la acetilación de histonas interviene en la reprogramación de PGCs. La falta de especificidad de los inhibidores de las HDACs hace difícil hipotetizar qué deacetilasas podrían estar involucradas, más aún cuando tanto butirato como el valproato pertenecen al mismo grupo de inhibidores: los ácidos grasos de cadena corta. En cualquier caso, el mantenimiento de la cromatina en un estado más abierto y más accesible a factores de transcripción, parece favorecer la reprogramación de PGCs. A estos resultados con VPA hay que sumar los obtenidos en iPSCs, donde VPA mostró ser capaz de mejorar sustancialmente la obtención de iPSCs (Huangfu et al., 2008), disminuyendo la senescencia de las células reprogramadas y contribuyendo a obtener un mayor número de clones (Chen et al., 2016).

### **Las PGCs reprogramadas con DCA, Resv, PIP y VPA comparten el patrón de expresión de HIFs con las hiEGLs**

Las células obtenidas tras el cultivo en presencia de DCA, Resv, PIP y VPA son capaces de alcanzar pluripotencia *in vitro*, tal y como lo hicieron las hiEGLs con la hipoxia. Del mismo modo, tanto las células reprogramadas con DRPV como las hiEGLs muestran una expresión de HIF similar.

Todas las células reprogramadas muestran un patrón temporal en el que ya en el primer día de cultivo es detectable HIF1 $\alpha$ , y dicha expresión se alarga hasta aproximadamente el sexto día de cultivo, momento en el cual comienzan a aparecer colonias negativas para dicho factor. Por su parte, las PGCs en condición de normoxia no muestran expresión de HIF1 $\alpha$  en ningún momento. El hecho de que únicamente las células reprogramadas sean positivas para HIF1 $\alpha$  apunta en la dirección de que este factor es indispensable en el proceso de reprogramación de las PGCs. De hecho, en el contexto de la obtención de iPSCs mediante OSKM, este proceso es interrumpido si HIF1 $\alpha$  está ausente (Prigione et al., 2014). En línea con lo expuesto, la expresión ectópica de HIF1 $\alpha$  a lo largo del proceso de reprogramación promueve la formación de colonias de iPSCs (Mathieu et al., 2014). En nuestro modelo experimental, HIF1 $\alpha$  parece ser esencial tanto para la supervivencia de las PGCs en hipoxia como para su reprogramación. Inevitablemente, este hecho apunta a que la adaptación de las PGCs a la hipoxia conlleva una reprogramación metabólica hacia el metabolismo glicolítico y la remodelación mediante la autofagia. No en vano, todos los cultivos en normoxia en presencia de DCA, Resv, PIP y VPA convergen en la presencia de HIF1 $\alpha$  tras las primeras 24 horas y en un perfil mitocondrial a los 5 días de cultivo donde predominan las mitocondrias inactivas. Este perfil glicolítico correlaciona una vez más con el hecho de que la mera introducción de OSKM para la obtención de iPSCs conlleva un aumento en la expresión de PDK1 (Prigione et al., 2014), de la que ya se ha discutido su papel esencial en la regulación metabólica. Los datos muestran que el marcaje positivo para HIF1 $\alpha$  se

pierde alrededor del día 6 de cultivo. Este dato podría significar que para ese momento la reprogramación metabólica ya ha sido completada y por tanto HIF1 $\alpha$  regula a la baja su expresión. De hecho, se ha visto en ESC humanas que existe expresión de HIF1 $\alpha$  en condiciones de hipoxia, pero su expresión es de tan sólo 48 horas (Forristal et al., 2010).

En cuanto a HIF2 $\alpha$ , su expresión parece ser constitutiva en PGCs, ya que HIF2 $\alpha$  es detectable desde los primeros momentos del cultivo, incluso en las PGCs cultivadas en normoxia. Este hecho no resulta sorprendente si tenemos en cuenta que las PGCs son el único tipo celular que conserva la expresión de Oct4 en embriones de 8.5 dpc y que dicha expresión está gobernada por HIF2 $\alpha$  (Covello et al., 2006). Además, HIF2 $\alpha$  está implicado en la expresión de Sox2 y Nanog, también expresados en PGCs (Forristal et al., 2010). Nuestra observación también iría en concordancia con el hecho de que HIF2 $\alpha$  favorece la reprogramación hacia iPSCs si la sobreexpresión se produce en las primeras fases, mientras que ejerce un efecto inhibitorio si sucede en las etapas posteriores (Mathieu et al., 2014). La expresión de HIF2 $\alpha$  también se va perdiendo progresivamente, siendo patente a los 6 días de cultivo tanto en hiEGLs como en presencia de DCA, Resv, PIP y VPA. Por el contrario, en ESCs humanas es HIF2 $\alpha$  el que mantiene su expresión en el núcleo durante más tiempo, y se ha demostrado que las ESCs humanas deficientes para HIF2 $\alpha$  no son capaces de proliferar, impidiéndose su mantenimiento en cultivo (Forristal et al., 2010). Esta observación explicaría lo que sucede con las PGCs en proceso de reprogramación con los factores utilizados: pierden su expresión para HIF2 $\alpha$  y por lo tanto no se consigue su mantenimiento en cultivo. Resulta de nuevo reseñable que todas las PGCs reprogramadas a través de distintas rutas se comporten exactamente igual, sugiriendo que el nivel de reprogramación parcial adquirida sigue unas pautas compartidas en todos los casos.

Existen numerosos ejemplos en los cuales HIF1 $\alpha$  y HIF2 $\alpha$  desempeñan funciones antagónicas en un contexto determinado, ya sea por competir por coactivadores de la transcripción o por estimular la expresión de genes con funciones distintas. En estos casos, el balance entre HIF1 $\alpha$  y HIF2 $\alpha$  se revela como un aspecto esencial de la regulación del proceso en cuestión. En PGCs, desde los primeros momentos del cultivo hay expresión de HIF2 $\alpha$  constitutiva, y en las condiciones de reprogramación se induce la expresión de HIF1 $\alpha$ . Este pico de expresión de HIF1 $\alpha$  podría desplazar progresivamente la acción de HIF2 $\alpha$  y, cuando HIF1 $\alpha$  finaliza su reprogramación metabólica, las células reprogramadas son incapaces de restaurar esa expresión de HIF2 $\alpha$ . De esta forma, las células reprogramadas no son capaces de mantenerse en cultivo.

Cabe recordar que la expresión de Oct4 en PGCs depende de HIF2 $\alpha$  (Covello et al., 2006) y que únicamente las PGCs con Oct4 bajo son las que entran en reprogramación. Además, tal y como

muestran los microarrays, las PGCs muestran niveles más altos de Oct4 que las hiEGLs y las EGCs (López-Iglesias, Alcaina et al., 2015). Esta observación podría entroncar con la hipótesis expuesta: en aquellas células donde se induce la expresión de HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$  es desplazado y, como consecuencia, presentan un nivel bajo de Oct4. Los niveles de Oct4 también podrían respaldar esta teoría: las PGCs en normoxia muestran un perfil muy claro con dos poblaciones en lo que a niveles de Oct4 se refiere. Paulatinamente irán perdiendo la expresión de HIF2 $\alpha$ , mostrando un perfil donde quedan células con Oct4 alto y otras con Oct4 bajo. Sin embargo, en un contexto de reprogramación, la irrupción de HIF1 $\alpha$  altera de forma severa ese patrón, que se vuelve heterogéneo hasta el punto de mostrar significación estadística respecto a la normoxia en todas las situaciones menos con PIP. Es importante resaltar al respecto que nuestros resultados muestran que la estabilización de los HIFs en general mediante el uso de DMOG en normoxia establece un perfil de expresión de Oct4 significativamente diferente al de la normoxia, mientras que su inhibición en hipoxia también altera el patrón. Por lo tanto, la heterogeneidad en los niveles de Oct4 está directamente relacionada con la presencia de HIF.

#### **El cultivo de PGCs en hipoxia muestra una mayor proliferación tras la adición de CHIR, Trnil, DASA, SC79 sin llegar alcanzar la capacidad de autorrenovación ilimitada**

Antes de analizar los resultados obtenidos en lo relativo a la proliferación de las células reprogramadas, es conveniente precisar que nuestras células presentan un ciclo lento. Mientras que las PGCs tempranas doblan su número cada 5-7 horas, al abandonar el epiblasto y comenzar la migración hacia el mesodermo extraembrionario su ciclo se enlentece hasta 16 horas (Tam y Snow, 1981). Por lo tanto, es presumible que si no se alcanza una reprogramación completa, las PGCs mantengan esa baja capacidad proliferativa.

Uno de los principales sucesos que tienen lugar durante la reprogramación de PGCs a EGCs es que las PGCs pierden la expresión de sus genes característicos en las primeras fases de la reprogramación, entre ellos Blimp1 (Nagamatsu et al., 2015). Este hecho es completamente lógico: las PGCs mantendrán una pluripotencia latente en vista a las futuras gametogénesis y fertilización, pero es moderada para avanzar hacia el destino germinal. Blimp1 juega un papel en la detención del ciclo celular tras la especificación de las PGCs reprimiendo la expresión de diversos genes que promueven el avance del proceso mitótico (Kurimoto et al, 2008). Además, la mencionada disminución de Blimp1 al reprogramar con bFGF conduce a la expresión de Klf4 y c-Myc, y de genes regulados por la red de pluripotencia que veían reprimida su expresión por efecto de Blimp1 (Saitou y Yamaji, 2012, Nagamatsu et al, 2015). Blimp1 actuaría como una barrera a la pluripotencia en PGCs, reprimiendo una gran batería de genes. De hecho, la

eliminación de esta barrera realizando una delección de Blimp1 en PGCs favorece la aparición de colonias similares a las de ESCs, que tienen una elevada expresión de Klf4 y Eras (Nagamatsu et al, 2015). Nuestros resultados muestran que la disminución en la expresión de Blimp1 observada en hipoxia no es capaz por sí misma de disparar la expresión de genes como Klf4, c-Myc o Eras, probablemente debido a que Blimp1 mantiene un cierto nivel de expresión y que el programa genético de identidad de las PGCs no ha sido completamente erradicado. De aquí se deduce que o bien la hipoxia no llega a disminuir lo suficiente los niveles de Blimp1, o que la mera disminución de Blimp1 no es suficiente para alcanzar una completa inducción de pluripotencia en PGCs y que otros eventos tienen lugar durante la reprogramación de PGCs hacia EGCs mediante bFGF que no tienen lugar mediante el cultivo en hipoxia. En este sentido, los microarrays realizados en el laboratorio muestran que las hiEGLs muestran menor nivel de expresión de Klf4 y Eras que las EGCs y ESCs (López-Iglesias, Alcaina et al. 2015). Cualquiera de estas dos hipótesis podría explicar también la incapacidad para alcanzar la autorrenovación en hiEGLs, ya que como se ha mencionado anteriormente, se ha relacionado a Blimp1 con la inhibición de genes que permiten el avance en el ciclo celular.

Si a lo mencionado anteriormente añadimos que la hipoxia favorece la autorrenovación y la pluripotencia en ESCs, que aumenta la eficiencia a la hora de generar iPSCs y que mantiene a las ESCs humanas en un estado más inmaduro (Ezashi et al, 2005; Yoshida et al, 2009; Forristal et al, 2010; Lengner et al, 2010; Mohyeldin et al, 2010), parece probable que el cultivo de PGCs en hipoxia al 3% no es capaz de inducir una completa inhibición de Blimp1 o de alguno de sus efectores, lo que provoca que no se alcance una reprogramación completa.

Las hiEGLs no muestran capacidad de expansión en cultivo probablemente debido a la ausencia de expresión de Klf4 y de c-Myc (López-Iglesias, Alcaina et al, 2015). La explicación podría ser que la pérdida de HIF2 $\alpha$  impide el estableciendo completo de la red de factores implicados en la autorrenovación de las hiEGLs. De nuevo, el balance de HIF1 $\alpha$ /HIF2 $\alpha$  podría estar detrás de este resultado. Se ha descrito que HIF1 $\alpha$  y HIF2 $\alpha$  tienen efectos contrapuestos en cuanto a la expresión de c-Myc. HIF1 $\alpha$  interrumpe la expresión génica dependiente de c-Myc compitiendo por la unión de Sp1, un componente del complejo transcripcional del que forma parte c-Myc. Por el contrario, la estructura de HIF2 $\alpha$  no permite esa interacción, y c-Myc puede por tanto formar su complejo y activar la transcripción (To et al, 2006). También se ha detectado comportamiento diferencial de HIF1 $\alpha$  y HIF2 $\alpha$  en cuanto a p53. De hecho, la inhibición de p53 ha mostrado ser capaz de conseguir inducir una mejor obtención de iPSCs (Hong et al, 2009; Kawamura et al, 2009). HIF1 $\alpha$  induce una estabilización indirecta de p53 al unirse a MDM2 e inhibir su acción inhibidora sobre p53, permitiendo que ésta se acumule en el núcleo y ejerza su



función (Chen et al, 2003). Por contra, HIF2 $\alpha$  ejerce una acción inhibitoria sobre p53 y la pérdida de HIF2 $\alpha$  permite una recuperación de la actividad transcripcional de p53 (Bertout et al, 2009). Por lo tanto, podría suceder que nuestra reprogramación mediada por la hipoxia con el consiguiente pico de expresión de HIF1 $\alpha$  y la incapacidad para mantener elevados niveles de HIF2 $\alpha$  conduzca a un progresivo freno del ciclo celular mediado por p53.

Los cultivos en presencia de DCA, Resv y PIP en normoxia fueron capaces de mantener colonias hasta al menos el pase 3. Por su parte, los compuestos reprogramadores utilizados en hipoxia, junto con el ácido valproico, también fueron capaces de formar colonias más allá de pase 3, pero en estos casos sí se indujo y se detectó la presencia de c-Myc. Debido a la implicación de c-Myc en la progresión del ciclo celular, es probable que el mayor número de células reprogramadas en hipoxia en presencia de CHIR, Tranil, DASA y SC79 se deba a la presencia de este gen. Además, dado que la obtención de iPSCs puede realizarse mediante la expresión ectópica de OSKM y las PGCs ya expresan Oct4 y Sox2, el hecho de que las colonias obtenidas en hipoxia en presencia de CHIR, Tranil, DASA y SC79 sean positivas también para c-Myc puede significar que estas células estén un paso más cerca de una reprogramación completa con plena capacidad de autorrenovación. Dado que HIF2 es capaz de inducir la expresión de c-Myc y HIF2 $\alpha$  no está presente a 6 días de cultivo tanto en normoxia, normoxia en presencia de DCA, Resv, PIP y VPA e hipoxia, es probable que la sinergia obtenida entre la hipoxia y CHIR, Tranil, DASA y SC79 sea capaz de mantener durante más tiempo la expresión de c-Myc debido al mantenimiento de la expresión de HIF2 $\alpha$ , obteniéndose una mayor proliferación celular. En cualquier caso, la ausencia de Klf4 parece ser indicativa de que no se ha alcanzado una reprogramación completa en las condiciones experimentales utilizadas, lo cual se aprecia en la incapacidad de obtener cultivos a largo plazo de las células obtenidas. De hecho, los microarrays de trabajos anteriores del laboratorio muestran bajos niveles de Klf4 en comparación a EGCs y ESCs (López-Iglesias, Alcaina et al., 2015).

#### **La ruta Akt podría estar implicada en la positividad observada para c-Myc**

Uno de los efectos de la hipoxia ya comentados es que conduce a una inactivación de mTOR, implicada en crecimiento celular y proliferación. Esta proteína es uno de los efectores más importantes de la ruta PI3K/Akt, que está muy relacionada con el desarrollo de las PGCs. Entre los ejemplos más destacables de esta relación figuran que la activación de Akt favorece el estado indiferenciado de ESCs, que la ruta Akt está implicada en la transducción de señales de supervivencia inducida por el SCF, que la eliminación de PTEN (un freno de esta ruta) en ratones provoca la aparición de teratomas testiculares y que la activación de Akt sobre PGCs durante 48

horas conduce a su reprogramación hacia EGCs sin necesidad de bFGF (De Miguel et al, 2002; Kimura et al, 2003; Watanabe et al, 2006; Kimura et al, 2008). Además, Akt es capaz de impedir el silenciamiento de OSKM que induce Mdb3, cuya inhibición conduce a la reprogramación determinística hacia iPSCs (Rais et al, 2013; Nagamatsu et al, 2015). Debido a la implicación de Akt en la reprogramación de PGCs, se decidió utilizar un activador de dicha proteína, SC79, y se obtuvo una reprogramación superior en hipoxia, con colonias hasta al menos pase 3 y con positividad para c-Myc. Cabe destacar que la reprogramación hacia EGCs mediada por Akt presenta la característica de tener inhibido a p53 (Kimura et al, 2008). Es por tanto probable que la inhibición de mTOR y la incapacidad de inhibir a p53 sean dos factores importantes que explican la incapacidad de las hiEGLs de alcanzar la capacidad de autorrenovación ilimitada.

La reprogramación hacia EGCs mediante la activación de Akt *in vivo* también mostró inhibición de Gsk3 $\beta$  (Kimura et al, 2008). En nuestro estudio, la inhibición de Gsk3 $\beta$  mediante el uso de CHIR99021 mostró una reprogramación significativamente superior a la obtenida en hipoxia. Una vez más, se obtuvo el mismo fenotipo en lo relativo a la presencia de colonias hasta al menos pase 3, positividad para c-Myc y negatividad para Klf4. La inhibición de GSK3 $\beta$  favorece el mantenimiento del estado pluripotente y la autorrenovación en ESCs humanas y de ratón, advirtiéndose una mayor activación de los genes de pluripotencia T-cell factor (TCF), Rex1, Nanog y Esrrb, así como una mayor localización nuclear de  $\beta$ -catenina y de ciclina D1 (Sato et al, 2004; Martello et al, 2012). Por este motivo, es probable que la inhibición ejercida sobre GSK3 $\beta$  en hipoxia contribuya a establecer un fenotipo más pluripotente y más proclive a la proliferación celular. Además, Gsk3 $\beta$  también inhibe c-Myc (Singh y Dalton, 2009), con lo cual es lógico que la inhibición de Gsk3 $\beta$  permita una mayor proliferación a través de c-Myc.

Nuestro estudio propone un modelo basado en lo siguiente:

Las PGCs son capaces de adquirir pluripotencia gracias a la reprogramación metabólica inducida por la expresión de HIF1 $\alpha$ , que se puede alcanzar a través de la hipoxia, del aumento en los niveles de ROS, de la modificación de la cromatina hacia un estado más abierto y accesible, de la inhibición de PKC $\epsilon$  o la activación de Sirt1. El aumento de HIF1 $\alpha$  provoca que las PGCs bloqueen su metabolismo oxidativo fosforilando PDH, que inactiven sus mitocondrias y que reduzcan su masa mitocondrial a través de procesos de mitofagia mediados por Bnip3. Esta reprogramación metabólica es capaz de inducir por sí misma la pluripotencia *in vitro* de las PGCs, pero esta reprogramación no es completa, ya que las células reprogramadas no poseen capacidad de autorrenovación ilimitada. La inducción de HIF1 $\alpha$  provoca una alteración en el balance HIF1 $\alpha$ /HIF2 $\alpha$  que se manifiesta en una desregulación en los niveles de Oct4 que a su vez

promueven la pluripotencia. Una vez finalizada la reprogramación metabólica inducida por HIF1 $\alpha$ , comienza a disminuir su expresión, dificultándose su detección hacia el día 6 de cultivo. Por su parte, HIF2 $\alpha$  también ve disminuida su expresión y con él se disminuye la capacidad proliferativa de las células resultantes, que fracasan en la adquisición de autorrenovación y que conservan frenos a la expansión en cultivo como la inactivación de mTOR y la activación de GSK3 $\beta$  y p53 (Fig.54).

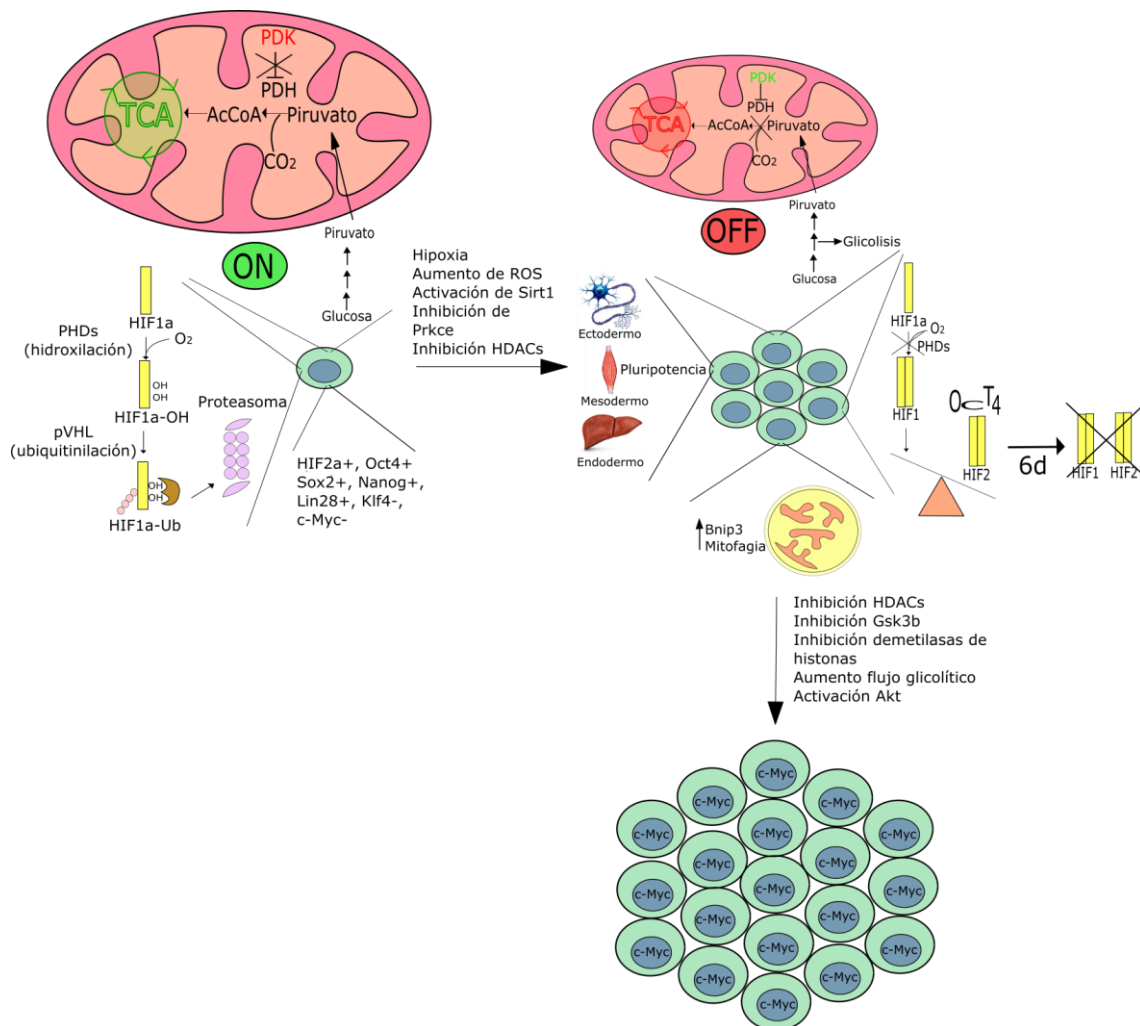


Figura 54. Representación esquemática del modelo propuesto en esta tesis por el cual se obtienen células pluripotentes reprogramadas a partir de PGCs. Las PGCs en normoxia crecen como células aisladas y expresan los siguientes marcadores: HIF2 $\alpha$ , Oct4, Sox2, Nanog y Lin28, siendo negativas para Klf4 y c-Myc. Estas células, debido a los elevados niveles de oxígeno, degradan HIF1 $\alpha$ , poseen mitocondrias activas y muestran un perfil metabólico desplazado hacia la fosforilación oxidativa, con la PDK inactiva. Cuando estas células son sometidas a hipoxia, a niveles elevados e intermitentes de ROS, a la activación de Sirt1 o la inhibición de mTOR, a la inhibición de PKC $\epsilon$  o a la inhibición de HDACs, son reprogramadas y obtienen capacidad

pluripotente, expresando marcadores de las tres hojas germinales. Estas células reprogramadas muestran expresión de HIF1 $\alpha$ , lo cual altera el balance HIF1/HIF2 y se produce una desregulación de los niveles Oct4. La expresión transitoria de HIF1 $\alpha$  establece en las células reprogramadas un perfil glicolítico donde las mitocondrias se inactivan y la PDK, en este caso activa, bloquea el paso de piruvato a acetilCoA. Por otra parte, la reprogramación iría acompañada de una remodelación estructural mediante la autofagia que también afectaría a las mitocondrias, que serían autofagocitadas y destruidas por mediación de Bnip3, contribuyendo a afianzar el perfil glicolítico. Sin embargo, estas células reprogramadas no poseen capacidad de autorrenovación. Procesos como la inhibición de HDACs, la inhibición de Gsk3 $\beta$ , la inhibición de la demetilación de histonas, el aumento del flujo glicolítico o la activación de Akt inducen la expresión de c-Myc. La expresión de este factor de transcripción provoca una mayor proliferación de las células reprogramadas, que aun así no consiguen adquirir una plena capacidad de autorrenovación, probablemente por la pérdida en la expresión de los HIFs a los 6 días de cultivo y por la ausencia de expresión de Klf4.

# *Conclusiones*

- 1.- La hipoxia provoca la reprogramación celular de PGCs mediante la inducción de la expresión de HIF1 $\alpha$ , que a su vez desencadena un cambio metabólico hacia un perfil glicolítico y altera los niveles de expresión de Oct4.
- 2.- La alteración de procesos como la autofagia, la activación de la sirtuína 1, la inhibición de la isoforma  $\epsilon$  de la proteína quinasa C y la acetilación de histonas provocan la reprogramación celular de PGCs hacia células pluripotentes en normoxia.
- 3.- Compuestos que alteran procesos como el flujo glicolítico, la metilación de histonas y la activación de Gsk3 $\beta$  y Akt sinergizan con la hipoxia induciendo una mayor eficiencia en la reprogramación celular en PGCs.
- 4.- Todos los compuestos reprogramadores en normoxia promueven una estabilización de HIF1 $\alpha$  que se acompaña de una inactivación mitocondrial. Al mismo tiempo, desregulan los niveles de Oct4 y no consiguen mantener la expresión de HIF2 $\alpha$ .
- 5.- La inducción de c-Myc en compuestos que alteran el estado epigenético, el flujo glicolítico y la activación de Gsk3 $\beta$  y Akt no es suficiente para promover la autorenovación ilimitada que acompañe a la pluripotencia adquirida en PGCs.
- 6.- La reprogramación celular promovida por estos compuestos es parcial, de manera que se adquiere pluripotencia pero no capacidad de autorenovación ilimitada. Esto es debido probablemente a la ausencia de Klf4, que no ve inducida su expresión en ninguna de las condiciones experimentales.

# *Bibliografía*

Abe H, Ishikawa W, Kushima T, Nishimura T, Mori C, Onuki A, Suzuki T, Ishii Y, Kansaku N, Miyazaki Y, Tanaka K, Morita H, Takizawa T. (2013) Nitric oxide induces vascular endothelial growth factor expression in the rat placenta in vivo and in vitro. *Biosci Biotechnol Biochem*, 77(5): 971-976.

Ancelin K, Lange UC, Hajkova P, Schneider R, Bannister AJ, Kouzarides T, Surani MA. (2006) Blimp1 associates with Prmt5 and directs histone arginine methylation in mouse germ cells. *Nature Cell Biology*, 8(6): 623–630.

Aoi T, Yae K, Nakagawa M, Ichisaka T, Okita K, Takahashi K, Chiba T, Yamanaka S. (2008) Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science*, 321(5889): 699–702.

Aprelikova O, Wood M, Tackett S, Chandramouli GV, Barrett JC. (2006) Role of ETS transcription factors in the hypoxia-inducible factor-2 target gene selection. *Cancer Res*, 66(11): 5641-5647.

Araki R, Uda M, Hoki Y, Sunayama M, Nakamura M, Ando S, Sugiura M, Ideno H, Shimada A, Nifuji A, Abe M. (2013) Negligible immunogenicity of terminally differentiated cells derived from induced pluripotent or embryonic stem cells. *Nature*, 494(7435): 100–104.

Arany Z, Foo SY, Ma Y, Ruas JL, Bommi-Reddy A, Girnun G, Cooper M, Laznik D, Chinsomboon J, Rangwala SM, Baek KH, Rosenzweig A, Spiegelman BM. (2008) HIF-independent regulation of VEGF and angiogenesis by the transcriptional coactivator PGC-1alpha. *Nature*, 451(7181): 1008-1012.

Armstrong L, Tilgner K, Saretzki G, Atkinson SP, Stojkovic M, Moreno R, Przyborski S, Lako M. (2010) Human induced pluripotent stem cell lines show stress defense mechanisms and mitochondrial regulation similar to those of human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 28(4):661–673

Basu A, Sivaprasad U. (2007) Protein kinase Cepsilon makes the life and death decision. *Cell Signal*, 19(8):1633-1642.

Bellot G, Garcia-Medina R, Gounon P, Chiche J, Roux D, Pouyssegur J, Mazure NM. (2009) Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Mol Cell Biol*, 29(10):2570–2581.

Bertout JA, Majmundar AJ, Gordan JD, Lam JC, Ditsworth D, Keith B, Brown EJ, Nathanson KL, Simon MC. (2009) HIF2alpha inhibition promotes p53 pathway activity, tumor cell death, and radiation responses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106(34):14391–14396.



Boiani M, Eckardt S, Scholer HR, McLaughlin KJ. (2002) Oct4 distribution and level in mouse clones: consequences for pluripotency. *Genes Dev*, 16(10): 1209–1219.

Boiani M, Kehler J, Schöler HR. (2004) Activity of the germline-specific Oct4-GFP transgene in normal and clone mouse embryos. *Methods Mol Biol*, 254: 1-34.

Boland ML, Chourasia AH, Macleod KF. (2013) Mitochondrial Dysfunction in Cancer. *Front Oncol*, 3: 292.

Bonnet S, Archer SL, Allalunis-Turner J, Haromy A, Beaulieu C, Thompson R, Lee CT, Lopaschuk GD, Puttagunta L, Bonnet S, Harry G, Hashimoto K, Porter CJ, Andrade MA, Thebaud B, Michelakis ED. (2007) A mitochondria-K<sup>+</sup> channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth. *Cancer Cell*, 11(1):37-51.

Bourguignon LY, Spevak CC, Wong G, Xia W, Gilad E. (2009) Hyaluronan-CD44 interaction with protein kinase C (epsilon) promotes oncogenic signaling by the stem cell marker Nanog and the Production of microRNA-21, leading to down-regulation of the tumor suppressor protein PDCD4, anti-apoptosis, and chemotherapy resistance in breast tumor cells. *J Biol Chem*, 284(39):26533-26546.

Boussouar F, Jamshidikia M, Morozumi Y, Rousseaux S, Khochbin S. (2013) Malignant genome reprogramming by ATAD2. *Biochim Biophys Acta*, 1829(10):1010-1014.

Brahimi-Horn MC, Chiche J, Pouyssegur J. (2007) Hypoxia signalling controls metabolic demand. *Curr Opin Cell Biol*, 19:223-229.

Buganim Y, Faddah DA, Cheng AW, Itskovich E, Markoulaki S, Ganz K, Klemm SL, van Oudenaarden A, Jaenisch R. (2012) Single-cell expression analyses during cellular reprogramming reveal an early stochastic and a late hierarchic phase. *Cell*, 150(6):1209–1222.

Buganim Y, Markoulaki S, van Wietmarschen N, Hoke H, Wu T, Ganz K, Akhtar-Zaidi B, He Y, Abraham BJ, Porubsky D, Kulenkampff E, Faddah DA, Shi L, Gao Q, Sarkar S, Cohen M, Goldmann J, Nery JR, Schultz MD, Ecker JR, Xiao A, Young RA, Lansdorp PM, Jaenisch R. (2014) The developmental potential of iPSCs is greatly influenced by reprogramming factor selection. *Cell Stem Cell*, 15(3):295-309.

Cairns RA, Harris IS, Mak TW. (2011) Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer*, 11(2):85–95.

Carrero P, Okamoto K, Coumailleau P, O'Brien S, Tanaka H, Poellinger L. (200) Redox-regulated recruitment of the transcriptional coactivators CREB-binding protein and SRC-1 to hypoxia-inducible factor 1alpha. *Mol Cell Biol*, 20(1):402-415.

Cenni V, Döppler H, Sonnenburg ED, Maraldi N, Newton AC, Toker A. (2002) Regulation of novel protein kinase C epsilon by phosphorylation. *Biochem J*, 363(Pt 3):537-545.

Cervený KL, Tamura Y, Zhang Z, Jensen RE, Sesaki H. (2007) Regulation of mitochondrial fusion and division. *Trends Cell Biol*, 17(11): 563–569.

Chang CW, Lai YS, Pawlik KM, Liu K, Sun CW, Li C, Schoeb TR, Townes TM. (2009) Polycistronic lentiviral vector for “hit and run” reprogramming of adult skin fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*, 27(5):1042–1049.

Chen D, Li M, Luo J, Gu W. (2003) Direct interactions between HIF-1 alpha and Mdm2 modulate p53 function. *J Biol Chem*, 278(16):13595-13598.

Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE, Fraser SE, Chan DC. (2009) Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol*, 160(2): 189–200.

Chen T, Shen L, Yu J, Wan H, Guo A, Chen J, Long Y, Zhao J, Pei G. (2011) Rapamycin and other longevity-promoting compounds enhance the generation of mouse induced pluripotent stem cells. *Aging Cell*, 10(5):908-911.

Chen X, Zhai Y, Yu D, Cui J, Hu JF, Li W. (2016) Valproic Acid Enhances iPSC Induction From Human Bone Marrow-Derived Cells Through the Suppression of Reprogramming-Induced Senescence. *J Cell Physiol*, 231(8):1719-1727.

Cheng L, Hansen NF, Zhao L, Du Y, Zou C, Donovan FX, Chou BK, Zhou G, Li S, Dowe SN, Ye Z; NISC Comparative Sequencing Program, Chandrasekharappa SC, Yang H, Mullikin JC, Liu PP. (2012). Low incidence of DNA sequence variation in human induced pluripotent stem cells generated by nonintegrating plasmid expression. *Cell Stem Cell*, 10(3):337–344.

Chin MH, Mason MJ, Xie W, Volinia S, Singer M, Peterson C, Ambartsumyan G, Aimiwu O, Richter L, Zhang J, Khvorostov I, Ott V, Grunstein M, Lavon N, Benvenisty N, Croce CM, Clark AT, Baxter T, Pyle AD, Teitell MA, Pelegri M, Plath K, Lowry WE. (2009) Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. *Cell Stem Cell*, 5(1):111–123.

Chin MH, Pellegrini M, Plath K, Lowry WE. (2010). Molecular analyses of human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 7(2):263–269.

Christensen DR, Calder PC, Houghton FD. (2015) GLUT3 and PKM2 regulate OCT4 expression and support the hypoxic culture of human embryonic stem cells. *Sci Rep*, 5:17500.

Christofk HR, Vander Heiden MG, Harris MH, Ramanathan A, Gerszten RE, Wei R, Fleming MD, Schreiber SL, Cantley LC. (2008) The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature*, 452(7184):230-233.

Cipolleschi MG, Dello Sbarba P, Olivotto M. (1993) The role of hypoxia in the maintenance of hematopoietic stem cells. *Blood*, 82(7):2031-2037.

Covello KL, Kehler J, Yu H, Gordan JD, Arsham AM, Hu CJ, Labosky PA, Simon MC, Keith B. (2006) HIF-2 $\alpha$  regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. *Genes Dev*, 20(5): 557-570.

Cullis ER, Kalber TL, Ashton SE, Cartwright JE, Griffiths JR, Ryan AJ, Robinson SP. (2006) Tumour overexpression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) increases angiogenesis and may modulate the anti-tumour effects of the vascular disrupting agent ZD6126. *Microvasc Res*, 71(2): 76-84.

Dahia PL, Ross KN, Wright ME, Hayashida CY, Santagata S, Barontini M, Kung AL, Sanso G, Powers JF, Tischler AS, Hodin R, Heitritter S, Moore F, Dluhy R, Sosa JA, Ocal IT, Benn DE, Marsh DJ, Robinson BG, Schneider K, Garber J, Arum SM, Korbonits M, Grossman A, Pigny P, Toledo SP, Nosé V, Li C, Stiles CD. (2005) A HIF1 $\alpha$  regulatory loop links hypoxia and mitochondrial signals in pheochromocytomas. *PLoS Genet*, 1(1): 72-80.

Davis RL, Weintraub H, Lassar AB. (1987) Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell*, 51(6):987-1000.

De Almeida PE, Meyer EH, Kooreman NG, Diecke S, Dey D, Sanchez-Freire V, Hu S, Ebert A, Odegaard J, Mordwinkin NM, Brouwer TP, Lo D, Montoro DT, Longaker MT, Negrin RS, Wu JC. (2014). Transplanted terminally differentiated induced pluripotent stem cells are accepted by immune mechanisms similar to self-tolerance. *Nat Commun*, 5:3903.

De Felici M. (2011) Nuclear reprogramming in mouse primordial germ cells: epigenetic contribution. *Stem Cells Int*, 2011:425863.

De Miguel MP, Cheng L, Holland EC, Federspiel MJ, Donovan PJ. (2002) Dissection of the c-Kit signaling pathway in mouse primordial germ cells by retroviral-mediated gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99(16):10458-10463.

De Miguel MP, Donovan PJ. (2003) Isolation and culture of embryonic germ cells. *Methods Enzymol*, 365:353-363.

De Miguel MP, Kerr CL, López-Iglesias P, Alcaina Y (2011) Techniques and conditions for embryonic germ cell derivation and culture. *Embryonic Stem Cells - Basic Biology to Bioengineering*, Prof. Michael Kallos (Ed.), ISBN: 978-953-307-278-4.

Doi A, Park IH, Wen B, Murakami P, Aryee MJ, Irizarry R, Herb B, Ladd-Acosta C, Rho J, Loewer S, Miller J, Schlaeger T, Daley GQ, Feinberg AP. (2009). Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts. *Nat Genet*, 41(12):1350–1353.

Donovan PJ, Stott D, Cairns LA, Heasman J, Wylie CC. (1986) Migratory and postmigratory mouse primordial germ cells behave differently in culture. *Cell*, 44(6):831–838.

Donovan PJ, De Miguel MP, Hirano MP, Parsons MS, Lincoln AJ. (2001) Germ cell biology-from generation to generation. *Int J Dev Biol*, 45(3):523–531.

Donovan PJ, Gearhart J. (2001) The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature*, 414(6859): 92-97.

Donovan PJ, de Miguel MP. (2003) Turning germ cells into stem cells. *Curr Opin Genet Dev*, 13(5): 463–471.

Drevytska T, Gavenauskas B, Drozdovska S, Nosar V, Dosenko V, Mankovska I. (2012) HIF-3 $\alpha$  mRNA expression changes in different tissues and their role in adaptation to intermittent hypoxia and physical exercise. *Pathophysiology*, Jun;19(3):205-214.

Duquesnes N, Lezoualc'h F, Crozatier B. (2011) PKC-delta and PKC-epsilon: foes of the same family or strangers? *J Mol Cell Cardiol*, 51(5): 665-673.

Durcova-Hills G, Tang F, Doody G, Tooze R, Surani MA. (2008) Reprogramming primordial germ cells into pluripotent stem cells. *PLoS One*, 3(10):e3531.

El Akoum S. (2014) PPAR Gamma at the Crossroads of Health and Disease: A Masterchef in Metabolic Homeostasis. *Endocrinol Metab Syndr*, 3:126.

Elliott AM, De Miguel MP, Rebel VI, Donovan PJ. (2007) Identifying genes differentially expressed between PGCs and ES cells reveals a role for CREB-binding protein in germ cell survival. *Developmental Biology*, 311(2):347-358.

Elvert G, Kappel A, Heidenreich R, Englmeier U, Lanz S, Acker T, Rauter M, Plate K, Sieweke M, Breier G, Flamme I. (2003) Cooperative interaction of hypoxia-inducible factor-2alpha (HIF-2alpha) and Ets-1 in the transcriptional activation of vascular endothelial growth factor receptor-2 (Flk-1). *J Biol Chem*, 278(9):7520-30.

Eminli S, Utikal J, Arnold K, Jaenisch R, Hochedlinger K. (2008) Reprogramming of neural progenitor cells into induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2 expression. *Stem Cells*, 26(10): 2467–2474.

Esteban MA, Wang T, Qin B, Yang J, Qin D, Cai J, Li W, Weng Z, Chen J, Ni S, Chen K, Li Y, Liu X, Xu J, Zhang S, Li F, He W, Labuda K, Song Y, Peterbauer A, Wolbank S, Redl H, Zhong M, Cai D, Zeng L, Pei D. (2010) Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 6(1):71-79.

Ezashi T, Das P, Roberts RM. (2005) Low O<sub>2</sub> tensions and the prevention of differentiation of hES cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102(13):4783-4788.

Feng B, Jiang J, Kraus P, Ng JH, Heng JC, Chan YS, Yaw LP, Zhang W, Loh YH, Han J, Vega VB, Cacheux-Rataboul V, Lim B, Lufkin T, Ng HH. (2009) Reprogramming of fibroblasts into induced pluripotent stem cells with orphan nuclear receptor Esrrb. *Nat Cell Biol*, 11(2):197–203.

Feuerecker B, Seidl C, Pirsig S, Bruchelt G, Senekowitsch-Schmidtke R. (2015) DCA promotes progression of neuroblastoma tumors in nude mice. *Am J Cancer Res*, 5(2):812-820.

Firth JD, Ebert BL, Ratcliffe PJ. (1995) Hypoxic regulation of lactate dehydrogenase A. Interaction between hypoxia-inducible factor 1 and cAMP response elements. *J Biol Chem*, 270(36): 21021-21027.

Fischer B, Bavister BD. (1993) Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *J Reprod Fertil*, 99(2):673-679.

Folmes CD, Nelson TJ, Martinez-Fernandez A, Arrell DK, Lindor JZ, Dzeja PP, Ikeda Y, Perez-Terzic C, Terzic A. (2011) Somatic oxidative bioenergetics transitions into pluripotency-dependent glycolysis to facilitate nuclear reprogramming. *Cell Metab*, 14(2):264–271.

Forristal CE, Wright KL, Hanley NA, Oreffo RO, Houghton FD. (2010) Hypoxia inducible factors regulate pluripotency and proliferation in human embryonic stem cells cultured at reduced oxygen tensions. *Reproduction*, 139(1): 85–97.

Forristal CE, Christensen DR, Chinnery FE, Petruzzelli R, Parry KL, Sanchez-Elsner T, Houghton FD. (2013) Environmental oxygen tension regulates the energy metabolism and self-renewal of human embryonic stem cells. *PLoS One*, 8(5):e62507.

Fujioka S, Niu J, Schmidt C, Sclabas GM, Peng B, Uwagawa T, Li Z, Evans DB, Abbruzzese JL, Chiao PJ. (2004) NF-kappaB and AP-1 connection: mechanism of NF-kappaB-dependent regulation of AP-1 activity. *Mol Cell Biol*, 24(17):7806-7819.

Fusaki N, Ban H, Nishiyama A, Saeki K, Hasegawa M. (2009) Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 85(8):348–362.

Ghosh Z, Wilson KD, Wu Y, Hu S, Quertermous T, Wu JC. (2010) Persistent donor cell gene expression among human induced pluripotent stem cells contributes to differences with human embryonic stem cells. *PLoS ONE*, 5(2):e8975.

Gordan JD, Bertout JA, Hu CJ, Diehl JA, Simon MC. (2007a) HIF-2alpha promotes hypoxic cell proliferation by enhancing c-myc transcriptional activity. *Cancer Cell*, 11(4):335-347.

Gordan JD, Thompson CB, Simon MC. (2007b) HIF and c-Myc: sibling rivals for control of cancer cell metabolism and proliferation. *Cancer Cell*, 12(2):108-113.

Gorin MA, Pan Q. (2009) Protein kinase C epsilon: an oncogene and emerging tumor biomarker. *Mol Cancer*, 8:9.

Gradin K, McGuire J, Wenger RH, Kvietikova I, Fhitelaw ML, Toftgård R, Tora L, Gassmann M, Poellinger L. (1996) Functional interference between hypoxia and dioxin signal transduction pathways: competition for recruitment of the Arnt transcription factor. *Mol Cell Biol*, 16:5221-5231.

Gray MO, Zhou HZ, Schafhalter-Zoppoth I, Zhu P, Mochly-Rosen D, Messing RO. (2004) Preservation of base-line hemodynamic function and loss of inducible cardioprotection in adult mice lacking protein kinase C epsilon. *J Biol Chem*, 279(5):3596–3604.

Guha P, Morgan JW, Mostoslavsky G, Rodrigues NP, Boyd AS. (2013) Lack of immune response to differentiated cells derived from syngeneic induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 12(4):407–412.

Gui DY, Lewis CA, Vander Heiden MG. (2013) Allosteric regulation of PKM2 allows cellular adaptation to different physiological states. *Sci Signal*, 6(263):pe7.

Guido C, Whitaker-Menezes D, Lin Z, Pestell RG, Howell A, Zimmers TA, Casimiro MC, Aquila S, Ando' S, Martinez-Outschoorn UE, Sotgia F, Lisanti MP. (2012) Mitochondrial fission induces glycolytic reprogramming in cancer-associated myofibroblasts, driving stromal lactate production, and early tumor growth. *Oncotarget*, 3(8):798-810.

Günesdogan U, Magnúsdóttir E, Surani MA. (2014) Primordial germ cell specification: a context-dependent cellular differentiation event. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 369(1657). pii: 20130543.

Gurdon JB. (1962) The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J Embryol Exp Morphol*, 10:622-640.

Hagen T, Taylor CT, Lam F, Moncada S. (2003) Redistribution of intracellular oxygen in hypoxia by nitric oxide: effect on HIF1alpha. *Science*, 302(5652):1975-1978.

Hamacher-Brady A, Brady NR, Logue SE, Sayen MR, Jinno M, Kirshenbaum LA, Gottlieb RA, Gustafsson AB. (2007) Response to myocardial ischemia/reperfusion injury involves Bnip3 and autophagy. *Cell Death Differ*, 14(1):146-157.

Han J, Yuan P, Yang H, Zhang J, Soh BS, Li P, Lim SL, Cao S, Tay J, Orlov YL, Lufkin T, Ng HH, Tam WL, Lim B. (2010) Tbx3 improves the germ-line competency of induced pluripotent stem cells. *Nature*, 463(7284):1096–1100.

Hanna J, Markoulaki S, Schorderet P, Carey BW, Beard C, Wernig M, Creighton MP, Steine EJ, Cassady JP, Foreman R, Lengner CJ, Dausman JA, Jaenisch R. (2008) Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. *Cell*, 133(2):250–264.

Hawkins KE, Joy S, Delhove JM, Kotiadis VN, Fernandez E, Fitzpatrick LM, Whiteford JR, King PJ, Bolanos JP, Duchon MR, Waddington SN, McKay TR. (2016) NRF2 orchestrates the metabolic shift during induced pluripotent stem cell reprogramming. *Cell Rep*, 14(8):1883-1891.

Hayashi M, Sakata M, Takeda T, Yamamoto T, Okamoto Y, Sawada K, Kimura A, Minekawa R, Tahara M, Tasaka K, Murata Y. (2004) Induction of glucose transporter 1 expression through hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  under hypoxic conditions in trophoblast-derived cells. *J Endocrinol*, 183(1):145–154.

Hayashi K, Ohta H, Kurimoto K, Aramaki S, Saitou M. (2011) Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells. *Cell*, 146(4):519-532.

Heikkilä M, Pasanen A, Kivirikko KI, Myllyharju J. (2011) Roles of the human hypoxia-inducible factor (HIF)-3 $\alpha$  variants in the hypoxia response. *Cell Mol Life Sci*, 68(23):3885-3901.

Heng JC, Feng B, Han J, Jiang J, Kraus P, Ng JH, Orlov YL, Huss M, Yang L, Lufkin T, Lim B, Ng HH. (2010) The nuclear receptor Nr5a2 can replace Oct4 in the reprogramming of murine somatic cells to pluripotent cells. *Cell Stem Cell*, 6(2):167–174.

Hitosugi T, Kang S, Vander Heiden MG, Chung TW, Elf S, Lythgoe K, Dong S, Lonial S, Wang X, Chen GZ, Xie J, Gu TL, Polakiewicz RD, Roesel JL, Boggon TJ, Khuri FR, Gilliland DG, Cantley LC, Kaufman J, Chen J. (2009) Tyrosine phosphorylation inhibits PKM2 to promote the Warburg effect and tumor growth. *Sci Signal*, 2(97):ra73.

Hochachka PW, Lutz PL. (2001) Mechanism, origin, and evolution of anoxia tolerance in animals. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 130(4):435-459.

Hong H, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Kanagawa O, Nakagawa M, Okita K, Yamanaka S. (2009) Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway. *Nature*, 460(7259):1132–1135.

Hou P, Li Y, Zhang X, Liu C, Guan J, Li H, Zhao T, Ye J, Yang W, Liu K, Ge J, Xu J, Zhang Q, Zhao Y, Deng H. (2013) Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science*, 341(6146):651–654.

Hu BY, Weick JP, Yu J, Ma LX, Zhang XQ, Thomson JA, Zhang SC. (2010). Neural differentiation of human induced pluripotent stem cells follows developmental principles but with variable potency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107(9):4335–4340.

Huang PI, Chou YC, Chang YL, Chien Y, Chen KH, Song WS, Peng CH, Chang CH, Lee SD, Lu KH, Chen YJ, Kuo CH, Hsu CC, Lee HC, Yung MC. (2011) Enhanced differentiation of three-gene-reprogrammed induced pluripotent stem cells into adipocytes via adenoviral-mediated PGC-1 $\alpha$  overexpression. *Int J Mol Sci*, 12(11):7554-7568.

Huangfu D, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, Snitow M, Chen AE, Melton DA. (2008) Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat Biotechnol*, 26(7):795-797.

Hung LM, Su MJ, Chu WK, Chiao CW, Chan WF, Chen JK. (2002) The protective effect of resveratrols on ischaemia-reperfusion injuries of rat hearts is correlated with antioxidant efficacy. *Br J Pharmacol*, 135(7):1627-1633.



Ichida JK, Blanchard J, Lam K, Son EY, Chung JE, Egli D, Loh KM, Carter AC, Di Giorgio FP, Koszka K, Huangfu D, Akutsu H, Liu DR, Rubin LL, Eggan K. (2009) A small-molecule inhibitor of TGF-Beta signaling replaces sox2 in reprogramming by inducing Nanog. *Cell Stem Cell*, 5(5):491–503.

Jain K, Basu A. (2014) The multifunctional protein kinase C- $\epsilon$  in cancer development and progression. *Cancers (Basel)*, 6(2):860-878.

Jeong CH, Lee HJ, Cha JH, Kim JH, Kim KR, Kim JH, Yoon DK, Kim KW. (2007) Hypoxia-inducible factor-1 alpha inhibits self-renewal of mouse embryonic stem cells in Vitro via negative regulation of the leukemia inhibitory factor-STAT3 pathway. *J Biol Chem*, 282(18):13672-13679.

Kaelin WG Jr. (2003) The von Hippel-Lindau gene, kidney cancer, and oxygen sensing. *J Am Soc Nephrol*, 14(11):2703-2711.

Kaidi A, Williams AC, Paraskeva C. (2007) Interaction between beta-catenin and HIF-1 promotes cellular adaptation to hypoxia. *Nat Cell Biol*, 9(2):210-217.

Kamura T, Sato S, Iwai K, Czyzyk-Krzeska M, Conaway RC, Conaway JW. (2000) Activation of HIF1alpha ubiquitination by a reconstituted von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97(19):10430-10435.

Karwacki-Neisius V, Göke J, Osorno R, Halbritter F, Ng JH, Weiße AY, Wong FC, Gagliardi A, Mullin NP, Festuccia N, Colby D, Tomlinson SR, Ng HH, Chambers I. (2013) Reduced Oct4 expression directs a robust pluripotent state with distinct signaling activity and increased enhancer occupancy by Oct4 and Nanog. *Cell Stem Cell*, 12(5):531-545.

Kawamura T, Suzuki J, Wang YV, Menendez S, Morera LB, Raya A, Wahl GM, Izpisua Belmonte JC. (2009) Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming. *Nature*, 460(7259):1140–1144.

Keith B, Johnson RS, Simon MC. (2011) HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$ : sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nat Rev Cancer*, 12(1):9-22.

Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV. (2006) HIF1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab*, 3(3):177-185.

Kim EJ, Kho JH, Kang MR, Um SJ. (2007) Active regulator of SIRT1 cooperates with SIRT1 and facilitates suppression of p53 activity. *Mol Cell*, 28(2):277-290.

Kim JB, Sebastiano V, Wu G, Arauzo-Bravo MJ, Sasse P, Gentile L, Ko K, Ruau D, Ehrich M, van den Boom D, Meyer J, Hübner K, Bernemann C, Ortmeier C, Zenke M, Fleischmann BK, Zaehres H, Schöler HR. (2009) Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell*, 136(3):411–419.

Kim WY, Perera S, Zhou B, Carretero J, Yeh JJ, Heathcote SA, Jackson AL, Nikolinakos P, Ospina B, Naumov G, Brandstetter KA, Weigman VJ, Zaghul S, Hayes DN, Padera RF, Heymach JV, Kung AL, Sharpless NE, Kaelin WG Jr, Wong KK. (2009) HIF2alpha cooperates with RAS to promote lung tumorigenesis in mice. *J Clin Invest*, 119(8):2160-2170.

Kim H, Jang H, Kim TW, Kang BH, Lee SE, Jeon YK, Chung DH, Choi J, Shin J, Cho EJ, Youn HD. (2015) Core Pluripotency Factors Directly Regulate Metabolism in Embryonic Stem Cell to Maintain Pluripotency. *Stem Cells*, 33(9):2699-2711.

Kimura T, Suzuki A, Fujita Y, Yomogida K, Lomeli H, Asada N, Ikeuchi M, Nagy A, Mak TW, Nakano T. (2003) Conditional loss of PTEN leads to testicular teratoma and enhances embryonic germ cell production. *Development*, 130(8):1691-1700.

Kimura T, Tomooka M, Yamano N, Murayama K, Matoba S, Umehara H, Kanai Y, Nakano T. (2008) Akt signaling promotes derivation of embryonic germ cells from primordial germ cells. *Development*, 135(5):869-879.

Kimura W, Sadek HA. (2012) The cardiac hypoxic niche: emerging role of hypoxic microenvironment in cardiac progenitors. *Cardiovasc Diagn Ther*, 2(4):278-289.

Kishigami S, Wakayama S, Thuan NV, Ohta H, Mizutani E, Hikichi T, Bui H-T, Balbach S, Ogura A, Boiani M, Wakayama T. (2006) Production of cloned mice by somatic cell nuclear transfer. *Nat Protoc* 1(1):125–138.

Kishimoto A, Kikkawa U, Ogita K, Shearman MS, Nishizuka Y. (1989) The protein kinase C family in the brain: heterogeneity and its implications. *Ann N Y Acad Sci*, 568:181-186.

Kondo K, Kaelin WG Jr. (2001) The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene. *Exp Cell Res*, 264(1):117-125.

Koshiji M, Kageyama Y, Pete EA, Horikawa I, Barrett JC, Huang LE. (2004) HIF-1alpha induces cell cycle arrest by functionally counteracting Myc. *EMBO J*, 23(9):1949-1956.

Kotch LE, Iyer NV, Laughner E, Semenza GL. (1999) Defective vascularization of HIF-1alpha-null embryos is not associated with VEGF deficiency but with mesenchymal cell death. *Dev Biol*, 209(2):254-267.

Krishnan J, Suter M, Windak R, Krebs T, Felley A, Montessuit C, Tokarska-Schlattner M, Aasum E, Bogdanova A, Perriard E, Perriard JC, Larsen T, Pedrazzini T, Krek W. (2009) Activation of a HIF1 $\alpha$ -PPAR $\gamma$  axis underlies the integration of glycolytic and lipid anabolic pathways in pathologic cardiac hypertrophy. *Cell Metab*, 9(6):512-524.

Kubli DA, Ycaza JE, Gustafsson AB. (2007) Bnip3 mediates mitochondrial dysfunction and cell death through Bax and Bak. *Biochem J*, 405(3):407–415.

Kumar R, Sharma A, Pattnaik AK, Varadwaj PK. (2010) Stem cells: An overview with respect to cardiovascular and renal disease. *J Nat Sci Biol Med*, 1(1):43-52.

Kume S, Uzu T, Horiike K, Chin-Kanasaki M, Isshiki K, Araki S, Sugimoto T, Haneda M, Kashiwagi A, Koya D. (2010) Calorie restriction enhances cell adaptation to hypoxia through Sirt1-dependent mitochondrial autophagy in mouse aged kidney. *J Clin Invest*, 120(4):1043-1055.

Kurimoto K, Yabuta Y, Ohinata Y, Shigeta M, Yamanaka K, Saitou M. (2008) Complex genome-wide transcription dynamics orchestrated by Blimp1 for the specification of the germ cell lineage in mice. *Genes Dev*, 22(12):1617–1635.

Laurent LC, Ulitsky I, Slavin I, Tran H, Schork A, Morey R, Lynch C, Harness JV, Lee S, Barrero MJ, Ku S, Martynova M, Semechkin R, Galat V, Gottesfeld J, Izpisua Belmonte JC, Murry C, Keirstead HS, Park HS, Schmidt U, Laslett AL, Muller FJ, Nievergelt CM, Shamir R, Loring JF. (2011) Dynamic changes in the copy number of pluripotency and cell proliferation genes in human ESCs and iPSCs during reprogramming and time in culture. *Cell Stem Cell* 8(1), 106–118.

Lawrence J, Chen M, Xiong F, Xiao D, Zhang H, Buchholz JN, Zhang L. (2011) Foetal nicotine exposure causes PKC $\epsilon$  gene repression by promoter methylation in rat hearts. *Cardiovasc Res*, 89(1):89-97.

Lee SH, Heo JS, Han HJ. (2007) Effect of hypoxia on 2-deoxyglucose uptake and cell cycle regulatory protein expression of mouse embryonic stem cells: involvement of Ca<sup>2+</sup>/PKC, MAPKs and HIF-1 $\alpha$ . *Cell Physiol Biochem*, 19(5-6):269-282.

Lee IH, Cao L, Mostoslavsky R, Lombard DB, Liu J, Bruns NE, Tsokos M, Alt FW, Finkel T. (2008) A role for the NAD-dependent deacetylase Sirt1 in the regulation of autophagy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105(9):3374-3379.

Lee J, Kim HK, Han YM, Kim J. (2008) Pyruvate kinase isozyme type M2 (PKM2) interacts and cooperates with Oct-4 in regulating transcription. *Int J Biochem Cell Biol*, 40(5):1043–1054.

Lee IH, Finkel T. (2009) Regulation of autophagy by the p300 acetyltransferase. *J Biol Chem*, 284(10):6322–6328.

Lengner CJ, Gimelbrant AA, Erwin JA, Cheng AW, Guenther MG, Welstead GG, Alagappan R, Frampton GM, Xu P, Muffat J, Santagata S, Powers D, Barrett CB, Young RA, Lee JT, Jaenisch R, Mitalipova M. (2010) Derivation of pre-X inactivation human embryonic stem cells under physiological oxygen concentrations. *Cell*, 141(5):872-883.

Levine B, Klionsky DJ. (2004) Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell*, 6(4):463–477.

Li Y, Wang Y, Kim E, Beemiller P, Wang CY, Swanson J, You M, Guan KL. (2007) Bnip3 mediates the hypoxia-induced inhibition on mammalian target of rapamycin by interacting with Rheb. *J Biol Chem*, 282(49):35803–35813.

Lim JH, Lee YM, Chun YS, Chen J, Kim JE, Park JW. (2010) Sirtuin 1 modulates cellular responses to hypoxia by deacetylating hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *Mol Cell*, 38(6): 864-878.

Liu L, Cash TP, Jones RG, Keith B, Thompson CB, Simon MC. (2006) Hypoxia-induced energy stress regulates mRNA translation and cell growth. *Mol Cell*, 21(4):5215–31.

Liu X, Ren X, Deng X, Huo Y, Xie J, Huang H, Jiao Z, Wu M, Liu Y, Wen T. (2010) A protein interaction network for the analysis of the neuronal differentiation of neural stem cells in response to titanium dioxide nanoparticles. *Biomaterials*, 31(11):3063-3070.

López-Iglesias P, Alcaina Y, Tapia N, Sabour D, Arauzo-Bravo MJ, Sainz de la Maza D, Berra E, O'Mara AN, Nistal M, Ortega S, Donovan PJ, Schöler HR, De Miguel MP. (2015) Hypoxia induces pluripotency in primordial germ cells by HIF1 $\alpha$  stabilization and Oct4 deregulation. *Antioxid Redox Signal*, 22(3):205-223.

Lu H, Dalgard CL, Mohyeldin A, McFate T, Tait AS, Verma A. (2005) Reversible inactivation of HIF-1 prolyl hydroxylases allows cell metabolism to control basal HIF-1. *J Biol Chem*, 280(51):41928-41939.

Luo W, Hu H, Chang R, Zhong J, Knabel M, O'Meally R, Cole RN, Pandey A, Semenza GL. (2011) Pyruvate kinase M2 is a PHD3-stimulated coactivator for hypoxia-inducible factor 1. *Cell*, 145(5):732–744.

Luo W, Semenza GL. (2012) Emerging roles of PKM2 in cell metabolism and cancer progression. *Trends Endocrinol Metab*, 23(11):560–566.

Lyssiotis CA, Foreman RK, Staerk J, Garcia M, Mathur D, Markoulaki S, Hanna J, Lairson LL, Charette BD, Bouchez LC, Bollong M, Kunick C, Brinker A, Cho CY, Schultz PG, Jaenisch R. (2009) Reprogramming of murine fibroblasts to induced pluripotent stem cells with chemical complementation of Klf4. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106(22):8912–8917.

Ma T, Li J, Xu Y, Yu C, Xu T, Wang H, Liu K, Cao N, Nie BM, Zhu SY, Xu S, Li K, Wei WG, Wu Y, Guan KL, Ding S. (2015) Atg5-independent autophagy regulates mitochondrial clearance and is essential for iPSC reprogramming. *Nat Cell Biol*, 17(11):1379-1387.

Ma L, Fu R, Duan Z, Lu J, Gao J, Tian L, Lv Z, Chen Z, Han J, Jia L, Wang L. (2016) Sirt1 is essential for resveratrol enhancement of hypoxia-induced autophagy in the type 2 diabetic nephropathy rat. *Pathol Res Pract*, 212(4):310-318.

Mah IK, Soloff R, Hedrick SM, Mariani FV. (2015) Atypical PKC- $\iota$  Controls Stem Cell Expansion via Regulation of the Notch Pathway. *Stem Cell Reports*, 5(5):866-880.

Mahato B, Home P, Rajendran G, Paul A, Saha B, Ganguly A, Ray S, Roy N, Swerdlow RH, Paul S. (2014) Regulation of mitochondrial function and cellular energy metabolism by protein kinase C- $\lambda/\iota$ : a novel mode of balancing pluripotency. *Stem Cells*, 32(11):2880-2892.

Maherali N, Hochedlinger K. (2009) Tgfbeta signal inhibition cooperates in the induction of iPSCs and replaces Sox2 and cMyc. *Curr Biol*, 19(20):1718–1723.

Majmundar AJ, Wong WJ, Simon MC. (2010) Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Mol Cell*, 40(2):294-309.

Makita N, Ishiguro J, Suzuki K, Nara F. (2016) Dichloroacetate induces regulatory T-cell differentiation and suppresses Th17-cell differentiation by pyruvate dehydrogenase kinase-independent mechanism. *J Pharm Pharmacol*, publicado únicamente en formato electrónico.

Mandal S, Lindgren AG, Srivastava AS, Clark AT, Banerjee U. (2011) Mitochondrial function controls proliferation and early differentiation potential of embryonic stem cells. *Stem Cells*, 29(3):486-495.

Mao K, Wang K, Liu X, Klionsky DJ. (2013) The scaffold protein Atg11 recruits fission machinery to drive selective mitochondria degradation by autophagy. *Dev Cell*, 26(1):9-18.

Martello G, Sugimoto T, Diamanti E, Joshi A, Hannah R, Ohtsuka S, Göttgens B, Niwa H, Smith A. (2012) Esrrb is a pivotal target of the Gsk3/Tcf3 axis regulating embryonic stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell*, 11(4):491-504.

Mathieu J, Zhou W, Xing Y, Sperber H, Ferreccio A, Agoston Z, Kuppusamy KT, Moon RT, Ruohola-Baker H. (2014) Hypoxia-inducible factors have distinct and stage-specific roles during reprogramming of human cells to pluripotency. *Cell Stem Cell*, 14(5):592-605.

Matsui Y, Zsebo K, Hogan BL. (1992) Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell*, 70(5):841–847.

Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ. (1999) The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*, 399(6733):271-275.

Maynard MA, Evans AJ, Hosomi T, Hara S, Jewett MA, Ohh M. (2005) Human HIF-3 $\alpha$ 4 is a dominant-negative regulator of HIF-1 and is down-regulated in renal cell carcinoma. *FASEB J*, 19(11):1396-1406.

Maynard MA, Evans AJ, Shi W, Kim WY, Liu FF, Ohh M. (2007) Dominant-negative HIF-3  $\alpha$  4 suppresses VHL-null renal cell carcinoma progression. *Cell Cycle*, 6(22):2810-2816.

Mazurek S, Boschek CB, Hugo F, Eigenbrodt E. (2005) Pyruvate kinase type M2 and its role in tumor growth and spreading. *Semin Cancer Biol*, 15(4):300–308.

Mazurek S. (2011) Pyruvate kinase type M2: a key regulator of the metabolic budget system in tumor cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 43(7):969–980.

Medley TL, Furtado M, Lam NT, Idrizi R, Williams D, Verma PJ, Costa M, Kaye DM. (2013) Effect of oxygen on cardiac differentiation in mouse iPS cells: role of hypoxia inducible factor-1 and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *PLoS One*, 8:e80280.

Moe-Behrens GH, Klinger FG, Eskild W, Grotmol T, Haugen TB, De Felici M. (2003) Akt/PTEN signaling mediates estrogen-dependent proliferation of primordial germ cells in vitro. *Mol Endocrinol*, 17(12):2630-2638.

Mohyeldin A, Garzon-Muvdi T, Quinones-Hinojosa A. (2010) Oxygen in stem cell biology: A critical component of the stem cell niche. *Cell Stem Cell*, 7(2):150–161.

Molyneaux K, Wylie C. (2004) Primordial germ cell migration. *Int. J. Dev. Biol.*, 48(5-6): 537-544.

Moore KA, Lemischka IR. (2006) Stem cells and their niches. *Science*, 311(5769):1880-1885.

Morfouace M, Lalier L, Bahut M, Bonnamain V, Naveilhan P, Guette C, Oliver L, Gueguen N, Reynier P, Vallette FM. (2012) Comparison of spheroids formed by rat glioma stem cells and

neural stem cells reveals differences in glucose metabolism and promising therapeutic applications. *J Biol Chem*, 287(40):33664-33674.

Morfouace M, Lalier L, Oliver L, Cheray M, Pecqueur C, Cartron PF, Vallette FM. (2014) Control of glioma cell death and differentiation by PKM2-Oct4 interaction. *Cell Death Dis*, 5:e1036.

Morriss GM, New DA. (1979) Effect of oxygen concentration on morphogenesis of cranial neural folds and neural crest in cultured rat embryos. *J Embryol Exp Morphol*, 54:17-35.

Morselli E, Mariño G, Bennetzen MV, Eisenberg T, Megalou E, Schroeder S, Cabrera S, Bénit P, Rustin P, Criollo A, Kepp O, Galluzzi L, Shen S, Malik SA, Maiuri MC, Horio Y, López-Otín C, Andersen JS, Tavernarakis N, Madeo F, Kroemer G. (2011) Spermidine and resveratrol induce autophagy by distinct pathways converging on the acetylproteome. *J Cell Biol*, 192(4):615-629.

Nagamatsu G, Kosaka T, Saito S, Takubo K, Akiyama H, Sudo T, Horimoto K, Oya M, Suda T. (2012) Tracing the conversion process for primordial germ cells to pluripotent stem cells in mice. *Biol Reprod*, 86(6):182.

Nagamatsu G, Saito S, Takubo K, Suda T. (2015) Integrative Analysis of the Acquisition of Pluripotency in PGCs Reveals the Mutually Exclusive Roles of Blimp-1 and AKT Signaling. *Stem Cell Reports*, 5(1):111-24.

Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Okita K, Mochiduki Y, Takizawa N, Yamanaka S. (2008) Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol*, 26(1):101–106.

Nishida Y, Arakawa S, Fujitani K, Yamaguchi H, Mizuta T, Kanaseki T, Komatsu M, Otsu K, Tsujimoto Y, Shimizu S. (2009) Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy. *Nature*, 461(7264):654–658.

Ohinata Y, Payer B, O'Carroll D, Ancelin K, Ono Y, Sano M, Barton SC, Obukhanych T, Nussenzweig M, Tarakhovsky A, Saitou M, Surani MA. (2005) Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice. *Nature*, 436(7048):207-213.

Onder TT, Kara N, Cherry A, Sinha AU, Zhu N, Bernt KM, Cahan P, Marcarci BO, Unternaehrer J, Gupta PB, Lander ES, Armstrong SA, Daley GQ. (2012) Chromatin-modifying enzymes as modulators of reprogramming. *Nature*, 483(7391):598-602.

Panasyuk G, Espeillac C, Chauvin C, Pradelli LA, Horie Y, Suzuki A, Annicotte JS, Fajas L, Foretz M, Verdeguer F, Pontoglio M, Ferré P, Scoazec JY, Birnbaum MJ, Ricci JE, Pende M. (2012) PPAR $\gamma$  contributes to PKM2 and HK2 expression in fatty liver. *Nat Commun*, 3:672.

Panopoulos AD, Yanes O, Ruiz S, Kida YS, Diep D, Tautenhahn R, Herrerías A, Batchelder EM, Plongthongkum N, Lutz M, Berggren WT, Zhang K, Evans RM, Siuzdak G, Izpisua Belmonte JC. (2012) The metabolome of induced pluripotent stem cells reveals metabolic changes occurring in somatic cell reprogramming. *Cell Res*, 22(1):168-177.

Papandreou I, Cairns RA, Fontana L, Lim AL, Denko NC. (2006) HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab*, 3(3):187-197.

Park D, Jeong H, Lee MN, Koh A, Kwon O, Yang YR, Noh J, Suh PG, Park H, Ryu SH. (2016) Resveratrol induces autophagy by directly inhibiting mTOR through ATP competition. *Sci Rep*, 6:21772.

Parmar K, Mauch P, Vergilio JA, Sackstein R, Down JD. (2007) Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104(13):5431-5436.

Petruzzelli R, Christensen DR, Parry KL, Sanchez-Elsner T, Houghton FD. (2014) HIF-2 $\alpha$  regulates NANOG expression in human embryonic stem cells following hypoxia and reoxygenation through the interaction with an Oct-Sox cis regulatory element. *PLoS One*, 9(10):e108309.

Pietrocola F, Lachkar S, Enot DP, Niso-Santano M, Bravo-San Pedro JM, Sica V, Izzo V, Maiuri MC, Madeo F, Mariño G, Kroemer G. (2015) Spermidine induces autophagy by inhibiting the acetyltransferase EP300. *Cell Death Differ*, 22(3):509-516.

Pirouz M, Klimke A, Kessel M. (2012) The reciprocal relationship between primordial germ cells and pluripotent stem cells. *J Mol Med*, 90(7):753-761.

Prigione A, Fauler B, Lurz R, Lehrach H, Adjaye J. (2010) The senescence-related mitochondrial/oxidative stress pathway is repressed in human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*, 28(4):721-733.

Prigione A, Rohwer N, Hoffmann S, Mlody B, Drews K, Bukowiecki R, Blümlein K, Wanker EE, Ralser M, Cramer T, Adjaye J. (2014) HIF1 $\alpha$  modulates cell fate reprogramming through early glycolytic shift and upregulation of PDK1-3 and PKM2. *Stem Cells*, 32(2):364-376.

Quinn P, Harlow GM. (1978) The effect of oxygen on the development of preimplantation mouse embryos in vitro. *J Exp Zool*, 206(1):73-80.



Radzsheuskaya A, Chia Gle B, dos Santos RL, Theunissen TW, Castro LF, Nichols J, Silva JC. (2013) A defined Oct4 level governs cell state transitions of pluripotency entry and differentiation into all embryonic lineages. *Nat Cell Biol*, 15(6):579-590.

Rais Y, Zviran A, Geula S, Gafni O, Chomsky E, Viukov S, Mansour AA, Caspi I, Krupalnik V, Zerbib M, Maza I, Mor N, Baran D, Weinberger L, Jaitin DA, Lara-Astiaso D, Blecher-Gonen R, Shipony Z, Mukamel Z, Hagai T, Gilad S, Amann-Zalcenstein D, Tanay A, Amit I, Novershtern N, Hanna JH. (2013) Deterministic direct reprogramming of somatic cells to pluripotency. *Nature*, 502(7469):65-70.

Resnick JL, Bixler LS, Cheng L, Donovan PJ. (1992) Longterm proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature*, 359(6395):550–551.

Rikka S, Quinsay MN, Thomas RL, Kubli DA, Zhang X, Murphy AN, Gustafsson ÅB. (2011) Bnip3 impairs mitochondrial bioenergetics and stimulates mitochondrial turnover. *Cell Death Differ*, 18(4):721-731.

Rousseaux S, Debernardi A, Jacquiau B, Vitte AL, Vesin A, Nagy-Mignotte H, Moro-Sibilot D, Brichon PY, Lantuejoul S, Hainaut P, Laffaire J, de Reyniès A, Beer DG, Timsit JF, Brambilla C, Brambilla E, Khochbin S. (2013) Ectopic activation of germline and placental genes identifies aggressive metastasis-prone lung cancers. *Sci Transl Med*, 5(186):186ra66.

Ruas JL, Poellinger L. (2005) Hypoxia-dependent activation of HIF into a transcriptional regulator. *Semin Cell Dev Biol*, 16(4-5):514-522.

Saitou M, Barton SC, Surani MA. (2002) A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice. *Nature*, 418(6895):293-300.

Saitou M, Yamaji M. (2010) Germ cell specification in mice: signaling, transcription regulation and epigenetic consequences. *Reproduction*, 139(6):931-942.

Saitou M, Yamaji M. (2012) Primordial germ cells in mice. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4(11):pii:a008375

Sakagami H, Makino Y, Mizumoto K, Isoe T, Takeda Y, Watanabe J, Fujita Y, Takiyama Y, Abiko A, Haneda M. (2014) Loss of HIF-1 $\alpha$  impairs GLUT4 translocation and glucose uptake by the skeletal muscle cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 306(9):E1065-1076.

Salceda S, Caro J. (1997) Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitinproteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem*, 272(36):22642-22647.

- Sasaki H, Matsui Y. (2008) Epigenetic events in mammalian germ-cell development: reprogramming and beyond. *Nat Rev Genet*, 9(2):129-140.
- Sato N, Meijer L, Skaltsounis L, Greengard P, Brivanlou AH. (2004) Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat Med*, 10(1):55-63.
- Schöler HR, Ruppert S, Suzuki N, Chowdhury K, and Gruss P. (1990) New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4. *Nature*, 344(6265):435–439.
- Seki Y, Hayashi K, Itoh K, Mizugaki M, Saitou M, Matsui Y. (2005) Extensive and orderly reprogramming of genome-wide chromatin modifications associated with specification and early development of germ cells in mice. *Developmental Biology*, 278(2):440–458.
- Seki Y, Yamaji M, Yabuta Y, Sano M, Shigeta M, Matsui Y, Saga Y, Tachibana M, Shinkai Y, Saitou M. (2007) Cellular dynamics associated with the genome-wide epigenetic reprogramming in migrating primordial germ cells in mice. *Development*, 134(14):2627-2638.
- Semenza GL. (2002) HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends Mol Med*, 8(4 Suppl):S62-67.
- Semenza GL. (2012) Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci*, 33(4):207-214.
- Shimada H, Hashimoto Y, Nakada A, Shigeno K, Nakamura T. (2012) Accelerated generation of human induced pluripotent stem cells with retroviral transduction and chemical inhibitors under physiological hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun*, 417(2):659-664.
- Shyh-Chang N, Locasale JW, Lyssiotis CA, Zheng Y, Teo RY, Ratanasirintrao S, Zhang J, Onder T, Unternaehrer JJ, Zhu H, Asara JM, Daley GQ, Cantley LC. (2013) Influence of threonine metabolism on S-adenosylmethionine and histone methylation. *Science*, 339(6116):222-226.
- Silva J, Nichols J, Theunissen TW, Guo G, van Oosten AL, Barrandon O, Wray J, Yamanaka S, Chambers I, Smith A. (2009) Nanog is the gateway to the pluripotent ground state. *Cell*, 138(4):722-737.
- Simon MC, Keith B. (2008) The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(4):285-296.
- Singh AM, Dalton S. (2009) The cell cycle and Myc intersect with mechanisms that regulate pluripotency and reprogramming. *Cell Stem Cell*, 5(2):141-149.

Smirnova E, Griparic L, Shurland DL, van der Blik AM. (2001) Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol Biol Cell*, 12(8):2245–2256.

Son MY, Choi H, Han YM, Cho YS. (2013) Unveiling the critical role of REX1 in the regulation of human stem cell pluripotency. *Stem Cells*, 31(11):2374-2387.

St John JC, Ramalho-Santos J, Gray HL, Petrosko P, Rawe VY, Navara CS, Simerly CR, Schatten GP. (2005) The expression of mitochondrial DNA transcription factors during early cardiomyocyte in vitro differentiation from human embryonic stem cells. *Cloning Stem Cells*, 7(3):141-153.

Stadtfeld M, Brennand K, Hochedlinger K. (2008) Reprogramming of pancreatic beta cells into induced pluripotent stem cells. *Curr Biol*, 18(12):890–894.

Su ST, Ying HY, Chiu YK, Lin FR, Chen MY, Lin KI. (2009) Involvement of histone demethylase LSD1 in Blimp-1-mediated gene repression during plasma cell differentiation. *Mol Cell Biol*, 29(6):1421-1431.

Surani MA, Hajkova P. (2010) Epigenetic reprogramming of mouse germ cells toward totipotency. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 75:211-218.

Taapken SM, Nisler BS, Newton MA, Sampsel-Barron TL, Leonhard KA, McIntire EM, Montgomery KD. (2011) Karyotypic abnormalities in human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, 29(4):313–314.

Takahashi K, Yamanaka S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4):663-676.

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131(5):861–872.

Takashima Y, Guo G, Loos R, Nichols J, Ficiz G, Krueger F, Oxley D, Santos F, Clarke J, Mansfield W, Reik W, Bertone P, Smith A. (2014) Resetting transcription factor control circuitry toward ground-state pluripotency in human. *Cell*, 158(6):1254–1269.

Tam PP, Snow MH. (1981) Proliferation and migration of primordial germ cells during compensatory growth in mouse embryos. *J Embryol Exp Morphol*, 64:133-47.

Tapia N, Schöler HR. (2016) Molecular obstacles to clinical translation of iPSCs. *Cell Stem Cell*, 19(3):298-309.

Taranger CK, Noer A, Sorensen AL, Hakelien A-M, Boquest AC, Collas P. (2005) Induction of dedifferentiation, genome-wide transcriptional programming, and epigenetic reprogramming by extracts of carcinoma and embryonic stem cells. *Mol Biol Cell*, 16(12):5719–5735.

Tian H, Hammer RE, Matsumoto AM, Russell DW, McKnight SL. (1998) The hypoxia-responsive transcription factor EPAS1 is essential for catecholamine homeostasis and protection against heart failure during embryonic development. *Genes Dev*, 12(21):3320-3324.

To KK, Sedelnikova OA, Samons M, Bonner WM, Huang LE. (2006) The phosphorylation status of PASB distinguishes HIF-1alpha from HIF-2alpha in NBS1 repression. *EMBO J*, 25(20):4784–4794.

Tonge PD, Corso AJ, Monetti C, Hussein SM, Puri MC, Michael IP, Li M, Lee DS, Mar JC, Cloonan N, Wood DL, Gauthier ME, Korn O, Clancy JL, Preiss T, Grimmond SM, Shin JY, Seo JS, Wells CA, Rogers IM, Nagy A. (2014) Divergent reprogramming routes lead to alternative stem-cell states. *Nature*, 516(7530):192-197.

Tsubooka N, Ichisaka T, Okita K, Takahashi K, Nakagawa M, Yamanaka S. (2009) Roles of Sall4 in the generation of pluripotent stem cells from blastocysts and fibroblasts. *Genes Cells*, 14(6):683–694.

Valdecantos MP, Pérez-Matute P, Quintero P, Martínez JA. (2010) Vitamin C, resveratrol and lipoic acid actions on isolated rat liver mitochondria: all antioxidants but different. *Redox Rep*, 15(5):207-216.

Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. (2009) Understanding the Warburg effect. The metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, 324(5930):1029–1033

Varela C, Denis JA, Polentes J, Feyeux M, Aubert S, Champon B, Piétu G, Peschanski M, Lefort N. (2012) Recurrent genomic instability of chromosome 1q in neural derivatives of human embryonic stem cells. *J Clin Invest*, 122(2):569–574.

Varum S, Momcilović O, Castro C, Ben-Yehudah A, Ramalho-Santos J, Navara CS. (2009) Enhancement of human embryonic stem cell pluripotency through inhibition of the mitochondrial respiratory chain. *Stem Cell Res*, 3(2-3):142-156.

Varum S, Rodrigues AS, Moura MB, Momcilovic O, Easley CA 4th, Ramalho-Santos J, Van Houten B, Schatten G. (2011) Energy metabolism in human pluripotent stem cells and their differentiated counterparts. *PLoS One*, 6(6):e20914.

Wanet A, Arnould T, Najimi M, Renard P. (2015) Connecting Mitochondria, Metabolism, and Stem Cell Fate. *Stem Cells Dev*, 24(17):1957-1971.

Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. (1995) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92(12):5510-5514.

Wang S, Xia P, Ye B, Huang G, Liu J, Fan Z. (2013) Transient activation of autophagy via Sox2-mediated suppression of mTOR is an important early step in reprogramming to pluripotency. *Cell Stem Cell*, 13(5):617–625.

Ward PS, Thompson CB. (2012) Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate. *Cancer Cell*, 21(3):297-308.

Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, Loh YH, Li H, Lau F, Ebina W, Mandal PK, Smith ZD, Meissner A, Daley GQ, Brack AS, Collins JJ, Cowan C, Schlaeger TM, Rossi DJ. (2010) Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell*, 7(5):618–630.

Watanabe S, Umehara H, Murayama K, Okabe M, Kimura T, Nakano T. (2006) Activation of Akt signaling is sufficient to maintain pluripotency in mouse and primate embryonic stem cells. *Oncogene*, 25(19):2697–2707.

West JA, Viswanathan SR, Yabuuchi A, Cunniff K, Takeuchi A, Park IH, Sero JE, Zhu H, Perez-Atayde A, Frazier AL, Surani MA, Daley GQ. (2009) A role for Lin28 in primordial germ-cell development and germ-cell malignancy. *Nature*, 460(7257):909–913.

Westfall SD, Sachdev S, Das P, Hearne LB, Hannink M, Roberts RM, Ezashi T. (2008) Identification of oxygen-sensitive transcriptional programs in human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev*, 17(5):869-881.

Wilmut I, Beaujean N, de Sousa PA, Dinnyes A, King TJ, Paterson LA, Wells DN, Young LE. (2002) Somatic cell nuclear transfer. *Nature*, 419(6907):583–586.

Wong N, De Melo J, Tang D. (2013) PKM2, a Central Point of Regulation in Cancer Metabolism. *Int J Cell Biol*, 2013:242513.

Xie X, Piao L, Cavey GS, Old M, Teknos TN, Mapp AK, Pan Q. (2014) Phosphorylation of Nanog is essential to regulate Bmi1 and promote tumorigenesis. *Oncogene*, 33(16):2040-2052.

Yabuta Y, Kurimoto K, Ohinata Y, Seki Y, Saitou M. (2006) Gene expression dynamics during germline specification in mice identified by quantitative single-cell gene expression profiling. *Biol Reprod*, 75(5):705–716.

Yamaguchi S, Kimura H, Tada M, Nakatsuji N, Tada T. (2005) Nanog expression in mouse germ cell development. *Gene Expr Patterns*, 5(5):639–646.

Yamanaka, S. (2012). Induced pluripotent stem cells: past, present, and future. *Cell Stem Cell*, 10:678–684.

Yan L, Vatner DE, Kim SJ, Ge H, Masurekar M, Massover WH, Yang G, Matsui Y, Sadoshima J, Vatner SF. (2005) Autophagy in chronically ischemic myocardium. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102(39):13807-13812.

Yanes O, Clark J, Wong DM, Patti GJ, Sánchez-Ruiz A, Benton HP, Trauger SA, Desponts C, Ding S, Siuzdak G. (2010) Metabolic oxidation regulates embryonic stem cell differentiation. *Nat Chem Biol*, 6(6):411-417.

Yang W, Xia Y, Cao Y, Zheng Y, Bu W, Zhang L, You MJ, Koh MY, Cote G, Aldape K, Li Y, Verma IM, Chiao PJ, Lu Z. (2012). EGFR-induced and PKCε monoubiquitylation-dependent NF-κB activation upregulates PKM2 expression and promotes tumorigenesis. *Mol Cell*, 48(5):771-784.

Yeom YI, G Fuhrmann, CE Ovitt, A Brehm, K Ohbo, M Gross, K Hubner, HR Scholer. (1996) Germline regulatory element of Oct-4 specific for the totipotent cycle of embryonal cells. *Development*, 122(3):881–894.

Ying QL, Nichols J, Evans EP, Smith AG. (2002) Changing potency by spontaneous fusion. *Nature*, 416(6880):545–548.

Yoshida Y, Takahashi K, Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. (2009) Hypoxia enhances the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 5(3):237-241.

Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. (2007) Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 318(5858):1917–1920.

Zhang H, Gao P, Fukuda R, Kumar G, Krishnamachary B, Zeller KI, Dang CV, Semenza GL. (2007) HIF-1 inhibits mitochondrial biogenesis and cellular respiration in VHL-deficient renal cell carcinoma by repression of c-Myc activity. *Cancer Cell*, 11(5):407-420.

Zhang H, Bosch-Marce M, Shimoda LA, Tan YS, Baek JH, Wesley JB, Gonzalez FJ, Semenza GL. (2008) Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *J Biol Chem*, 283(16):10892-10903.

Zhang J, Nuebel E, Daley GQ, Koehler CM, Teitell MA. (2012) Metabolic regulation in pluripotent stem cells during reprogramming and self-renewal. *Cell Stem Cell*, 11(5):589-595.

Zhao Y, Yin X, Qin H, Zhu F, Liu H, Yang W, Zhang Q, Xiang C, Hou P, Song Z, Liu Y, Yong J, Zhang P, Cai J, Liu M, Li H, Li Y, Qu X, Cui K, Zhang W, Xiang T, Wu Y, Zhao Y, Liu C, Yu C, Yuan K, Lou J, Ding M, Deng H. (2008) Two supporting factors greatly improve the efficiency of human iPSC generation. *Cell Stem Cell*, 3(5):475–479.

Zhao XY, Li W, Lv Z, Liu L, Tong M, Hai T, Hao J, Guo CL, Ma QW, Wang L, Zeng F, Zhou Q. (2009) iPSCs produce viable mice through tetraploid complementation. *Nature*, 461(7260):86–90.

Zhao T, Zhang ZN, Rong Z, Xu Y. (2011) Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature*, 474(7350):212–215.

Zhao T, Zhu Y, Morinibu A, Kobayashi M, Shinomiya K, Itasaka S, Yoshimura M, Guo G, Hiraoka M, Harada H. (2014) HIF-1-mediated metabolic reprogramming reduces ROS levels and facilitates the metastatic colonization of cancers in lungs. *Sci Rep*, 4:3793.

Zhao T, Zhang ZN, Westenskow PD, Todorova D, Hu Z, Lin T, Rong Z, Kim J, He J, Wang M, Clegg DO, Yang YG, Zhang K, Friedlander M, Xu Y. (2015). Humanized Mice Reveal Differential Immunogenicity of Cells Derived from Autologous Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 17(3):353–359.

Zhong L, D'Urso A, Toiber D, Sebastian C, Henry RE, Vadysirisack DD, Guimaraes A, Marinelli B, Wikstrom JD, Nir T, Clish CB, Vaitheesvaran B, Iliopoulos O, Kurland I, Dor Y, Weissleder R, Shirihai OS, Ellisen LW, Espinosa JM, Mostoslavsky R. (2010) The histone deacetylase Sirt6 regulates glucose homeostasis via Hif1alpha. *Cell*, 140(2):280-293.

Zhou J, Zhang W, Liang B, Casimiro MC, Whitaker-Menezes D, Wang M, Lisanti MP, Lanza-Jacoby S, Pestell RG, Wang C. (2009) PPARgamma activation induces autophagy in breast cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 41(11):2334-2342.

Zhou W, Freed CR. (2009) Adenoviral gene delivery can reprogram human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*, 27(11):2667–2674.

# *Artículos*





ORIGINAL RESEARCH COMMUNICATION

# Hypoxia Induces Pluripotency in Primordial Germ Cells by HIF1 $\alpha$ Stabilization and Oct4 Deregulation

Pilar López-Iglesias,<sup>1,\*</sup> Yago Alcaina,<sup>1,\*</sup> Natalia Tapia,<sup>2,‡</sup> Davood Sabour,<sup>2,‡</sup> Marcos J. Arauzo-Bravo,<sup>2,‡</sup> Diego Sainz de la Maza,<sup>1</sup> Edurne Berra,<sup>3</sup> Analia Nunez O'Mara,<sup>3</sup> Manuel Nistal,<sup>1</sup> Sagrario Ortega,<sup>4</sup> Peter J. Donovan,<sup>5</sup> Hans R. Schöler,<sup>2,‡</sup> and Maria P. De Miguel<sup>1</sup>

## Abstract

**Aims:** To study the mechanisms of pluripotency induction, we compared gene expression in pluripotent embryonic germ cells (EGCs) and unipotent primordial germ cells (PGCs). **Results:** We found 11 genes  $\geq 1.5$ -fold overexpressed in EGCs. None of the genes identified was the Yamanaka genes but instead related to glycolytic metabolism. The prospect of pluripotency induction by cell metabolism manipulation was investigated by hypoxic culturing. Hypoxia induced a glycolytic program in PGCs in detriment of mitochondrial oxidative phosphorylation. We demonstrate that hypoxia alone induces reprogramming in PGCs, giving rise to hypoxia-induced EGC-like cells (hiEGLs), which differentiate into cells of the three germ layers *in vitro* and contribute to the internal cell mass of the blastocyst *in vivo*, demonstrating pluripotency. The mechanism of hypoxia induction involves HIF1 $\alpha$  stabilization and Oct4 deregulation. However, hiEGL cannot be passaged long term. Self-renewal capacity is not achieved by hypoxia likely due to the lack of upregulation of c-Myc and Klf4. Gene expression analysis of hypoxia signaling suggests that hiEGLs have not reached the stabilization phase of cell reprogramming. **Innovation and Conclusion:** Our data suggest that the two main properties of stemness, pluripotency and self-renewal, are differentially regulated in PGC reprogramming induced by hypoxia. *Antioxid. Redox Signal.* 22, 205–223.

## Introduction

UNDER SPECIFIC CONDITIONS, differentiated cells can be reverted to a less differentiated state by nuclear reprogramming. The genetic and epigenetic changes necessary for successful dedifferentiation can be achieved by several methods, such as somatic cell nuclear transfer [for reviews, see refs. (39, 73)], cell fusion with pluripotent cells (77), incubation with pluripotent cell extracts (70), or derivation of pluripotent embryonic germ cells (EGCs) from unipotent primordial germ cells (PGCs) by the addition of a specific cocktail of growth factors (51, 59). More recently, studies on

the different genes involved in reprogramming has led to the identification of a defined set of transcription factors that can convert a mature fibroblast into a pluripotent state, giving rise to the so-called induced pluripotent stem cells (iPSCs) (68, 69). The four factors used were *Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, and *c-Myc*. In parallel, Yu *et al.* (79) also created iPSCs using another set of four genes (this time *Oct4*, *Sox2*, *Nanog*, and *Lin28*).

In addition to fibroblasts, different cell lineages have been recently reprogrammed to a pluripotent state, such as murine liver and stomach cells (2), pancreatic  $\beta$  cells (66), and lymphocytes (30). Nonterminally differentiated B cells were successfully reprogrammed with the four factors, but

<sup>1</sup>Cell Engineering Laboratory, IdiPaz, La Paz Hospital Research Institute, Madrid Spain.

<sup>2</sup>Department of Cell and Developmental Biology, Max Planck Institute for Molecular Biomedicine, Münster, Germany.

<sup>3</sup>Centro de Investigación Cooperativa en Biociencias CIC bioGUNE, Parque Tecnológico de Bizkaia-Ed., Derio, Spain.

<sup>4</sup>Biotechnology Program, CNIO, Madrid, Spain.

<sup>5</sup>Sue and Bill Gross Stem Cell Research Center, University of California Irvine, Irvine, California.

\*These two authors contributed equally to the work.

<sup>‡</sup>Current affiliation: Group of Computational Biology and Bioinformatics, Biodonostia Research Institute, San Sebastian, Spain and Ikerbasque, Basque Foundation for Science, Bilbao, Spain.

### Innovation

Hypoxia signaling alone induces pluripotency in primordial germ cells. This effect is exerted by HIF1 stabilization, which in turn deregulates Oct4. However, full pluripotency is not achieved due to the lack of proliferation ability of the induced cells. Interestingly, our data suggest that pluripotency and immortality are two differentially regulated processes, the first one regulated mainly by Oct4 and the second by c-Myc and/or Klf4. Understanding separately these two stemness characteristics is of high interest, as it opens up the possibility of generating induced pluripotent stem cells with high differentiation potential but with low proliferation ability, which would be advantageous for cell therapy applications.

terminally differentiated B cells needed additional help through transduction with *C/EBP $\alpha$*  or *Pax5* knockdown (30). These results throw light on the fact that different initial cell fates yield different reprogramming efficiency. Cells in a more primitive state could be more easily dedifferentiated as demonstrated by Eminli *et al.* (22) who reprogrammed neural progenitor cells (NPCs) in the absence of exogenous Sox2. This was possible because NPCs expressed high levels of endogenous Sox2. Moreover, these NPCs have recently been reprogrammed exclusively with Oct4 (37).

Accordingly, in the study of induction of pluripotency, an important model could be the use of PGCs, which already express pluripotency markers Oct4, Sox2, Nanog, and Lin28 (4, 17, 63, 72, 74, 75). Despite pluripotent gene expression, PGCs are unipotent cells, as they only give rise to gametes but do not form embryoid bodies (EBs) and do not contribute to teratomas or chimeras (17, 18). However, PGCs are easily reprogrammed into pluripotent EGCs with a specific cocktail of growth factors—stem cell factor (SCF), leukemia inhibitory factor (LIF), and fibroblast growth factor 2 (FGF2)—without the need for gene manipulation (13, 14, 17, 59). The first two growth factors allow for survival and proliferation, whereas FGF2 induces the reprogramming [for a review, see ref. (12)]. This model represents an easy system of cellular reprogramming, with the only major drawbacks being the small numbers of PGCs available per embryo at the time of efficient reprogramming (50–100 cells at 8.5 days post-coitum [dpc] in mice) and that PGCs survive only a week in the culture (14, 19). Nevertheless, this model is very efficient in comparison to the classical iPSC model, allowing for further characterization of the reprogramming process.

Despite all these, little is known about the genetic and epigenetic mechanisms involved in proper PGC differentiation and which ones are altered in their induction into pluripotent cells either *in vitro* or *in vivo*.

The relationship between glycolysis and pluripotency has been studied in the Warburg effect when tumoral cells shift glucose metabolism from oxidative phosphorylation to glycolysis (3, 5). The possibility that the manipulation of cell metabolism could be a way of inducing cellular reprogramming is very exciting, as it circumvents the classical use of oncogenes and retroviruses. Recently, it has been reported that the inhibition of oxidative pathways is important in maintaining pluripotency (76) and that the metabolic switch precedes pluripotent gene expression during iPSC derivation

(24). In particular, it has been described that energy metabolism shifts from oxidative phosphorylation to glycolysis during the first step of reprogramming (55, 80). Reprogramming is also more efficient the closer the glycolytic and oxidative phosphorylation energy metabolism profile of the original somatic cells is to that of embryonic stem cell (ESC) (55), suggesting a type of metabolic memory. In fact, glycolysis promotion by hypoxia incubation has been described to enhance the generation of iPSC (78). Moreover, hypoxia has been reported to drive the expression of pluripotency genes *via* hypoxia-inducible factors (HIFs), the major signal transducers upon low oxygen tensions (25).

To search for new components of the reprogramming process, as PGCs already express most of the Yamanaka factors, we induced glycolysis in PGCs as a simple way to induce reprogramming. Our data show that hypoxia induces pluripotency but not immortalization in PGCs and suggest that the two main properties of stemness, pluripotency and self-renewal, are differentially regulated, the first one being induced by hypoxia. In PGCs, hypoxia stabilizes HIF1, which in turn induces deregulated expression of Oct4. Deregulated Oct4 expression is sufficient to induce pluripotency in these cells. However, self-renewal capacity is not achieved by hypoxia culture, probably due to the lack of upregulation of c-Myc and Klf4. Analysis of hypoxia signaling gene expression suggests that the first two phases of reprogramming, initiation and maturation, have been induced by hypoxia, whereas the last one, stabilization, has not. In the long term, this knowledge could help develop new, safer, and more efficient ways of producing iPSC.

### Results

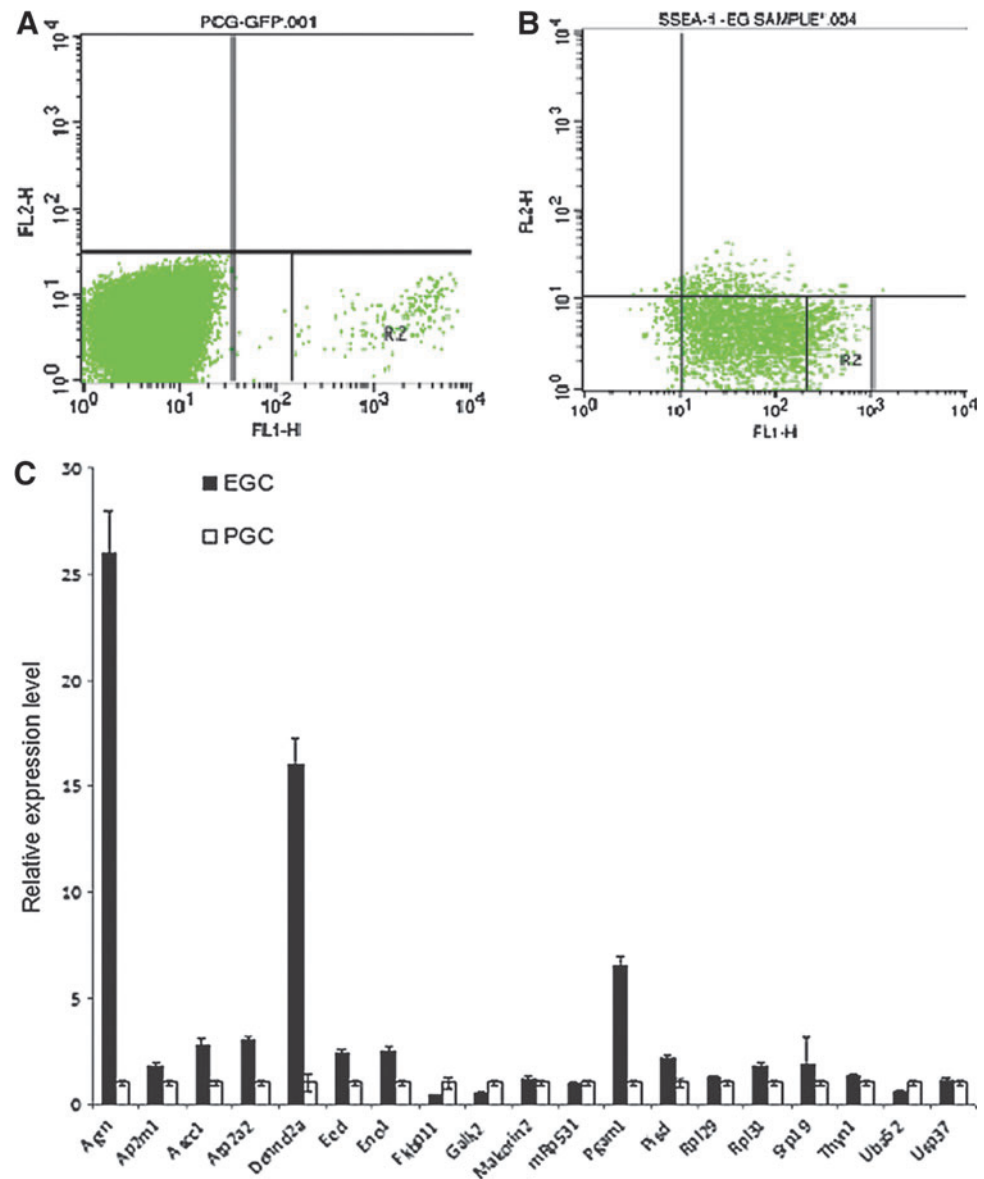
#### *Identification of differentially expressed genes in PGCs compared to EGCs reveals candidate genes for induction of pluripotency*

To determine which genes were differentially expressed in pluripotent EGCs compared to unipotent PGCs, we performed the subtraction hybridization assay. Genital ridges from 10.5 dpc OG2 mice were isolated and the Oct4-green fluorescent protein (GFP)-positive cells were sorted (Fig. 1A). EGCs were also sorted by stage-specific embryonic antigen A1 (SSEA1) labeling to enrich for undifferentiated cells (Fig. 1B). EGC RNA (tester) was subtracted with PGC RNA (driver). After subtraction, a decrease in the complexity of the EGC cDNA library was observed (Supplementary Fig. S1A; Supplementary Data are available online at [www.liebertpub.com/ars](http://www.liebertpub.com/ars)). The subtracted EGC cDNA library was cloned and inserts from 96 clones were blotted and hybridized with probes generated from unsubtracted EGCs and PGC cDNAs. Nineteen genes presented a  $\geq 1.5$ -fold increase in the hybridization level to EGC cDNA compared with the PGC cDNA (Supplementary Fig. S1B).

To validate the results, quantitative reverse transcription–polymerase chain reaction (qRT-PCR) was performed for all the 19 genes (for primers, see Supplementary Fig. S1C). Four genes corresponded to false positives (*Fkbp11*, *Galk2*, *mRpS31*, and *Uba52*). Another four genes (*Makorin2*, *Rpl29*, *Thyn1*, and *Usp37*) showed a difference lower than 1.5-fold, rendering 11 genes candidate for pluripotency induction (Fig. 1C).

Interestingly, the genes identified as overexpressed in pluripotent cells were neither of the Yamanaka factors,

**FIG. 1. Genes differentially expressed in EGCs compared to PGCs.** (A) GFP-positive cells corresponding to PGCs sortings. (B) SSEA-1-positive EGCs sorting. (C) Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction analysis of the genes obtained from the subtraction hybridization assay between PGCs and EGCs. All genes are statistically significant at 95% confidence interval except for mRpS31, Srp19, and Usp37.  $\beta$ -Actin was used as the control to normalize the results. See also Supplementary Figure S1. EGC, embryonic germ cell; GFP, green fluorescent protein; PGC, primordial germ cell; SSEA1, stage-specific embryonic antigen A1. To see this illustration in color, the reader is referred to the web version of this article at [www.liebertpub.com/ars](http://www.liebertpub.com/ars)



suggesting that there are several ways to achieve cell reprogramming. On the contrary, the identified genes were mostly related to glycolytic metabolism, ribosomal molecules, transcription factors, and chromatin remodeling.

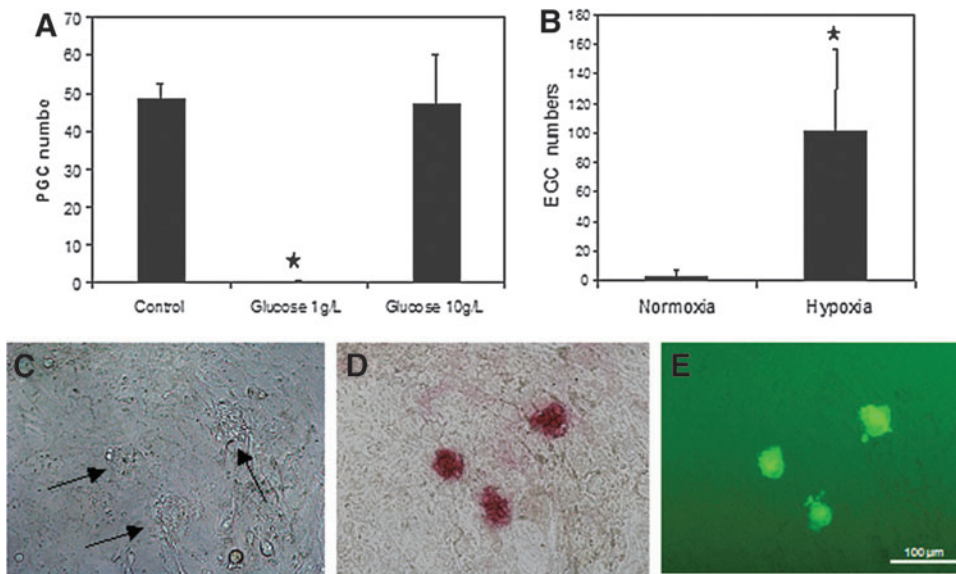
#### *Manipulation of PGC glucose metabolism induces EGC-like colony formation*

We started analyzing the effect of manipulation of the glucose availability in PGCs. Lowered levels of glucose in the media prevented PGC survival as expected (Fig. 2A). In addition, increased levels of glucose did not induce further PGC survival or proliferation, indicating that control glucose concentration is enough for supporting the PGC growth (Fig. 2A). As expected, even high concentrations of glucose did not induce the formation of EGC-like colonies (Supplementary Fig. S2A).

To promote glycolysis in PGCs, PGCs were cultured in conditions of anaerobic metabolism, incubating the cells

with pharmacological inhibitors of mitochondrial function. In addition, cultures were subjected to hypoxic conditions (3% O<sub>2</sub>) in an incubator. Inhibitor of mitochondrial function produced a strong toxic effect on the PGC cultures (Supplementary Fig. S2B, C), so no conclusion could be obtained. Antimycin A was not toxic for PGCs and induced EGC-like colonies, but not in a statistically significant manner (Supplementary Fig. S2D, E). Importantly, the formation of EGC-like colonies was achieved in hypoxia even in the absence of FGF2 (Fig. 2B), suggesting that hypoxia signaling alone is capable of reprogramming PGCs.

Hypoxia-induced EGC-like cells (hiEGLs) were normal in morphology (Fig. 2C) and alkaline phosphatase positive, a marker of pluripotency, as expected (Fig. 2D). Importantly, hiEGLs were GFP positive, indicating that they were Oct4 positive, a marker of pluripotency (Fig. 2E). However, as PGCs are also Oct4 (GFP) positive, in this case, the sole presence of Oct4 expression was not considered a definitive marker of pluripotency (see "Pluripotency indicated by



**FIG. 2. Hypoxic conditions induce EGC-like colonies formation.** (A) Low glucose has a negative effect on PGC survival, whereas high concentration has no statistical effect. (B) Hypoxic conditions induce EGC colonies formation in the absence of FGF2. Star: Significant difference  $p \leq 0.05$ . (C) Phase contrast microphotograph showing colonies (arrows), positive for alkaline phosphatase (D) and GFP(Oct4) positive (E). To see this illustration in color, the reader is referred to the web version of this article at [www.liebertpub.com/ars](http://www.liebertpub.com/ars)

hypoxia in PGCs is demonstrated by *in vitro* differentiation and *in vivo* blastocyst integration”).

In addition, hypoxia alone was capable of upregulating half of the genes candidate for pluripotency found in the  $V_{SHH}$  comparison (Table 1), suggesting that hypoxia can partially induce an EGC phenotype in PGCs.

*Hypoxic conditions are required continuously to achieve pluripotency induction in PGCs*

To ascertain the required duration of hypoxia exposure for EGC-like colony formation, PGCs were subjected to hypoxic conditions for only the first 24 h of culture. Hypoxia exposure for 24 h neither increased total cell numbers (Fig. 3A) nor induced pluripotency (Fig. 3B). Kinetics of pluripotency induction only showed a statistically significant increase in total cell numbers, PGCs, and pluripotent EGC numbers after 7 days in the culture (Fig. 3C–E).

TABLE 1. MICROARRAY DATA OF PLURIPOTENCY CANDIDATE GENES FROM  $V_{SHH}$  IN PRIMORDIAL GERM CELLS VERSUS PRIMORDIAL GERM CELLS EXPOSED TO HYPOXIC CONDITIONS (HYPOXIA-INDUCED EMBRYONIC GERM CELL-LIKE CELL)

	PGC 11.5	hiEGL 1	hiEGL 2
Agri	10.9 ± 0	12.7 ± 0.1 <sup>a</sup>	12.8 ± 0 <sup>a</sup>
Ap2m1	7.8 ± 0.1	7.6 ± 0	6.7 ± 0.1 <sup>a</sup>
Ascc1	7.4 ± 0.1	8.9 ± 0 <sup>a</sup>	9 ± 0 <sup>a</sup>
Atp2a2	6.1 ± 0	9.8 ± 0.1 <sup>a</sup>	9.5 ± 0 <sup>a</sup>
Dennd2a	8.3 ± 0.2	8.4 ± 0	8.4 ± 0
Eed	7.6 ± 0.3	9.5 ± 0 <sup>a</sup>	9.2 ± 0 <sup>a</sup>
Pgam1	8.3 ± 0.1	7.5 ± 0.1 <sup>a</sup>	8.3 ± 0.1
Rpl31	2.2 ± 0.4	1.6 ± 0.3	1.6 ± 0.1
Srp19	3.4 ± 1.1	3.6 ± 0.2	4.1 ± 0.5
Hif1 $\alpha$	6.3 ± 0.4	1.8 ± 0.2 <sup>a</sup>	1.9 ± 0.7 <sup>a</sup>

The change values of expression in a logarithmic scale of 2 obtained from the numerical data of the Heat Map of the microarray are shown. Data are shown as mean ± SE.

<sup>a</sup>Difference significant respect to PGCs, Student's *t*-test  $p \leq 0.05$ .

hiEGL, hypoxia-induced embryonic germ cell-like cell; PGC, primordial germ cell.

Pluripotency induction efficiency was studied by culturing one PGC per well in the 384-well Terasaki plates. Hypoxic conditions induced hiEGL colonies with an efficiency of 6.9% (Fig. 3F), an efficiency much higher than that described with FGF2 (12).

To rule out possible indirect effects of the Sandoz thioguanine-resistant ouabain-resistant cells (STO) monolayer on PGCs in the hypoxia cultures, normoxic cultures were exposed to supernatant of STO cultured in normoxia or hypoxia for 7 days. No induction of pluripotent colonies was observed (Fig. 3G).

*Hypoxia promotes a metabolic switch from oxidative phosphorylation toward glycolysis in PGCs*

As expected, hypoxia culturing upregulated many glycolysis genes and downregulated others related to mitochondrial respiration and electron transport in PGCs, as demonstrated by microarray analysis (Table 2).

In addition, we performed immunofluorescence against phospho-pyruvate dehydrogenase (P-PDH), a key enzyme that links the tricarboxylic acid cycle with glycolysis. PDH is located after the end of the glycolytic pathway, so it marks the initial step before triggering the tricarboxylic acid cycle, so a phosphorylated form shows that the tricarboxylic acid cycle is impaired in favor of glycolysis. PDH is located in the mitochondrial matrix and catalyzes the irreversible decarboxylation of pyruvate into acetyl CoA. We found that P-PDH is present in PGCs exposed to hypoxia but not under normoxic conditions (Fig. 4A).

In addition, metabolic adaptation at the mitochondrial level was further investigated by looking at the mitochondrial membrane potential. A shift toward inactive mitochondria was observed under hypoxia conditions, as shown by JC-1 labeling and fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis (Fig. 4B).

Reactive oxygen species (ROS) were found to be higher in PGCs under normoxia versus hypoxia (Fig. 4C), in agreement with the notion that pluripotent stem displays reduced levels of ROS (23).

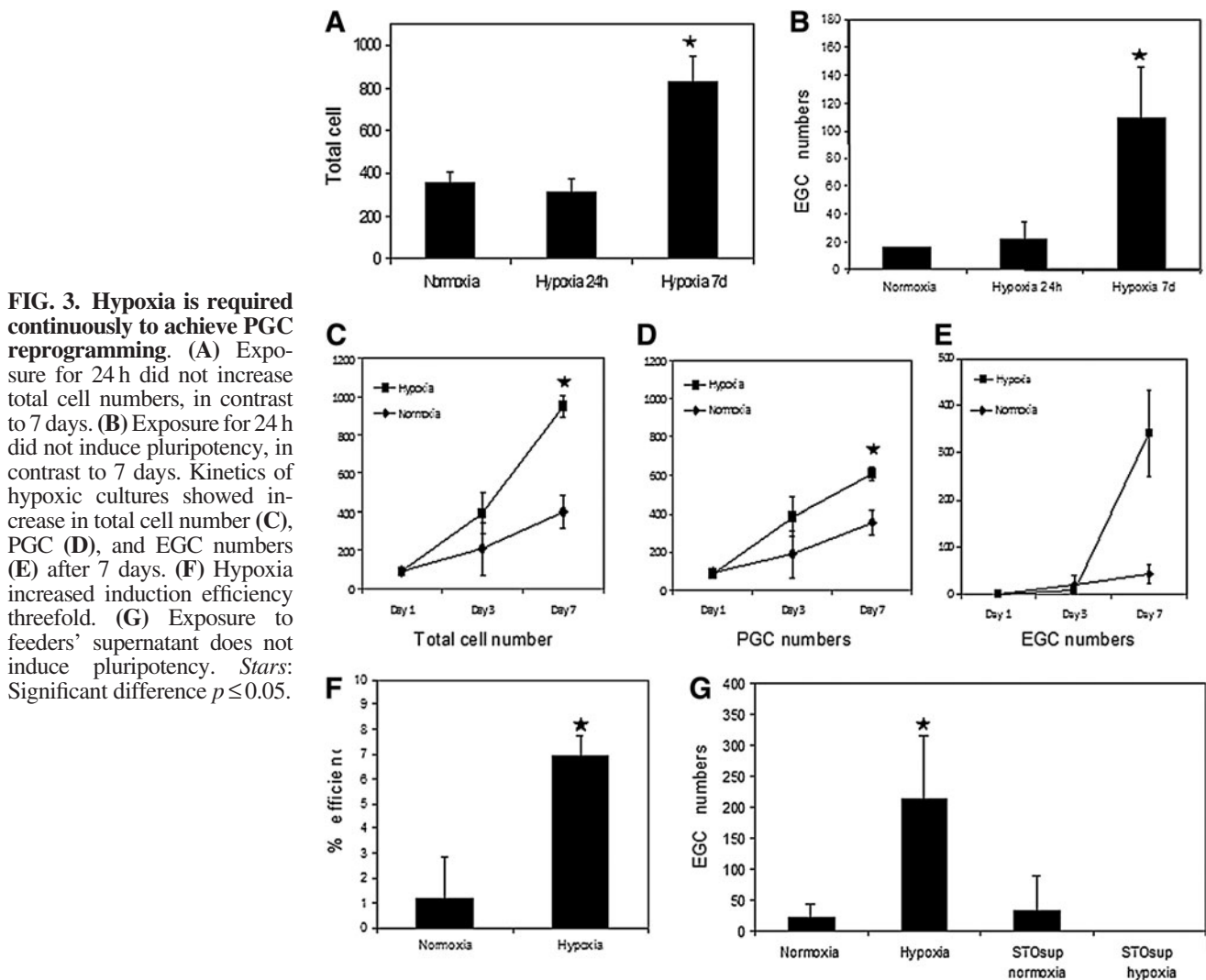


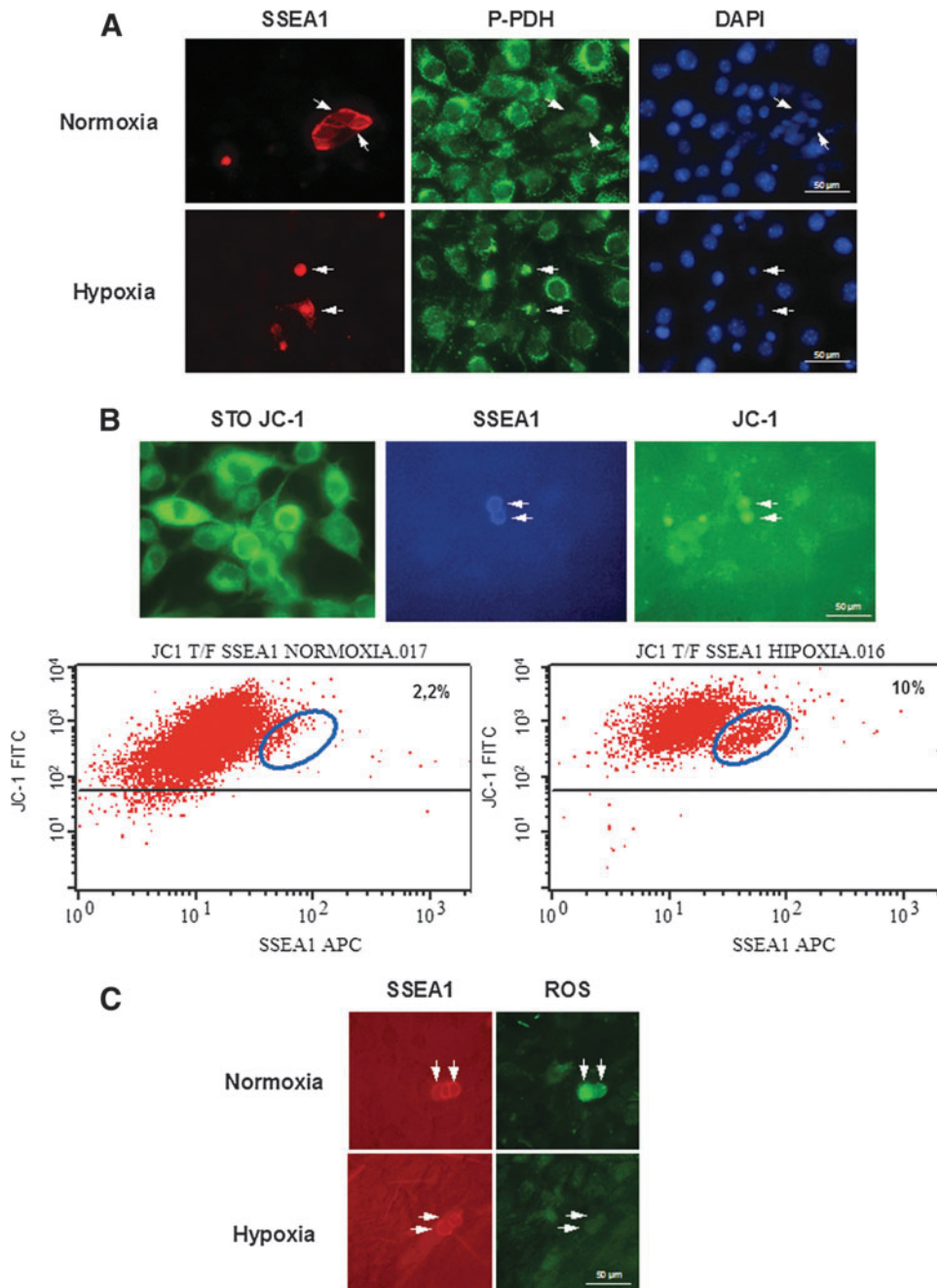
TABLE 2. MICROARRAY DATA OF GLYCOLYSIS AND MITOCHONDRIAL RESPIRATION GENES IN PRIMORDIAL GERM CELLS VERSUS HYPOXIA-INDUCED EMBRYONIC GERM CELL-LIKE CELL

	<i>PGC 11.5</i>	<i>hiEGL 1</i>	<i>hiEGL 2</i>	<i>EGC</i>	<i>ESC</i>	<i>EpiSC</i>
Aldoa	11 ± 0	11.3 ± 0.3	11.6 ± 0 <sup>a</sup>	11.6 ± 0 <sup>a</sup>	12.1 ± 0 <sup>a</sup>	12.7 ± 0.1 <sup>a</sup>
Aldoc	3.4 ± 2	5.5 ± 0	6 ± 0.1	6.7 ± 0.1	5.4 ± 0.1	9.3 ± 0.3
Eno2	3.2 ± 1.3	11.3 ± 0.3 <sup>a</sup>	12.4 ± 0.1 <sup>a</sup>	8.4 ± 0	4.1 ± 0.4	6.7 ± 0.5
Gapdh	11.9 ± 0.1	12.9 ± 0.1 <sup>a</sup>	13.1 ± 0 <sup>a</sup>	13 ± 0 <sup>a</sup>	13 ± 0 <sup>a</sup>	13.4 ± 0 <sup>a</sup>
Gys1	4 ± 1.3	2.4 ± 0	2.3 ± 0.2	2.4 ± 0.3	4.9 ± 0.1	5.2 ± 0.6
Pfkfb3	1.4 ± 0.3	4.1 ± 0.5	4.6 ± 0.4 <sup>a</sup>	3.5 ± 0 <sup>a</sup>	3.4 ± 0.3 <sup>a</sup>	3.2 ± 0.2 <sup>a</sup>
Pfkl	9.4 ± 0.3	11.8 ± 0.2 <sup>a</sup>	12.5 ± 0 <sup>a</sup>	11.6 ± 0 <sup>a</sup>	10.7 ± 0.4	11.8 ± 0.2 <sup>a</sup>
Tpi1	9.5 ± 0.5	13.2 ± 0.2 <sup>a</sup>	13.8 ± 0 <sup>a</sup>	12.3 ± 0.1 <sup>a</sup>	12.1 ± 0.1 <sup>a</sup>	13.1 ± 0.2 <sup>a</sup>
Ldha	9.5 ± 0.3	11 ± 0 <sup>a</sup>	12.1 ± 0 <sup>a</sup>	12 ± 0.1 <sup>a</sup>	12.8 ± 0.3 <sup>a</sup>	13.7 ± 0 <sup>a</sup>
Nos2	1.2 ± 0.3	2.5 ± 0.3	3.5 ± 0.5	3 ± 0.3	2.3 ± 0.3	2.1 ± 0.3
Nos3	5 ± 1.4	4.1 ± 0.1	4.5 ± 0.2	3.5 ± 0.2	2.3 ± 0.5	4.7 ± 0.3
Pdk1	7.7 ± 0.1	7.5 ± 0	9.1 ± 0 <sup>a</sup>	8.6 ± 0 <sup>a</sup>	8 ± 0 <sup>a</sup>	9.3 ± 0.1 <sup>a</sup>
Sdhb	8.7 ± 0.4	8.2 ± 0	7.6 ± 0.1	8 ± 0	9.1 ± 0.1	9.3 ± 0.2

Comparison with EGC, ESC, and EpiSC is also shown. The change values of expression in a logarithmic scale of 2 obtained from the numerical data of the Heat Map of the microarray are shown. Data are shown as mean ± SE.

<sup>a</sup>Difference significant respect to PGCs, Student's *t*-test  $p \leq 0.05$ .

EGC, embryonic germ cell; EpiSC, epiblast-derived stem cell; ESC, embryonic stem cell.



**FIG. 4. Hypoxia induces glycolysis in PGCs.** (A) P-PDH is present in PGCs (SSEA1 positive, *arrows*) exposed to hypoxia but not under normoxic conditions. Note that the feeder immortalized STO cell line is glycolytic independent of oxygen concentration. (B) A shift toward inactive mitochondria in PGCs (*arrows*), was observed under hypoxia conditions as shown by JC-1 (*green*) labeling and FACS analysis. Mitochondrial depolarization is shown by increase in the green fluorescence under hypoxic conditions (C) Reprogramming was accompanied by a decrease in ROS in hiEGL (*arrows*). FACS, fluorescence-activated cell sorting; P-PDH, phospho-pyruvate dehydrogenase. To see this illustration in color, the reader is referred to the web version of this article at [www.liebertpub.com/ars](http://www.liebertpub.com/ars)

*Pluripotency induced by hypoxia in PGCs is demonstrated by in vitro differentiation and in vivo blastocyst integration*

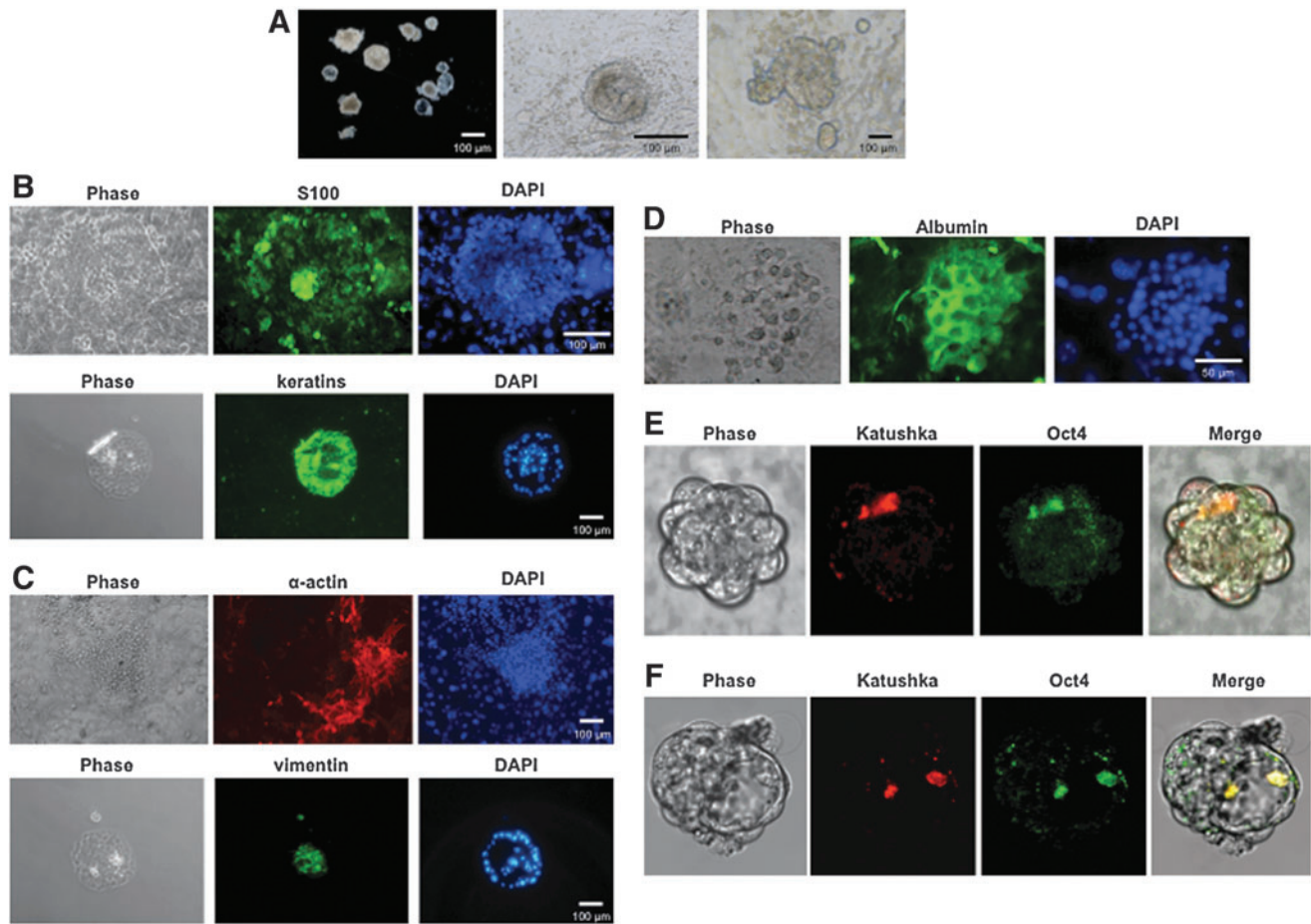
hiEGLs were functionally characterized as fully pluripotent by inducing their differentiation *in vitro* toward cells of the three germ layers. EBs were successfully derived under hypoxic conditions in as short as 3 days (Fig. 5A). EBs were allowed to differentiate spontaneously, and pluripotency was effectively demonstrated by immunohistochemistry against markers for ectoderm (S100 and cytokeratins, Fig. 5B), mesoderm ( $\alpha$ -actin and vimentin, Fig. 5C), and less frequently, endoderm (albumin, Fig. 5D).

To prove *in vivo* pluripotency, Oct4-GFP mice were crossed with Katushka mice (15), generating double transgenics in which all cell fluorescence was red and pluripotent

cell fluorescence was green as well. hiEGLs from these mice were aggregated to C57BL6 morulae, giving rise to blastocyst integration in the internal cell mass (ICM), displaying Oct4-GFP expression (Fig. 5E, F), demonstrating *in vivo* pluripotency as well.

*Hypoxia signaling promotes Oct4 deregulation in PGCs*

To further dissect the mechanism of hypoxia-induced pluripotency in PGCs, we looked at Oct4 expression. In normoxia, most PGCs were homogeneously Oct4-GFP positive (Fig. 6A), as previously described (60). In contrast, in hypoxic culture conditions, the levels of Oct4 statistically increased in range (Fig. 6B), showing both high and low Oct4 expressing cells.



**FIG. 5. Hypoxia induces pluripotency in PGCs.** (A) Phase contrast images of embryoid bodies derived under hypoxic conditions. (B–D) Embryoid bodies differentiation. (B) Ectodermic (S100 and cytokeratins), (C) mesodermal (sarcomeric  $\alpha$ -actin and vimentin), and (D) endodermal (albumin) lineages. C57 Morula aggregation (E) and blastocyst ICM integration (F) of double transgenic Oct4-GFP/Katushka hypoxia-induced PGCs. ICM, internal cell mass of the blastocyst. To see this illustration in color, the reader is referred to the web version of this article at [www.liebertpub.com/ars](http://www.liebertpub.com/ars)

To ascertain which of such populations were responsible for hiEGL generation, isolated single Oct4-GFP PGCs were cultured and GFP expression was monitored every day in each PGC. Surprisingly, the majority of hiEGL colonies came from PGCs with low GFP (Oct4) expression (Fig. 6E), suggesting that the downregulation of Oct4 in PGCs by hypoxia is responsible for their reprogramming.

#### *Hypoxia signaling induction of pluripotency in PGCs is mediated by HIFs*

As HIFs are the main transducers of cellular adaptation to hypoxia, to ascertain the implication of HIFs in the hiEGL generation, cultures were supplemented with the HIF pharmacological inhibitor, mithramycin. As expected, in normoxic conditions, mithramycin did not have any effect on PGC numbers (Fig. 7A). In contrast, the positive effect of hypoxia in PGC growth was abolished in the presence of mithramycin (Fig. 7A), indicating that in PGCs, hypoxia signaling is mediated by HIFs. Moreover, fewer hiEGL colonies were observed by mithramycin incubation under hypoxic conditions (Fig. 7B), suggesting that the induction of pluripotency achieved by hypoxia is mediated by HIFs.

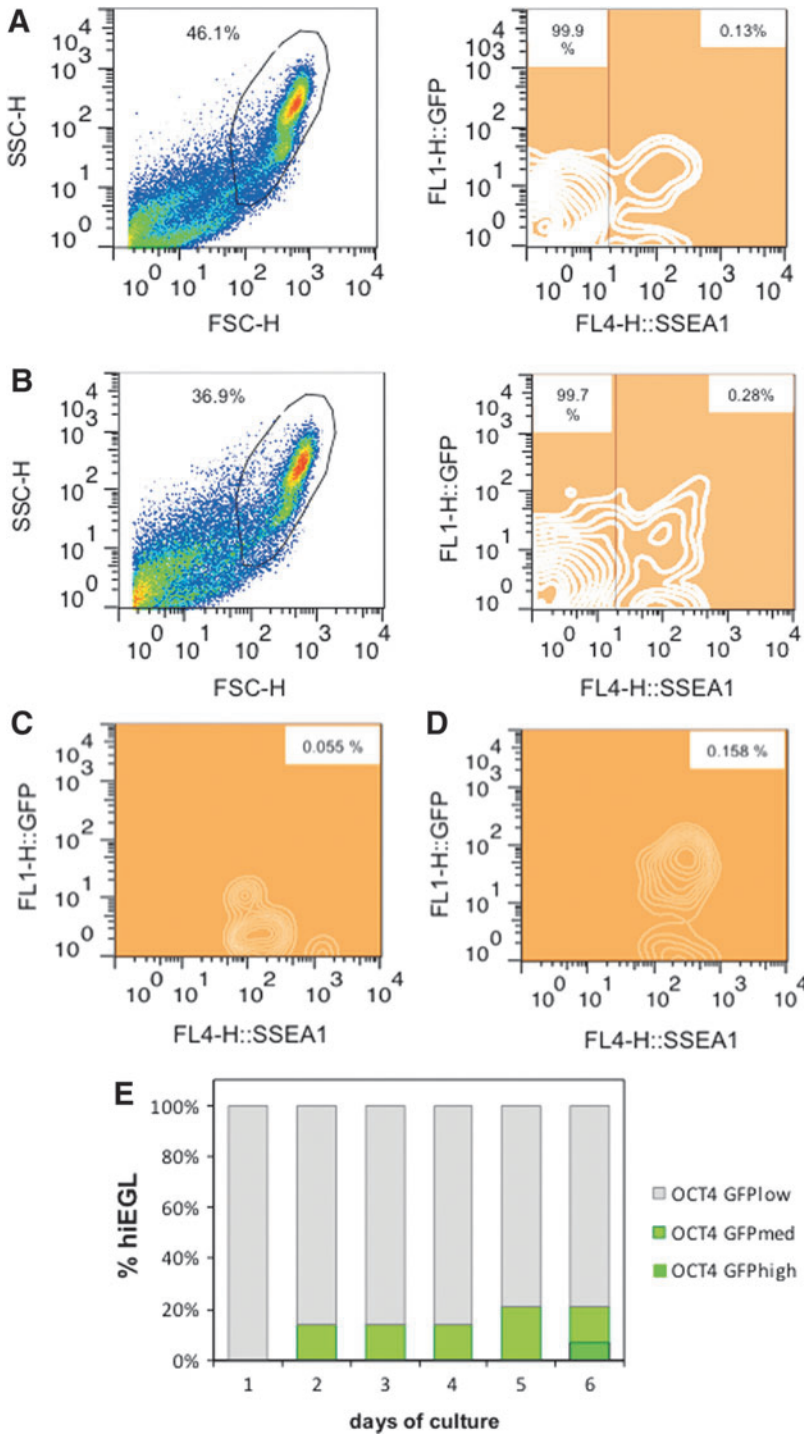
Conversely, incubation with an inhibitor of HIF degradation, dimethylxallylglycine (DMOG), in normoxic conditions, induced similar EGC numbers to hypoxia, mimicking its effect (Fig. 7C).

In concurrence with this, immunofluorescence against HIF1 $\alpha$  in our cultures showed HIF1 $\alpha$  expression in PGCs exclusively under hypoxic conditions at 24 h as expected but also maintained, unexpectedly, at 7 days (Fig. 7D), suggesting that HIF1 is responsible for hypoxia signaling in PGCs.

To implicate HIFs in the Oct4 deregulation, we performed experiments under hypoxia with the HIF inhibitor mithramycin or normoxia with the HIF activator DMOG. Under these conditions, inhibition of HIF in hypoxia mimicked the narrow Oct4 levels in normoxia, and conversely, HIF activator in normoxia mimicked the Oct4 broader levels in hypoxia (Fig. 6C, D).

#### *Hypoxia signaling alone does not induce hiEGL immortality*

hiEGLs were successfully passaged, but only up to passage 2, either in standard EGC media or in stem cell improved media (45), including 2i (GSK3 and MEK inhibitors) and LIF. This last medium did not statistically improve the EGC generation efficiency under hypoxic conditions (Supplementary Fig. S3A, B). These data could mean that



**FIG. 6. Hypoxia induces Oct4 deregulation in PGCs.** Density (*left*) and contour plots (*right*) of FACS analysis of SSEA1 and Oct4-GFP in PGCs cultured in normoxia (**A**) or hypoxia (**B**). Note increment in range of Oct4-GFP expression in PGCs (SSEA1-positive cells) under hypoxia in the *right panel* contour plot. (**C**) Oct4-GFP expression in cultures exposed to hypoxia and the HIF inhibitor mithramycin. (**D**) Oct4-GFP expression in cultures exposed to normoxia and the HIF activator DMOG. Note change of the range respect to that of respective oxygen concentration. (**E**) Oct4-GFP expression in isolated PGCs cultured in hypoxia. Only PGCs giving rise to EGL colonies are depicted. Most colonies were obtained from PGCs showing low Oct4-GFP expression. HIF, hypoxia-inducible factors; DMOG, dimethylxalylglycine. To see this illustration in color, the reader is referred to the web version of this article at [www.liebertpub.com/ars](http://www.liebertpub.com/ars)

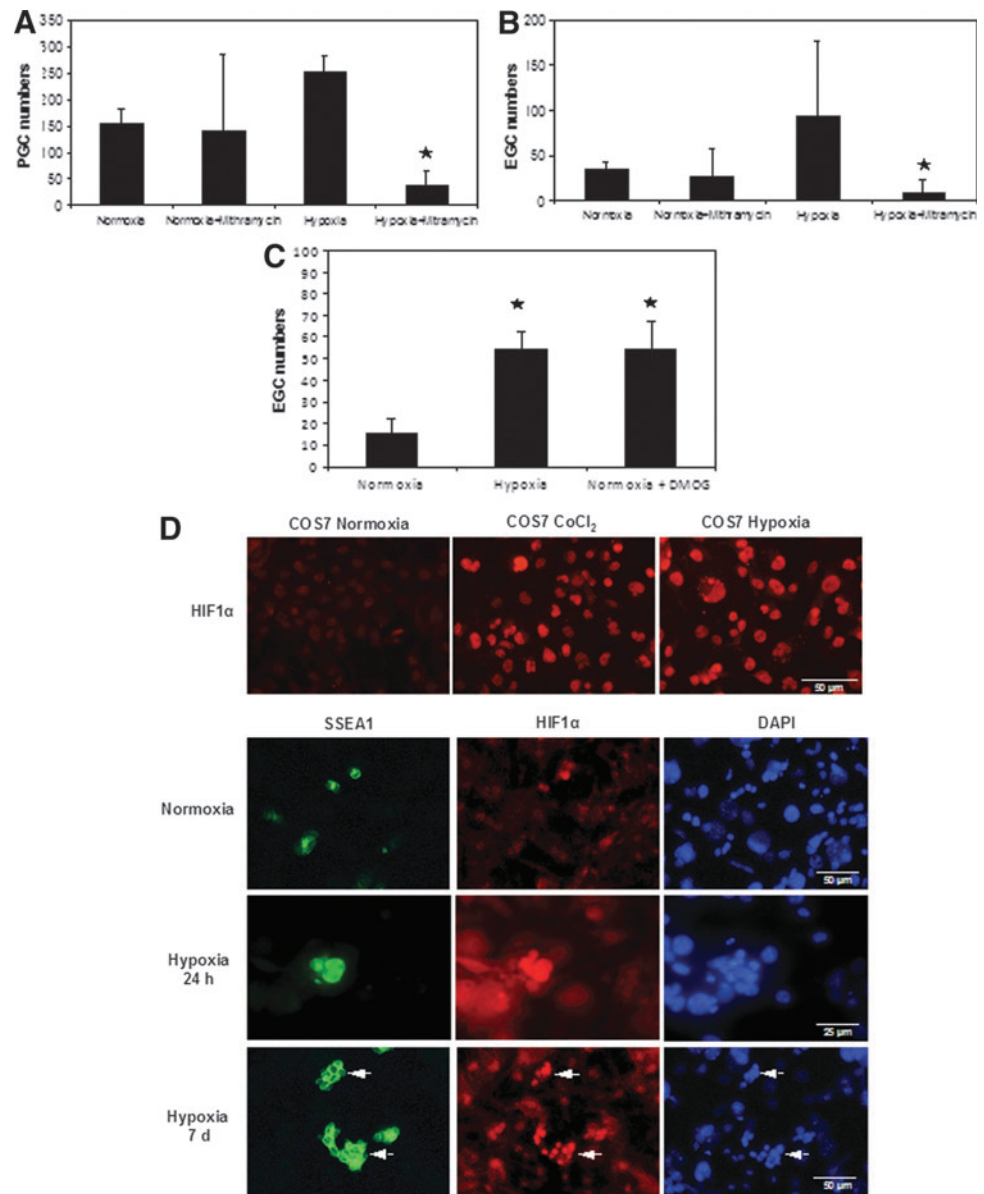
hypoxic culturing of PGCs induces other types of pluripotent stem cells, that is, epiblast-derived stem cell (EpiSC) (6, 71), instead of true EGC. Subsequently, the lack of survival after passaging would be due to inadequate culture conditions. To test this, we cultured PGCs under hypoxic conditions in EpiSC culture media (27, 71). Not only did EpiSC not arise but also additional PGC and EGC numbers were very low after 1 week in the culture (Fig. 8A, B), suggesting that our pluripotent colonies were not EpiSC. Moreover, in contrast to EpiSC (and similar to EGCs), our colonies demonstrated both a high expression of tissue nonspecific alkaline phosphatase (Fig. 2D) and also of the early germ line marker, c-Kit

(Fig. 8C), suggesting that in fact our hiEGLs are true EGCs (although with limited self-renewal ability).

*Hypoxia exposure does not induce Klf4 or c-Myc upregulation in PGCs*

Further explanation for the lack of immortality induction by hypoxia is that hypoxia causes differentiation of the newly formed EGCs by downregulation of the LIF receptor, as it does happen in ESC subjected to hypoxia. In fact, we found downregulation of leukemia inhibitory factor receptor (LIFR) in hiEGL (Fig. 8D), accounting for the differentiation-prone characteristics of hiEGL (Fig. 5A).





**FIG. 7. Induction of pluripotency in PGCs is mediated by HIFs.** Mithramycin does not affect PGC numbers in normoxia, whereas it negatively affects the PGC growth (A) and EGC formation (B). (C) The inhibitor of HIF degradation, DMOG, mimics hypoxia in normoxic conditions. Stars: Significant difference  $p \leq 0.05$ . (D) HIF1 $\alpha$  is upregulated in PGCs under hypoxic conditions at 24 h and is maintained after 7 days (arrows). COS7 cells exposed to normoxia and hypoxia or the hypoxia-mimetic agent CoCl<sub>2</sub> for 4 h are shown as controls. To see this illustration in color, the reader is referred to the web version of this article at [www.liebertpub.com/ars](http://www.liebertpub.com/ars)

As PGCs are already Oct4, Sox2, and Nanog positive, the induction of expression of Klf4 or c-Myc by hypoxic conditions was also investigated by means of immunofluorescence. In contrast to ESC and EGC, neither Klf4 nor c-Myc protein expression could be detected (Fig. 9A, B), suggesting that these factors may be responsible for EGC immortality, but not for their pluripotency, and that hypoxia signaling does not induce these transcription factors in PGCs.

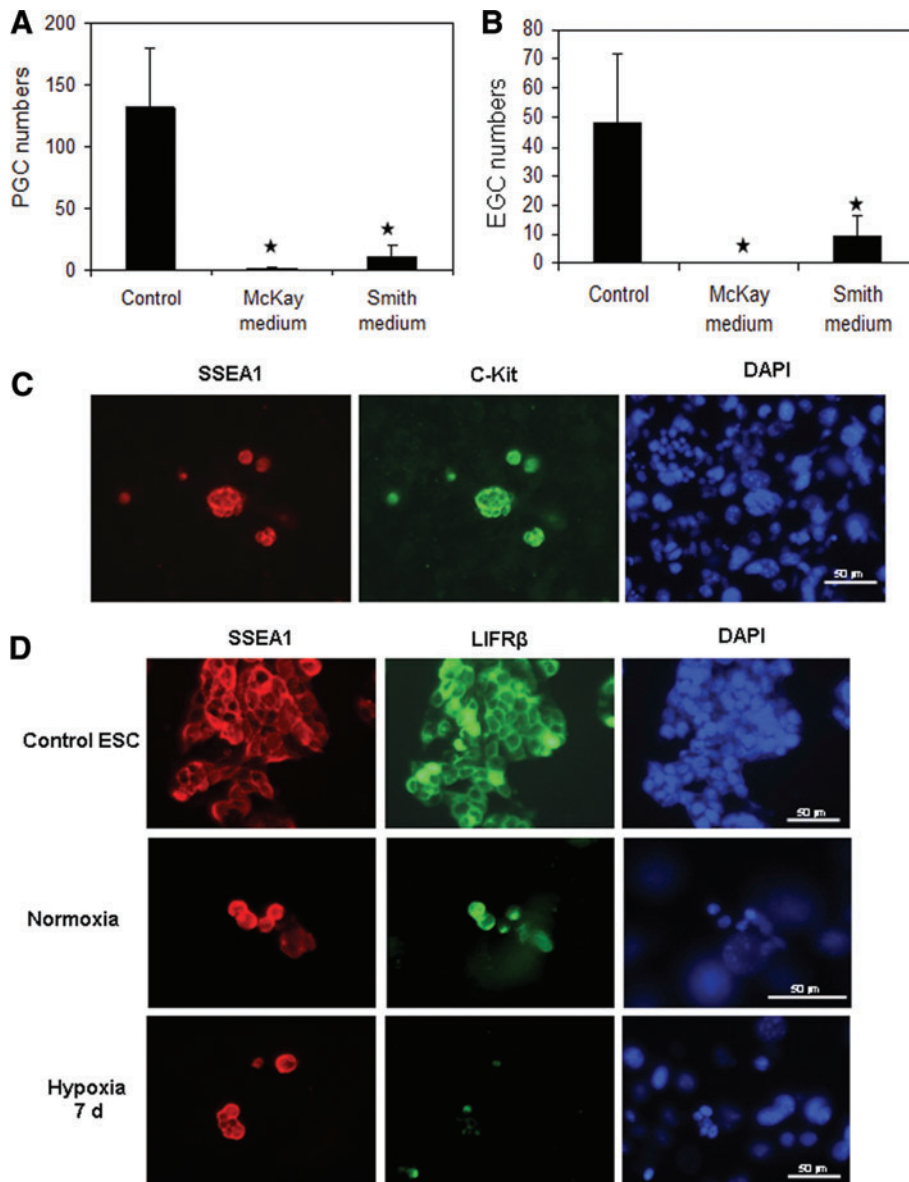
Interestingly, our results suggest that pluripotency and immortality are two differentially regulated processes, as our hiEGLs are able to differentiate into the three germ layers but cannot be cultured long term.

#### *Hypoxia-induced EGLs have reached the maturation phase but not the stabilization phase of cell reprogramming*

To characterize further the identity and the signaling of hypoxia in the reprogramming of PGCs, we performed

whole-genome microarray analysis comparison with true pluripotent and immortal EGC, ESC, EpiSC, and with unipotent and mortal 11.5 PGCs as a negative control (Fig. 10A). As expected, hiEGLs demonstrated grouping with EGCs (Fig. 10B). Pairwise scatter plot analysis showed a high number of gene changes induced by hypoxia (Fig. 10C). Many genes were still differently expressed among hiEGL and true EGC (Fig. 10D), and among hiEGL and EpiSC (Fig. 10E) and ESC (Fig. 10F).

Among important genes downregulated by hypoxia in PGCs was *Oct4* as expected based on our previous protein results (Figs. 6E and 10C; Table 3), whereas the rest of the Yamanaka genes—*c-Myc*, *Sox2*, and *Klf4*—maintained their low expression under hypoxic conditions (Table 3). Some pluripotency-related genes, such as *Cdh1* and *Gdf3*, maintained similar expression in PGCs under normoxia or hypoxia (hiEGL). Pluripotency genes upregulated by hypoxia included *Fbxo15*, *Dhx38*, *NFkB1*, and *Notch1* (Table 3). Other genes important for pluripotency, such as *p53*, were



**FIG. 8. Hypoxia-induced pluripotent cells are not EpiSCs.** EpiSC media have a negative effect on PGC (A) and EGC (B) cell numbers. Stars: Significant difference  $p \leq 0.05$ . (C) c-Kit is expressed in hypoxic PGC cultures. (D) LIF receptor is downregulated in PGCs under hypoxic conditions in contrast to high LIFR levels in normoxic PGCs and control ESC cells. EpiSC, epiblast-derived stem cell; LIF, leukemia inhibitory factor. To see this illustration in color, the reader is referred to the web version of this article at [www.liebertpub.com/ars](http://www.liebertpub.com/ars)

downregulated by hypoxia signaling (Table 3). Complete microarray data have been deposited in the NCBI's Gene Expression Omnibus and are accessible through GEO Series accession number GSE61472.

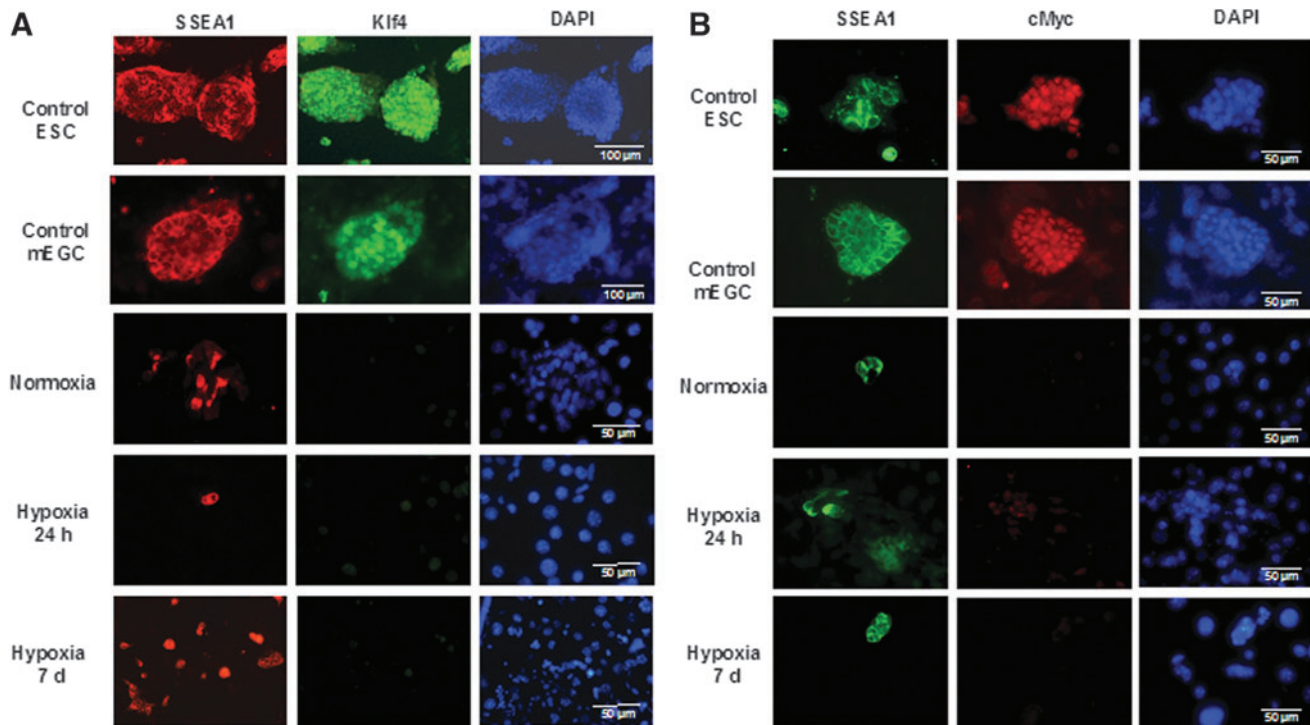
Chromatin remodeling-related genes also showed different results, many such as *Jmjd3* and *Dnmt3l* upregulated in hiEGLs and true pluripotent cells respect to PGCs, whereas others such as *Ezh2* were downregulated by hypoxia (Table 3). Also, germ cell markers *Prmt5* and *Stella* downregulated during hypoxia signaling-induced reprogramming, as expected, whereas others such as *Fragilis* did not (Table 3).

We also looked at genes differentially implicated in the three phases of reprogramming, initiation, maturation, and stabilization in hiEGL respect to true EGC. Most genes typical of the initiation and maturation phases of cell reprogramming (7, 26, 46, 62), such as *Cdh1*, *Fbxo15*, and *Sall4*, were expressed at similar levels in hiEGL with respect to true EGC, suggesting that hypoxia signaling induces these two phases in PGCs. Interestingly, genes corresponding to the

stabilization phase of cell reprogramming, such as *Dppa3*, *Eras*, and *Dnm3l*, are expressed at intermediate levels in hiEGLs relative to EGC and PGC genes (Table 3), suggesting that hiEGLs have not reached the stabilization phase of reprogramming.

## Discussion

Our search for differential gene expression pattern between PGCs and EGCs revealed that neither of the Yamanaka genes (*Oct4*, *Sox2*, *Klf4* and *c-Myc*) are upregulated in EGCs versus PGCs despite the pluripotent versus unipotent characteristics of these two cell types. This may be due to the fact that PGCs already express *Oct4*, *Nanog*, and *Sox2* [for a review, see ref. (17)], and *Lin28* (72). Interestingly, many genes we found were related to metabolic pathways. Some of the glycolysis-related genes we found, such as *enolase* and *phosphoglycerate mutase*, were also found in a screen aimed at identifying genes capable of immortalizing mouse



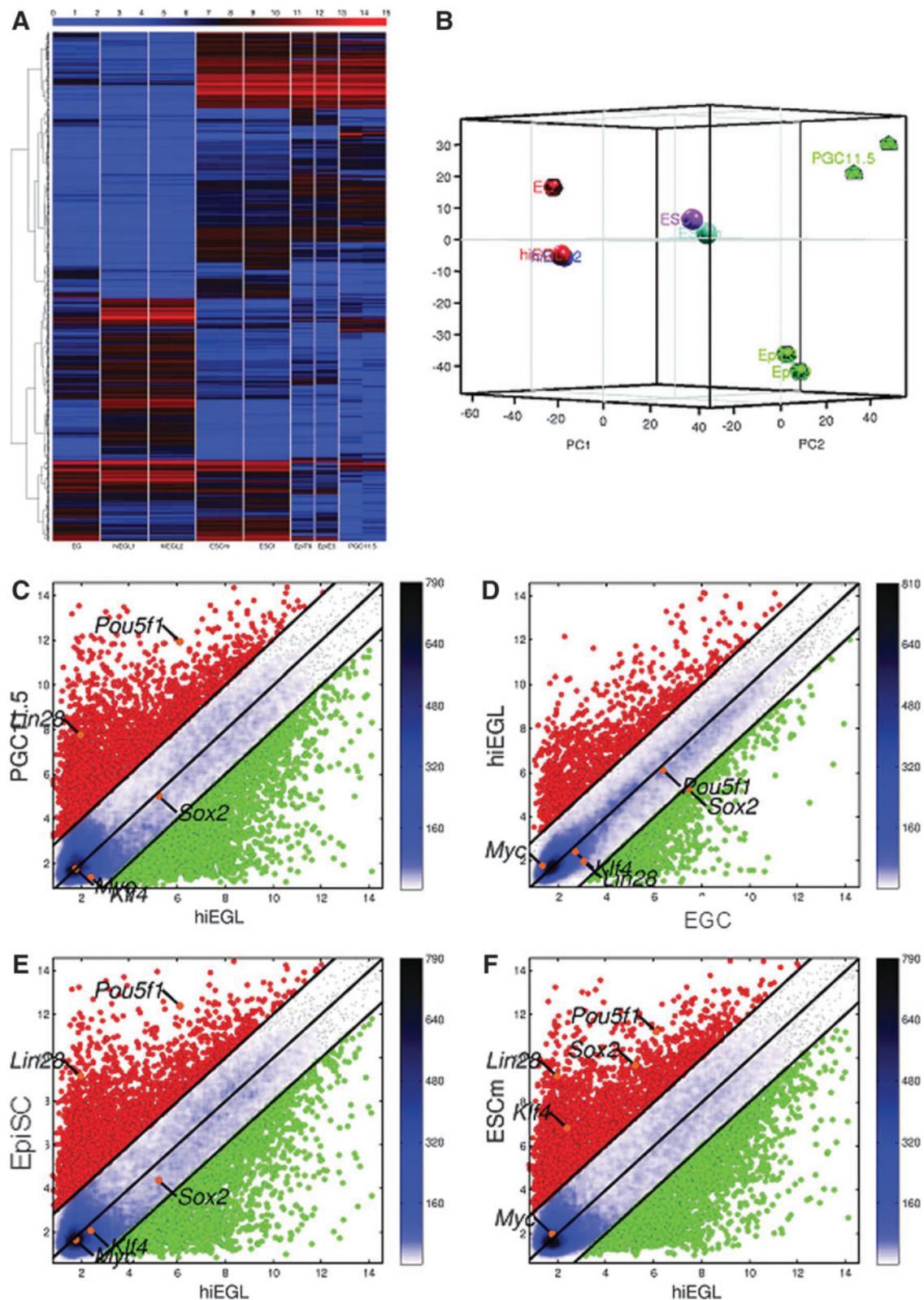
**FIG. 9. Klf4 and c-Myc are not upregulated by hypoxia PGC culturing.** (A) Klf4 is not upregulated in PGC cultures either under normoxic or hypoxic conditions. (B) c-Myc is not upregulated in PGC cultures either under normoxic or hypoxic conditions. The mouse ESC line E14Tg2a and the mouse EGC TGC<sup>8.5</sup>10 were used as positive controls for the immunohistochemistry. ESC, embryonic stem cell. To see this illustration in color, the reader is referred to the web version of this article at [www.liebertpub.com/ars](http://www.liebertpub.com/ars)

embryonic fibroblasts (MEFs) (40). These results suggested the possibility that just manipulating cell metabolism could induce pluripotency in PGCs. As hypoxia induces a metabolic switch from oxidative phosphorylation to glycolysis (64) similar to what is observed in pluripotent stem cells (41), we decided to submit PGCs to hypoxia to induce the metabolic change in PGCs and study the effects of hypoxia signaling. We demonstrated in fact that hypoxia induces glycolysis in PGCs, as expected, and also that hypoxia induces changes in Oct4 expression.

Recently, it has been suggested that metabolic reprogramming must be overcome to enhance induction efficiency (80). Our results clearly support this hypothesis. Our data show that hypoxia-induced glycolysis precedes full reprogramming of *in vivo* committed cells. Moreover, in accordance to our data, several recent studies show that metabolic resetting is an active process that takes place during reprogramming (24, 55, 82) and that an increase in the expression of glycolytic genes precedes a similar increase in the expression of genes that control self-renewal (as in this study).

In this study, we show that hypoxia alone is capable of inducing pluripotency of *in vivo* committed cells. Interestingly, during the preparation of this article, it has also been demonstrated that hypoxia induces pluripotency of *in vitro* differentiated iPSC (48). A possible mechanism that links metabolism and stemness is the existence of a positive feedback loop between glycolysis and NF $\kappa$ B (35), so that the stem cell state could be favored by promoting this feedback loop. In fact, in our whole-genome expression analysis, we found that NF $\kappa$ B1 is upregulated in hiEGLs and EGCs with respect to PGCs.

The induction of PGC pluripotency by hypoxia is mediated by HIFs. HIFs are heterodimeric transcription factors composed of a HIF- $\alpha$  and a HIF- $\beta$  subunit. The HIF- $\alpha$  protein subunit is constitutively expressed but rapidly degraded when sufficient oxygen is present (5), which could explain why we did not find HIF itself in our suppression subtraction hybridization comparison between PGCs and EGCs but only the downstream glycolysis-related genes. We have been able to detect HIF1 $\alpha$  protein expression in PGCs exclusively under hypoxic conditions (hiEGL). Similar findings have been reported in human ESC (hESC) (9), and in neural stem cell (NSC) (28) and iPSCs (49), showing that stabilization of HIF1 is necessary to support the undifferentiated phenotype induced by hypoxia and that prolonged expression of HIF1 improves reprogramming (49). In our studies, hypoxia-induced pluripotency involves Oct4 deregulation. In ESC, Oct4 appears to be regulated by HIF1 $\alpha$  as well (31). In ESC cells, subtle changes in Oct4 levels result have dramatic effects: a twofold upregulation induces mesodermal differentiation, whereas a twofold decrease induces trophoectoderm differentiation (52). Our data show that hypoxia induces a wider range of Oct4 levels in PGCs, accounting for both pluripotency induction and differentiation-prone colony formation in our cultures. In addition, transcriptional activation of Oct4-specific target genes is sufficient for pluripotency induction (29). Our data suggest that reprogramming in PGCs induced by hypoxia could be related to deregulation of Oct4 levels. Unexpectedly, we observed that most hiEGL colonies arise from Oct4 downregulated PGC cells. Interestingly, very recently, it has been reported that it is, in fact, a reduced Oct4



**FIG. 10.** Microarray analysis of gene expression of hiEGL with respect to 11.5 dpc PGC, EGC, EpiSC, and ESC. (A) Heat map. Color bar at the top codifies gene expression in log2 scale. (B) Principal component analysis of microarray data (3D). Pairwise scatter plots of hiEGL versus PGC11.5 (C), EGC versus hiEGL (D), hiEGL versus EpiSC (E), ESC versus hiEGL (F), dpc, days post-coitum; hiEGL, hypoxia-induced EGC-like cells. To see this illustration in color, the reader is referred to the web version of this article at [www.liebertpub.com/ars](http://www.liebertpub.com/ars)

TABLE 3. MICROARRAY DATA OF SOME SELECTED GENES IN THE COMPARED POPULATIONS

	<i>PGC 11.5</i>	<i>hiEGL 1</i>	<i>hiEGL 2</i>	<i>EGC</i>	<i>ESC</i>	<i>EpiSC</i>
Pou5f1 (Oct4)	12±0.1	6±0 <sup>a</sup>	6.2±0.1 <sup>a</sup>	6.4±0.1 <sup>a</sup>	11.3±0 <sup>a</sup>	12±0.5
Sox2	5.1±0.8	5±0.3	5.2±0.3	7.5±0	9.5±0.1 <sup>a</sup>	4.6±0.2
Klf4	1.6±0.1	1.6±0.4	1.9±0	4.3±0 <sup>a</sup>	7.7±0.2 <sup>a</sup>	3.6±0.7
c-Myc	1.8±0.4	1.2±0	1.8±0.2	1.3±0.3	1.9±0.4	1.4±0.3
Lin28	7.8±0.2	3.2±0.5 <sup>a</sup>	2±0.2 <sup>a</sup>	3.1±0.2 <sup>a</sup>	8.2±0.1	9±0.2 <sup>a</sup>
Fbxo15	9.8±0.1	10.1±0 <sup>a</sup>	9.7±0	11±0.1 <sup>a</sup>	11.4±0 <sup>a</sup>	6.3±0.8
Dhx38	10.3±0.1	11.2±0 <sup>a</sup>	11.2±0 <sup>a</sup>	11.2±0 <sup>a</sup>	9.2±0 <sup>a</sup>	10±0.1
Gdf3	8.7±0.2	9±0.1	8.7±0.1	10.6±0.1 <sup>a</sup>	10.5±0.05 <sup>a</sup>	8.5±0.2
Cdh1	6.7±0.8	8.2±0	8±0.2	9.8±0	10.2±0.1 <sup>a</sup>	7.7±1.1
NfkB1	5.6±0.2	—	8.2±0 <sup>a</sup>	7.7±0.1 <sup>a</sup>	6±0.2	7.5±0.3 <sup>a</sup>
Notch1	4.8±0	9.8±0 <sup>a</sup>	10±0.1 <sup>a</sup>	8±0.1 <sup>a</sup>	6.6±0 <sup>a</sup>	4.7±0.3
Wnt3a	3.3±0.5	2.1±0.3	2.8±1	5.6±0 <sup>a</sup>	3.7±0.3	3.5±1.3
Trp53 (p53)	10.6±0.2	8.6±0 <sup>a</sup>	7.5±0 <sup>a</sup>	8.3±0.1 <sup>a</sup>	10.4±0	10.3±0
Sall4	11.2±0.1	12±0 <sup>a</sup>	11.8±0 <sup>a</sup>	12.7±0 <sup>a</sup>	11.6±0	11.4±0
Eras	1.3±0.1	2.2±0.3	2.3±0.2 <sup>a</sup>	6.7±0 <sup>a</sup>	9.1±0.3 <sup>a</sup>	8.8±0.8 <sup>a</sup>
Jmjd3	2.6±0.2	8.5±0 <sup>a</sup>	9.1±0.1 <sup>a</sup>	7.6±0 <sup>a</sup>	7.7±0.1 <sup>a</sup>	7.2±0.6 <sup>a</sup>
Dnmt3l	1.7±0.1	2.2±0.1	6.4±0.2 <sup>a</sup>	13.5±0.1 <sup>a</sup>	12.3±0 <sup>a</sup>	6±0.8 <sup>a</sup>
Ezh2	10.5±0	2.3±0 <sup>a</sup>	2.5±0.6 <sup>a</sup>	3.4±0.1 <sup>a</sup>	9.9±0.1 <sup>a</sup>	10.1±0.3
Prmt5	9.2±0.2	2.5±0.1 <sup>a</sup>	2.9±0.1 <sup>a</sup>	2.5±0.4 <sup>a</sup>	7.8±0 <sup>a</sup>	8.3±0.1
Dppa3 (Stella)	12.4±0.2	6.3±0.1 <sup>a</sup>	7.5±0 <sup>a</sup>	3.7±0.1 <sup>a</sup>	8.4±0 <sup>a</sup>	3.9±1 <sup>a</sup>
Ifitm3(Fragilis)	12±0	12.4±0 <sup>a</sup>	11.2±0 <sup>a</sup>	11±0 <sup>a</sup>	11.1±0 <sup>a</sup>	10±1.1

The change values of expression in a logarithmic scale of 2 obtained from the numerical data of the Heat Map of the microarray are shown. Data are shown as mean±SE.

<sup>a</sup>Difference significant respect to PGCs, Student's *t*-test  $p \leq 0.05$ .

expression that directs a robust pluripotent state in ESC and that a higher range of Oct4 levels in wild-type ESC causes heterogeneity in Nanog expression (34). This is also supported by redefinition of the low Oct4 levels required for pluripotency entry as well as the higher Oct4 levels required for differentiation (58).

Remarkably, in ESC, Oct4 downregulation promotes increased expression of Wnt3a (34), which in turn acts together with LIF to promote ESC self-renewal. In contrast, hypoxia signaling is not able to upregulate Wnt3a in our hiEGLs, which could also account for their lack of self-renewal. Importantly, among genes regulated by HIF1 $\alpha$  is Notch (28, 36, 54). In hESC, hypoxia prevents differentiation by Notch activation (57). In agreement with this hypothesis, our data show that Notch is upregulated in hiEGLs and EGCs compared with PGCs.

We show that hypoxia alone is capable of increasing expression of about half of the genes overexpressed in EGC respect to PGC. The lack of upregulation of the other half of genes could also account for the lack of immortality of hiEGLs.

Exposure of PGCs to FGF2 or trichostatin A (TSA) induces stemness by triggering downregulation of Blimp1, the key germ cell specification gene (53), which in turn induces upregulation of Blimp1 repressed targets c-Myc and Klf4 (20). In contrast with these data, Blimp KO mice only produce aberrant nonproliferative PGCs (53). The fact that our pluripotent, but with limited self-renewal ability, hypoxia-derived EGLs do not upregulate c-Myc or Klf4 suggests that Blimp1 is not downregulated by hypoxic culturing. In fact, a later PGC marker, c-Kit, is not downregulated in our cultures. In addition, we and others have demonstrated that the c-Kit downstream effector, AKT, promotes PGC growth (13), and EGC derivation (38), implicating c-Kit in the reprogramming

process as well. In addition, our c-Kit-positive hypoxia-derived EGL cells do in fact give rise to cells of the three germ layers. All these data together suggest that Blimp1 downregulation promotes indefinite self-renewal capacity (by Klf4 and c-Myc upregulation) but is not involved in pluripotency itself (12).

We have observed interesting data regarding the hypoxia signaling in PGCs with respect to the described phases of reprogramming. Three main phases have been shown to take place during iPSC derivation (7, 26, 46, 62), each one driven by characteristic genes. In our microarray analysis comparing PGCs, hiEGL, and proper EGC, we found that initiation phase genes are upregulated in hiEGL and EGC with respect to PGCs, suggesting that hypoxia signaling has already exerted this first phase. Most genes typical of the second phase, maturation, with the exception of Oct4, remain the same in the studied populations. Interestingly, genes in the third phase, stabilization, are the most different in our populations and are expressed at intermediate levels in hiEGLs relative to EGC and PGCs genes, suggesting that hiEGLs are at an intermediate state where stabilization of pluripotency has not been achieved. Studying intermediate cell populations in iPSC derivation (56) revealed two transcriptional waves, the first one driven by *Myc/Klf4* and the second one by *Oct4/Sox2/Klf4*. In our model, part of the second wave is already upregulated in naive PGCs, whereas the first one has not yet been achieved, suggesting that pluripotency acquisition in PGCs by hypoxia signaling might use a slightly divergent pathway, although some early and intermediate changes such as histone modifications followed a similar pattern (Fig. 9A; Table 3).

Hypoxia alone does not induce hiEGL immortality. We have seen that Klf4 or c-Myc are not upregulated by hypoxia at both the mRNA and protein levels. These results are in

contrast to those observed in FGF2- or TSA-induced EGC cells (20) and may explain the lack of self-renewal ability of hiEGLs. This agrees with the notion that iPSC generation requires the cells to overcome cellular senescence and that this process may be governed by Klf4 and p53 (47, 81). In fact, p53 is downregulated by hypoxia in our hiEGLs.

Interestingly, altogether our data suggest that pluripotency and immortality are two differentially regulated processes, the first one exerted by hypoxia signaling and regulated mainly by Oct4, and the second being exerted by c-Myc and/or Klf4 expression. In many cell types, hypoxia suppresses proliferation. This is mediated by HIF1 stabilization, which in turn inhibits c-Myc and thus induces cell cycle arrest (42), as c-Myc controls the G1/S transition (11). Moreover, under chronic hypoxia, HIF1 promotes Myc degradation, to protect cells from Myc-induced apoptosis (8). PGC adaptation to hypoxia might use this mechanism to prevent apoptosis, but at the same time sacrificing the self-renewal capacity. Downregulation of LIFR seen in our hypoxic PGC cultures could account for the spontaneous differentiation observed, as it occurs in mouse ESC exposed to hypoxia (33).

Interestingly, during embryonic development, PGC migrate along the aorta, thus *in vivo* high oxygen levels prevent pluripotency induction in PGCs. In fact, PGC that migrate slower or that move out of this pathway develop into pluripotent embryonal carcinoma cells (16, 17, 65). Moreover, it has been proposed that ESCs derive from PGC precursors in the ICM (12, 83), as PGCs are specified in the early blastocysts from which ESCs are derived (50, 61), and they express molecules typical of the germ cell lineage (12, 61). In addition, ESC derivation from the ICM has recently been achieved preferentially from Blimp1-positive cells (10). An ESC origin as primitive germ cells underlines the importance of germ cell study to the understanding of the processes and mechanisms related to pluripotency. This knowledge could be used to derive naive human ESC and iPSC lines more similar to mouse ESC cells, which are more suitable for research due to their higher efficiency when subcloned and fewer death rate when passaged using single cell dissociation methods. In addition, the possibility of reprogramming pluripotency without allowing the cells to proliferate extensively will avoid putative undesirable side-effects such as tumor formation (1) and will provide a valuable tool for clinical transplantation studies using iPSC.

## Materials and Methods

### EG and PGC isolation

The TGC<sup>8.5</sup>10 EGC line was cultured as previously described (44) on irradiated MEFs, trypsinized, stained for SSEA-1, and sorted.

All animal works have been conducted according to relevant national and international guidelines. OG2 mice, containing a transgene where the GFP is driven by the Oct4 promoter, were used for PGC isolation (67). The mice were mated and the presence of a vaginal plug was considered as 0.5 dpc. The pregnant females were sacrificed at 10.5 dpc and the genital ridges were dissected. Disaggregation was performed with collagenase type 1A (Sigma) and trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid 0.25% (Invitrogen) at a ratio of 1:2 with shaking at 700 rpm for 10 min at 37°C. Enzymatic

digestion was stopped by adding a twofold excess of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Invitrogen)+10% fetal bovine serum (FBS). Cell suspensions were washed once in DMEM+10% FBS and FACS-sorted for GFP. GFP-positive PGCs were directly sorted into lysis buffer RLT (Qiagen) using the FACSaria cell sorter (BD Biosciences).

### EGC and PGC cDNA library generation and subtraction hybridization

PGC and EGC RNAs were extracted using the Nucleospin RNA II kit (Clontech). Super SMART PCR cDNA Synthesis kit was used to generate cDNA according to the manufacturer's instructions. The subtraction hybridization was performed using the Clontech PCR-Select cDNA Subtraction kit (Clontech). The subtracted library was cloned in the PGem-T Easy vector (Promega), then 96 white colonies were picked and the cDNA insert was amplified by PCR. Differential screening was performed using the PCR-Selected Differential Screening kit (Clontech) as recommended by the manufacturers. Briefly, cDNA blots were prepared from the PCR products obtained from the subtracted library clones. <sup>32</sup>P-labelled probes were prepared from unsubtracted EGC and PGC cDNA and were hybridized to the subtracted clones arrayed onto the Hybond-N (Amersham) nylon membrane. Finally, the blots were quantified with the Typhoon 9410 Phosphorimage (Amersham Biosciences). Clones presenting a 1.5-fold higher expression level in EGC compared with PGC cDNA were selected for sequencing.

### qRT-PCR analysis

The RNeasy Micro Kit (Qiagen) was utilized to extract the RNA from EGCs and E10.5 PGCs. Both RNAs were reverse-transcribed using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems). The gene expression of both samples was quantified in triplicates using the iTaq SYBR Green Supermix (Biorad) on the 7900 HT (Applied Biosystems). Before the quantification stage, the PGC cDNA was pre-amplified with the Taqman PreAmp Master Mix kit (Applied Biosystems) following the manufacturer's instructions. Calculations were made based on the  $\Delta\Delta C_t$  method employing  $\beta$ -actin as endogenous control for normalization. All primers were validated for specificity (Supplementary Fig. S1C).

### PGC culture

For PGC culture, 8.5 dpc embryos were used, as this embryonic age in our hands responds more consistently to the culture conditions. PGC isolation was performed in a similar way to 10.5 dpc embryos detailed previously, except that the posterior third of the embryo was isolated instead of the genital ridges, as the latter have not yet formed. The posterior third of the embryo was removed, including the caudal end of the primitive streak and allantoids. Fifty to one hundred PGCs are localized at the junction of the primitive streak and the base of allantoids at this embryonic stage. The embryo fragments were collected and trypsinized.

Isolated PGCs were standardly cultured in 96-well plates. PGCs need to be cultured over a monolayer of nutritious cells, usually MEFs or STO cell line of MEFs, previously

gamma-irradiated (50 Gy) or mitomycin C treated to prevent their proliferation. PGCs were cultured in the DMEM with 15% ESC qualified FBS and supplemented with LIF (Millipore) and SCF (R&D Systems), which are essential for PGC survival and proliferation but do not induce reprogramming. For positive controls of reprogramming, FGF2 (ORF Genetics) was also added to the cultures. To monitor reprogramming efficiency and Oct4-GFP expression, single PGCs were cultured in 384-well Terasaki plates and the EGC colonies per 100 PGCs were determined. The PGC medium was also supplemented on day 3 with 2i (glycogen synthase kinase 3 inhibitor CHIR99021; Sigma, and mitogen-activated protein kinase (Erk1/2) inhibitor PD0325901; Calbiochem) as in Leitch et al. (45).

Smith EpiSC conditions consisted of activin A (20 ng/ml; R&D Systems) and FGF2 (12 ng/ml; R&D Systems) in the N2B27 medium (27).

McKay EpiSC conditions consisted of DMEM-F12 (Invitrogen) with 20% knockout serum replacement (Invitrogen), FGF2 (5 ng/ml; R&D Systems), 0.1 mM 2-mercaptoethanol, 2 mM L-glutamine (both from Sigma), and 0.1 mM nonessential amino acids (Invitrogen) (71).

#### *Hypoxic culture conditions*

Chemically hypoxic cultures were achieved by carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (Sigma), which uncouples oxidative phosphorylation from the electron transport chain, leading to a change in glycolytic metabolism, mimicking hypoxia, at 2  $\mu$ M for 30 min; Antimycin A, a mitochondrial inhibitor that works by inhibiting the electron transfer at complex III (Sigma) at 2.5  $\mu$ M for 30 min, and the hypoxia-mimetic agent CoCl<sub>2</sub> (Merck) that artificially induces hypoxia through blocking the degradation of HIF1 $\alpha$ , at 150  $\mu$ M for 4 h. In addition, hypoxia was directly applied to the cultures by incubation in a 3% O<sub>2</sub> atmosphere in an adequate CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> incubator.

To implicate HIFs in cell reprogramming, normoxic and hypoxic cultures were supplemented with mithramycin (Sigma) (43), a HIF pharmacological inhibitor, at 100 nM, or with DMOG (Calbiochem), an inhibitor of HIF degradation, at 1  $\times$  10<sup>-4</sup> M, for the whole culturing period.

#### *Immunofluorescence*

The generation of induced EGC colonies was monitored by GFP fluorescence (revealing Oct4 expression), alkaline phosphatase histochemistry, a marker for ESC, EGC, and iPSCs, and immunofluorescence against pluripotency markers such as SSEA1 (R&D Systems), Klf4 (R&D Systems), and c-Myc (Santa Cruz Biotechnology). As positive controls, the mouse ESC line E14Tg2a and the mouse EGC TGC<sup>8.5</sup>10 line were used. Identification of germ cells was performed by immunohistochemistry against the early germ line marker c-Kit (Novus). In addition, EGC generation was monitored by colony formation and long-term culture, as PGCs grow isolated and do not survive more than a week in the culture, whereas EGC cells can be passaged as a cell line for prolonged periods of time.

Hypoxic versus normoxic cultured PGCs were monitored by immunofluorescence for HIF1 $\alpha$  subunit, as HIF1 $\beta$  (ARNT) is common to all HIF heterodimers. The antibody

for HIF1 $\alpha$  was developed by Dr. Berra. The P-PDH antibody was purchased from Abcam.

In addition to immunofluorescence, the expression of Oct4-GFP was quantitated by FACS using SSEA-1 antibody after PGC/EGC culture under normoxic or hypoxic conditions, and the HIF inhibitor or activator as above.

Mitochondrial membrane potential was measured by incubation of the cultures with JC-1 (Life Technologies) and subsequent FACS analysis.

ROS were measured by CellROX (Life Technologies) following the manufacturer's instructions.

#### *Differentiation assays*

The generation of EBs comprising cells of the three germ layers was performed by standard methods of culturing under nonadherent conditions in the PGC medium without growth factors. The EBs generated were allowed to attach and differentiate spontaneously or embedded in OCT and sectioned. To confirm differentiation into cells of the three germ layers, and thereby pluripotency acquisition, immunohistochemistry was performed for markers of ectoderm (S100; Dako, and cytokeratins; Dako), mesoderm (sarcomeric  $\alpha$ -actin; Dako, and vimentin; Santa Cruz), and endoderm (albumin; Dako).

#### *Morula aggregation*

C57BL6 morulae were aggregated with 8.5 dpc double transgenics *Katushka/Oct4-GFP* PGCs cultured in hypoxia conditions for 6 days and then cultured for 24 or 48 h and observed under confocal microscopy for *Katushka* and GFP fluorescence and blastocyst integration.

#### *Statistical analysis*

Cell cultures were always performed in three technological replicates and repeated in three biological replicates for each condition, factor, and pharmacological inhibitor tested. EB formation was performed on at least nine different biological replicates. For expression analysis, a minimum of two biological replicates was used pooling at least three experiments each, and then, each one was performed at least in two technological replicates. Statistical analysis was performed by the Student's *t*-test with the Bonferroni or Fisher modification as appropriate. Comparison of induction by different conditions was performed by variance analysis. Real-time PCR data significance was assessed by confidence interval at 95%. Oct4-GFP expression range FACS data significance was assessed by the parametric F-Snedecor analysis.

#### *Whole-genome expression analysis*

Oct4-GFP PGCs (8.5 dpc) cultured in hypoxia conditions for 6 days were isolated by FACS. To eliminate the possibility of differences due solely to anaerobic respiration, TGC-10 EGC line was exposed to the hypoxia-mimetic agent CoCl<sub>2</sub> at 150  $\mu$ M for 4 h before RNA isolation. RNA samples to be analyzed by microarrays were prepared using Qiagen RNeasy columns with on-column DNA digestion. Three hundred nanograms of total RNA per sample was used as input into a linear amplification protocol (Tetu-Bio), which involved synthesis of T7-linked double-stranded cDNA and 12 h of *in vitro* transcription incorporating biotin-labeled nucleotides. Purified and labeled cRNA was then hybridized

for 18 h onto MouseRef-8 v2 expression BeadChips (Illumina) following the manufacturer's instructions. After washing, chips were stained with streptavidin-Cy3 (GE Healthcare) and scanned using the iScan reader (Illumina) and accompanying software. Samples were exclusively hybridized as biological replicates. The data discussed in this publication have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus (21) and are accessible through GEO Series accession number GSE61472.

#### Microarray data processing

A comparison of the Scholer group's previous microarray data of ESC, EpiSC, and 11.5 dpc PGCs was performed with hiEGL data from this study. The bead intensities were mapped to gene information using BeadStudio 3.2 (Illumina). Background correction was performed using the Affymetrix Robust Multi-array Analysis background correction model (32). Variance stabilization was performed using the log<sub>2</sub> scaling, and gene expression normalization was calculated with the method implemented in the lumi package of R-Bioconductor. Data post-processing and graphics were performed with in-house developed functions in Matlab. Hierarchical clustering of genes and samples was performed with one minus correlation metric and the unweighted average distance (also known as group average) linkage method.

#### Acknowledgments

This work was supported, in part, by grants SAF2010-19230 from the Spanish Ministry of Science and Innovation, and Agencia Laín Entralgo, Madrid, Spain, and from Bio-Medical Foundation MaratóTV3, Spain. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the article. We thank Martina Sinn, Martin Stehling, Ana Santos, Raquel Martín, Fátima Domínguez, and Marta Riffo for technical assistance. The authors acknowledge Jesus Vidal from the Department of Radiotherapy and Department of Biostatistics at the La Paz Hospital for STO irradiation and data analysis. The TGC<sup>8.5</sup>10 EGC cell line was a kind gift from P.A. Labosky. We acknowledge Gareth William Osborne for English-language editing of the article.

#### Author Disclosure Statement

The authors declare no conflicts of interest.

#### References

1. Abad M, Mosteiro L, Pantoja C, Canamero M, Rayon T, Ors I, Grana O, Megias D, Dominguez O, Martinez D, Manzanares M, Ortega S, and Serrano M. Reprogramming *in vivo* produces teratomas and iPS cells with totipotency features. *Nature* 502: 340–345, 2013.
2. Aoi T, Yae K, Nakagawa M, Ichisaka T, Okita K, Takahashi K, Chiba T, and Yamanaka S. Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science* 321: 699–702, 2008.
3. Benizri E, Ginouves A, and Berra E. The magic of the hypoxia-signaling cascade. *Cell Mol Life Sci* 65: 1133–1149, 2008.
4. Boiani M, Eckardt S, Scholer HR, and McLaughlin KJ. Oct4 distribution and level in mouse clones: consequences for pluripotency. *Genes Dev* 16: 1209–1219, 2002.
5. Brahimi-Horn MC, Chiche J, and Pouyssegur J. Hypoxia signalling controls metabolic demand. *Curr Opin Cell Biol* 19: 223–229, 2007.
6. Brons IGM, Smithers LE, Trotter MWB, Rugg-Gunn P, Sun B, Chuva de Sousa Lopes SM, Howlett SK, Clarkson A, Ahrlund-Richter L, Pedersen RA, and Vallier L. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* 448: 191–195, 2007.
7. Buganim Y, Faddah DA, Cheng AW, Itskovich E, Markoulaki S, Ganz K, Klemm SL, van Oudenaarden A, and Jaenisch R. Single-cell expression analyses during cellular reprogramming reveal an early stochastic and a late hierarchical phase. *Cell* 150: 1209–1222, 2012.
8. Corn PG, Ricci MS, Scata KA, Arsham AM, Simon MC, Dicker DT, and El-Deiry WS. Mxi1 is induced by hypoxia in a HIF-1-dependent manner and protects cells from c-Myc-induced apoptosis. *Cancer Biol Ther* 4: 1285–1294, 2005.
9. Chen H-F, Kuo H-C, Lin S-P, Chien C-L, Chiang M-S, and Ho H-N. Hypoxic culture maintains self-renewal and enhances embryoid body formation of human embryonic stem cells. *Tissue Eng Part A* 16: 2901–2913, 2010.
10. Chu L-F, Surani MA, Jaenisch R, and Zwaka TP. Blimp1 expression predicts embryonic stem cell development *in vitro*. *Curr Biol* 21: 1759–1765, 2011.
11. Dang CV, Kim JW, Gao P, and Yuste J. The interplay between MYC and HIF in cancer. *Nat Rev Cancer* 8: 51–56, 2008.
12. De Felici M, Farini D, and Dolci S. In or out stemness: comparing growth factor signalling in mouse embryonic stem cells and primordial germ cells. *Curr Stem Cell Res Ther* 4: 87–97, 2009.
13. De Miguel MP, Cheng L, Holland EC, Federspiel MJ, and Donovan PJ. Dissection of the c-Kit signaling pathway in mouse primordial germ cells by retroviral-mediated gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 10458–10463, 2002.
14. De Miguel MP and Donovan PJ. Isolation and culture of mouse germ cells. *Methods Mol Biol* 137: 403–408, 2000.
15. Dieguez-Hurtado R, Martin J, Martinez-Corral I, Martinez MD, Megias D, Olmeda D, and Ortega S. A Cre-reporter transgenic mouse expressing the far-red fluorescent protein Katushka. *Genesis* 49: 36–45, 2011.
16. Donovan PJ, de Miguel M, Cheng L, and Resnick JL. Primordial germ cells, stem cells and testicular cancer. *APMIS* 106: 134–141, 1998.
17. Donovan PJ and de Miguel MP. Turning germ cells into stem cells. *Curr Opin Genet Dev* 13: 463–471, 2003.
18. Donovan PJ, De Miguel MP, Hirano MP, Parsons MS, and Lincoln AJ. Germ cell biology—from generation to generation. *Int J Dev Biol* 45: 523–531, 2001.
19. Donovan PJ, Stott D, Cairns LA, Heasman J, and Wylie CC. Migratory and postmigratory mouse primordial germ cells behave differently in culture. *Cell* 44: 831–838, 1986.
20. Durcova-Hills G, Tang F, Doody G, Toozé R, and Surani MA. Reprogramming primordial germ cells into pluripotent stem cells. *PLoS One* 3:e3531, 2008.
21. Edgar R, Domrachev M, and Lash AE. Gene expression omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res* 30: 207–210, 2002.
22. Eminli S, Utikal J, Arnold K, Jaenisch R, and Hochedlinger K. Reprogramming of neural progenitor cells into induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2 expression. *Stem Cells* 26: 2467–2474, 2008.
23. Facucho-Oliveira JM and St. John JC. The relationship between pluripotency and mitochondrial DNA proliferation



- during early embryo development and embryonic stem cell differentiation. *Stem Cell Rev* 5: 140–158, 2009.
24. Folmes CDL, Nelson TJ, Martinez-Fernandez A, Arrell DK, Lindor JZ, Dzeja PP, Ikeda Y, Perez-Terzic C, and Terzic A. Somatic oxidative bioenergetics transitions into pluripotency-dependent glycolysis to facilitate nuclear reprogramming. *Cell Metab* 14: 264–271, 2011.
  25. Forristal CE, Wright KL, Hanley NA, Oreffo RO, and Houghton FD. Hypoxia inducible factors regulate pluripotency and proliferation in human embryonic stem cells cultured at reduced oxygen tensions. *Reproduction* 139: 85–97, 2010.
  26. Golipour A, David L, Liu Y, Jayakumaran G, Hirsch CL, Trcka D, and Wrana JL. A late transition in somatic cell reprogramming requires regulators distinct from the pluripotency network. *Cell Stem Cell* 11: 769–782, 2012.
  27. Guo G, Yang J, Nichols J, Hall JS, Eyres I, Mansfield W, and Smith A. Klf4 reverts developmentally programmed restriction of ground state pluripotency. *Development* 136: 1063–1069, 2009.
  28. Gustafsson MV, Zheng X, Pereira T, Gradin K, Jin S, Lundkvist J, Ruas JL, Poellinger L, Lendahl U, and Bondesson M. Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state. *Dev Cell* 9: 617–628, 2005.
  29. Hammachi F, Morrison GM, Sharov AA, Livigni A, Narayan S, Papapetrou EP, O'Malley J, Kaji K, Ko MSH, Ptashne M, and Brickman JM. Transcriptional activation by Oct4 is sufficient for the maintenance and induction of pluripotency. *Cell Rep* 1: 99–109, 2012.
  30. Hanna J, Markoulaki S, Schorderet P, Carey BW, Beard C, Wernig M, Creighton MP, Steine EJ, Cassady JP, Foreman R, Lengner CJ, Dausman JA, and Jaenisch R. Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. *Cell* 133: 250–264, 2008.
  31. Hu CJ, Iyer S, Sataur A, Covello KL, Chodosh LA, and Simon MC. Differential regulation of the transcriptional activities of hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in stem cells. *Mol Cell Biol* 26: 3514–3526, 2006.
  32. Irizarry RA, Bolstad BM, Collin F, Cope LM, Hobbs B, and Speed TP. Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res* 31: e15, 2003.
  33. Jeong C-H, Lee H-J, Cha J-H, Kim JH, Kim KR, Kim J-H, Yoon D-K, and Kim K-W. Hypoxia-inducible factor-1 alpha inhibits self-renewal of mouse embryonic stem cells in vitro via negative regulation of the leukemia inhibitory factor-STAT3 pathway. *J Biol Chem* 282: 13672–13679, 2007.
  34. Karwacki-Neisius V, Goke J, Osorno R, Halbritter F, Ng JH, Weisse AY, Wong FC, Gagliardi A, Mullin NP, Festuccia N, Colby D, Tomlinson SR, Ng HH, and Chambers I. Reduced Oct4 expression directs a robust pluripotent state with distinct signaling activity and increased enhancer occupancy by Oct4 and Nanog. *Cell Stem Cell* 12: 531–545, 2013.
  35. Kawauchi K, Araki K, Tobiume K, and Tanaka N. p53 regulates glucose metabolism through an IKK-NF-kappaB pathway and inhibits cell transformation. *Nat Cell Biol* 10: 611–618, 2008.
  36. Keith B and Simon MC. Hypoxia-inducible factors, stem cells, and cancer. *Cell* 129: 465–472, 2007.
  37. Kim JB, Sebastiano V, Wu G, Arauzo-Bravo MJ, Sasse P, Gentile L, Ko K, Ruau D, Ehrlich M, van den Boom D, Meyer J, Hubner K, Bernemann C, Ortmeier C, Zenke M, Fleischmann BK, Zaehres H, and Scholer HR. Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell* 136: 411–419, 2009.
  38. Kimura T, Tomooka M, Yamano N, Murayama K, Matoba S, Umehara H, Kanai Y, and Nakano T. AKT signaling promotes derivation of embryonic germ cells from primordial germ cells. *Development* 135: 869–879, 2008.
  39. Kishigami S, Wakayama S, Thuan NV, Ohta H, Mizutani E, Hikichi T, Bui H-T, Balbach S, Ogura A, Boiani M, and Wakayama T. Production of cloned mice by somatic cell nuclear transfer. *Nat Protoc* 1: 125–138, 2006.
  40. Kondoh H, Leonart ME, Gil J, Wang J, Degan P, Peters G, Martinez D, Carnero A, and Beach D. Glycolytic enzymes can modulate cellular life span. *Cancer Res* 65: 177–185, 2005.
  41. Kondoh H, Leonart ME, Nakashima Y, Yokode M, Tanaka M, Bernard D, Gil J, and Beach D. A high glycolytic flux supports the proliferative potential of murine embryonic stem cells. *Antioxid Redox Signal* 9: 293–299, 2007.
  42. Koshiji M, Kageyama Y, Pete EA, Horikawa I, Barrett JC, and Huang LE. HIF-1alpha induces cell cycle arrest by functionally counteracting Myc. *EMBO J* 23: 1949–1956, 2004.
  43. Koshikawa N, Hayashi J, Nakagawara A, and Takenaga K. Reactive oxygen species-generating mitochondrial DNA mutation up-regulates hypoxia-inducible factor-1alpha gene transcription via phosphatidylinositol 3-kinase-Akt/protein kinase C/histone deacetylase pathway. *J Biol Chem* 284: 33185–33194, 2009.
  44. Labosky PA. Embryonic germ cell lines and their derivation from mouse primordial germ cells. *Ciba Found Symp* 182: 157–168, 1994.
  45. Leitch HG, Blair K, Mansfield W, Ayetey H, Humphreys P, Nichols J, Surani MA, and Smith A. Embryonic germ cells from mice and rats exhibit properties consistent with a generic pluripotent ground state. *Development* 137: 2279–2287, 2010.
  46. Li R, Liang J, Ni S, Zhou T, Qing X, Li H, He W, Chen J, Li F, Zhuang Q, Qin B, Xu J, Li W, Yang J, Gan Y, Qin D, Feng S, Song H, Yang D, Zhang B, Zeng L, Lai L, Esteban MA, and Pei D. A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell* 7: 51–63, 2010.
  47. Mali P, Ye Z, Hommond HH, Yu X, Lin J, Chen G, Zou J, and Cheng L. Improved efficiency and pace of generating induced pluripotent stem cells from human adult and fetal fibroblasts. *Stem Cells* 26: 1998–2005, 2008.
  48. Mathieu J, Zhang Z, Nelson A, Lamba DA, Reh TA, Ware C, and Ruohola-Baker H. Hypoxia induces re-entry of committed cells into pluripotency. *Stem Cells* 31: 1737–1748, 2013.
  49. Mathieu J, Zhou W, Xing Y, Sperber H, Ferreccio A, Agoston Z, Kuppusamy KT, Moon RT, and Ruohola-Baker H. Hypoxia-inducible factors have distinct and stage-specific roles during reprogramming of human cells to pluripotency. *Cell Stem Cell* 14: 592–605, 2014.
  50. Matsui Y and Okamura D. Mechanisms of germ-cell specification in mouse embryos. *Bioessays* 27: 136–143, 2005.
  51. Matsui Y, Zsebo K, and Hogan BL. Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell* 70: 841–847, 1992.
  52. Niwa H, Miyazaki J, and Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* 24: 372–376, 2000.

53. Ohinata Y, Payer B, O'Carroll D, Ancelin K, Ono Y, Sano M, Barton SC, Obukhanych T, Nussenzweig M, Tarakhovskiy A, Saitou M, and Surani MA. *Blimp1* is a critical determinant of the germ cell lineage in mice. *Nature* 436: 207–213, 2005.
54. Oikawa M, Abe M, Kurosawa H, Hida W, Shirato K, and Sato Y. Hypoxia induces transcription factor ETS-1 via the activity of hypoxia-inducible factor-1. *Biochem Biophys Res Commun* 289: 39–43, 2001.
55. Panopoulos AD, Yanes O, Ruiz S, Kida YS, Diep D, Tautenhahn R, Herrerias A, Batchelder EM, Plongthongkum N, Lutz M, Berggren WT, Zhang K, Evans RM, Siuzdak G, and Izpisua Belmonte JC. The metabolome of induced pluripotent stem cells reveals metabolic changes occurring in somatic cell reprogramming. *Cell Res* 22: 168–177, 2012.
56. Polo JM, Anderssen E, Walsh RM, Schwarz BA, Nefzger CM, Lim SM, Borkent M, Apostolou E, Alaei S, Cloutier J, Bar-Nur O, Cheloufi S, Stadtfeld M, Figueroa ME, Robinson D, Natesan S, Melnick A, Zhu J, Ramaswamy S, and Hochedlinger K. A molecular roadmap of reprogramming somatic cells into iPSCs. *Cell* 151: 1617–1632, 2012.
57. Prasad SM, Czepiel M, Cetinkaya C, Smigielska K, Weli SC, Lysdahl H, Gabrielsen A, Petersen K, Ehlers N, Fink T, Minger SL, and Zachar V. Continuous hypoxic culturing maintains activation of Notch and allows long-term propagation of human embryonic stem cells without spontaneous differentiation. *Cell Prolif* 42: 63–74, 2009.
58. Radziszewska A, Le Bin Chia G, Dos Santos RL, Theunissen TW, Castro LF, Nichols J, and Silva JC. A defined Oct4 level governs cell state transitions of pluripotency entry and differentiation into all embryonic lineages. *Nat Cell Biol* 15: 579–590, 2013.
59. Resnick JL, Bixler LS, Cheng L, and Donovan PJ. Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature* 359: 550–551, 1992.
60. Sabour D, Arauzo-Bravo MJ, Hubner K, Ko K, Greber B, Gentile L, Stehling M, and Scholer HR. Identification of genes specific to mouse primordial germ cells through dynamic global gene expression. *Hum Mol Genet* 20: 115–125, 2011.
61. Saitou M, Barton SC, and Surani MA. A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice. *Nature* 418: 293–300, 2002.
62. Samavarchi-Tehrani P, Golipour A, David L, Sung HK, Beyer TA, Datti A, Woltjen K, Nagy A, and Wrana JL. Functional genomics reveals a BMP-driven mesenchymal-to-epithelial transition in the initiation of somatic cell reprogramming. *Cell Stem Cell* 7: 64–77, 2010.
63. Scholer HR, Ruppert S, Suzuki N, Chowdhury K, and Gruss P. New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4. *Nature* 344: 435–439, 1990.
64. Shaw RJ. Glucose metabolism and cancer. *Curr Opin Cell Biol* 18: 598–608, 2006.
65. Silvan U, Diez-Torre A, Arluzea J, Andrade R, Silio M, and Arechaga J. Hypoxia and pluripotency in embryonic and embryonal carcinoma stem cell biology. *Differentiation* 78: 159–168, 2009.
66. Stadtfeld M, Brennand K, and Hochedlinger K. Reprogramming of pancreatic beta cells into induced pluripotent stem cells. *Curr Biol* 18: 890–894, 2008.
67. Szabo PE, Hubner K, Scholer H, and Mann JR. Allele-specific expression of imprinted genes in mouse migratory primordial germ cells. *Mech Dev* 115: 157–160, 2002.
68. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, and Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131: 861–872, 2007.
69. Takahashi K and Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663–676, 2006.
70. Taranger CK, Noer A, Sorensen AL, Hakelien A-M, Boquest AC, and Collas P. Induction of dedifferentiation, genomewide transcriptional programming, and epigenetic reprogramming by extracts of carcinoma and embryonic stem cells. *Mol Biol Cell* 16: 5719–5735, 2005.
71. Tesar PJ, Chenoweth JG, Brook FA, Davies TJ, Evans EP, Mack DL, Gardner RL, and McKay RDG. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* 448: 196–199, 2007.
72. West JA, Viswanathan SR, Yabuuchi A, Cunniff K, Takeuchi A, Park I-H, Sero JE, Zhu H, Perez-Atayde A, Frazier AL, Surani MA, and Daley GQ. A role for Lin28 in primordial germ-cell development and germ-cell malignancy. *Nature* 460: 909–913, 2009.
73. Wilmut I, Beaujean N, de Sousa PA, Dinnyes A, King TJ, Paterson LA, Wells DN, and Young LE. Somatic cell nuclear transfer. *Nature* 419: 583–586, 2002.
74. Yabuta Y, Kurimoto K, Ohinata Y, Seki Y, and Saitou M. Gene expression dynamics during germline specification in mice identified by quantitative single-cell gene expression profiling. *Biol Reprod* 75: 705–716, 2006.
75. Yamaguchi S, Kimura H, Tada M, Nakatsuji N, and Tada T. Nanog expression in mouse germ cell development. *Gene Expr Patterns* 5: 639–646, 2005.
76. Yanes O, Clark J, Wong DM, Patti GJ, Sanchez-Ruiz A, Benton HP, Trauger SA, Despons C, Ding S, and Siuzdak G. Metabolic oxidation regulates embryonic stem cell differentiation. *Nat Chem Biol* 6: 411–417, 2010.
77. Ying Q-L, Nichols J, Evans EP, and Smith AG. Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 416: 545–548, 2002.
78. Yoshida Y, Takahashi K, Okita K, Ichisaka T, and Yamanaka S. Hypoxia enhances the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 5: 237–241, 2009.
79. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, and Thomson JA. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318: 1917–1920, 2007.
80. Zhang J, Nuebel E, Daley GQ, Koehler CM, and Teitell MA. Metabolic regulation in pluripotent stem cells during reprogramming and self-renewal. *Cell Stem Cell* 11: 589–595, 2012.
81. Zhao Y, Yin X, Qin H, Zhu F, Liu H, Yang W, Zhang Q, Xiang C, Hou P, Song Z, Liu Y, Yong J, Zhang P, Cai J, Liu M, Li H, Li Y, Qu X, Cui K, Zhang W, Xiang T, Wu Y, Zhao Y, Liu C, Yu C, Yuan K, Lou J, Ding M, and Deng H. Two supporting factors greatly improve the efficiency of human iPSC generation. *Cell Stem Cell* 3: 475–479, 2008.
82. Zhu S, Li W, Zhou H, Wei W, Ambudhan R, Lin T, Kim J, Zhang K, and Ding S. Reprogramming of human primary somatic cells by OCT4 and chemical compounds. *Cell Stem Cell* 7: 651–655, 2010.
83. Zwaka TP and Thomson JA. A germ cell origin of embryonic stem cells? *Development* 132: 227–233, 2005.

Address correspondence to:  
*Dr. Maria P. De Miguel*  
*Cell Engineering Laboratory*  
*IdiPaz, La Paz Hospital Research Institute*  
*Paseo Castellana 261*  
*Madrid 28046*  
*Spain*

*E-mail:* mariapdemiguel@gmail.com

Date of first submission to ARS Central, January 31, 2014;  
 date of final revised submission, August 26, 2014; date of  
 acceptance, September 15, 2014.

#### Abbreviations Used

CCCP = carbonyl cyanidem-chloro phenyl  
 hydrazone  
 DMEM = Dulbecco's modified Eagle's medium  
 DMOG = dimethylolxalylglycine  
 dpc = days post-coitum  
 EB = embryoid body  
 EGC = embryonic germ cell  
 EpiSC = epiblast-derived stem cell

ESC = embryonic stem cell  
 FACS = fluorescence-activated cell sorting  
 FBS = fetal bovine serum  
 FGF2 = fibroblast growth factor 2  
 GFP = green fluorescent protein  
 hESC = human ESC  
 hiEGL = hypoxia-induced EGC-like cell  
 HIF = hypoxia-inducible factor  
 ICM = internal cell mass of the blastocyst  
 iPSC = induced pluripotent stem cell  
 LIF = leukemia inhibitory factor  
 LIFR = leukemia inhibitory factor receptor  
 MEF = mouse embryo fibroblast  
 NPC = neural progenitor cell  
 PGC = primordial germ cell  
 P-PDH = phospho-pyruvate dehydrogenase  
 qRT-PCR = quantitative reverse transcription-  
 polymerase chain reaction  
 ROS = reactive oxygen species  
 SCF = stem cell factor  
 SSEA1 = stage-specific embryonic antigen A1  
 SSH = suppression subtraction hybridization  
 STO = Sandoz thioguanine-resistant  
 ouabain-resistant cells  
 TSA = trichostatin A

# Cell Metabolism Under Microenvironmental Low Oxygen Tension Levels in Stemness, Proliferation and Pluripotency

M.P. De Miguel\*, Y. Alcaina, D. Sainz de la Maza and P. López-Iglesias

Cell Engineering Laboratory, La Paz Hospital Research Institute, IdiPAZ, Madrid 28046, Spain

**Abstract:** Hypoxia is defined as a reduction in oxygen supply to a tissue below physiological levels. However, physiological hypoxic conditions occur during early embryonic development; and in adult organisms, many cells such as bone marrow stem cells are located within hypoxic niches. Thus, certain processes take place in hypoxia, and recent studies highlight the relevance of hypoxia in stem cell cancer physiology. Cellular response to hypoxia depends on hypoxia-inducible factors (HIFs), which are stabilized under low oxygen conditions. In a hypoxic context, various inducible HIF alpha subunits are able to form dimers with constant beta subunits and bind the hypoxia response elements (HRE) in the genome, acting as transcription factors, inducing a wide variety of gene expression. Typically, the HIF pathway has been shown to enhance vascular endothelial growth factor (VEGF) expression, which would be responsible for angiogenesis and, therefore, re-oxygenation of the hypoxic sites. Embryonic stem cells inhibit a severely hypoxic environment, which dictates their glycolytic metabolism, whereas differentiated cells shift toward the more efficient aerobic respiration for their metabolic demands. Accordingly, low oxygen tension levels have been reported to enhance induced pluripotent stem cell (iPS) generation. HIFs have also been shown to enhance pluripotency-related gene expression, including Oct4 (Octamer-binding transcription factor 4), Nanog and Wnt. Therefore, cell metabolism might play a role in stemness maintenance, proliferation and cell reprogramming. Moreover, in the hypoxic microenvironment of cancer cells, metabolism shifts from oxidative phosphorylation to anaerobic glycolysis, a process known as the Warburg effect, which is involved in cancer progression and malignancy.



**Keywords:** Cancer, development, DNA repair, glycolysis, HIF, hypoxia, metabolism, reprogramming, ROS, stemness.

## 1. HYPOXIA: PHYSIOLOGY

Oxygen is necessary for aerobic organisms to generate intracellular ATP through oxidative phosphorylation. Almost all biological processes are affected by oxygen availability, and the response to variations in oxygen tension is critical for all organisms. Cells respond to oxygen tension in broadly different ways, showing that, in addition to its role in aerobic metabolism, molecular O<sub>2</sub> also acts as an essential signal in the regulation of cell fate. Hypoxia is defined as insufficient oxygen availability when it is reduced in relation to normal levels. Hypoxia occurs naturally in both developing embryos and adult tissues, as well as in pathological conditions such as ischemia, tissue repair and cancer. It is necessary, therefore, to differentiate between ambient and physiological hypoxia, because oxygen tension in air is 21%, whereas in the organism, oxygen levels vary widely [1]. As long as the vascular system is responsible for oxygen delivery in the organism, the most oxygenated environments are the blood and the areas closest to the blood vessels. In humans, oxygen pressure (pO<sub>2</sub>)

in blood varies between 100 mm Hg (14%) in the arterial blood and 40 mm Hg in the venous blood [2]. In arterioles, where oxygen exchange occurs, pO<sub>2</sub> is around 50 mm Hg [3]. The best-irrigated tissues have high pO<sub>2</sub>, such as the renal cortex (72 mm Hg), the intestine (58 mm Hg) and the liver (41 mm Hg). Large differences in oxygen levels can also be found inside the same tissue, depending on its structure and its distance from the blood vessels. For instance, bone marrow shows wide variations in oxygen pressure, from more than 50 mm Hg to less than 10 mm Hg in hypoxic niches [2,4]. Physiological hypoxia is then defined as the oxygen concentration that provokes alterations in cellular metabolism and homeostasis.

### 1.1. Hypoxia in Embryonic Tissues

A link between embryogenesis and low oxygen levels in mammals was initially appreciated by Quinn and Harlow, who found that in mouse development *in vitro*, blastocysts under oxygen tension higher than 5% suffer a greater decrease in blastomere number than those cultured between 2.5% and 5% [5]. Later, *in vivo* evidence of the appropriate hypoxic environment for embryonic development was found when it was demonstrated that low oxygen conditions were necessary for neural fold development in cultured rat

\*Address correspondence to this author at the Cell Engineering Laboratory, IdiPAZ, La Paz Hospital Research Institute, Paseo Castellana 261, Madrid 28046, Spain; Tel: 34-912071458; Fax: 34-917277050; E-mail: [maripademiguel@gmail.com](mailto:maripademiguel@gmail.com)

embryos [6]. Accordingly, embryologists now generally culture embryos under a low oxygen atmosphere [7].

The hypoxic environment during early embryogenesis is vital because early embryos have little protection against oxygen-generated free radicals [7]. In addition to the environment of the mammalian reproductive tract, where oxygen levels remain between 1.5% and 5.3%, these conditions are maintained due to the placenta [8]. Cytotrophoblasts form blockages in the maternal spiral arteries, preventing the blood flow to the placental site, causing the intervillous space to be devoid of maternal erythrocytes.

During the first few weeks of pregnancy, low oxygen tensions have deep effects on the trophoblast, promoting a more immature state in the cytotrophoblast, characterized by higher proliferation, reduced invasiveness and limited differentiation [9]. This layer of immature trophoblasts prevents the oxygenated blood from the mother to enter the embryo until ultimately differentiated. That happens around the 11th week of gestation in the human embryo, when the trophoblastic shell, formed at this moment by non-proliferative invasive cells, is broken and the oxygenated maternal blood is allowed to flow into the intervillous space [10]. As a consequence, oxygen level increases from about 2.5% to 8% O<sub>2</sub> (18 to 60 mm Hg) [11].

During embryogenesis, vascular system development depends on subtle differences in tissue oxygen levels. The genetic regulation implicated in this response has been conserved throughout evolution, including tracheal development in insects [1]. In mammalian vascular development, blood vessel patterning is regulated by local differences in oxygen tension. Cells placed in more hypoxic environments produce Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), a protein that causes the existing vessels to grow into less oxygenated regions [12]. Differentiated cells are located in areas with higher oxygen level, suggesting that differentiation is triggered by or at least related to higher oxygen levels, a condition that increases in most tissues during embryonic development, particularly in development of the vascular system.

## 1.2. Hypoxia in Adult Niches

Hypoxic microenvironments also occur in adults, in which specific 'niches' that regulate cellular differentiation are created. These niches are maintained due to atypical blood vessel networks in various areas of the organism, such as the bone marrow, which reaches an oxygen level of 1% (7.2 mm Hg) or lower, kidney medulla and thymus [1].

For example, in the cartilaginous microenvironment, oxygen tensions modulate chondrocyte phenotype and fate, such that low oxygen partial pressures cause chondrocyte to evolve from a proliferative immature state to a non-proliferative terminally differentiated one, allowing cartilaginous matrix formation. Hypoxia is also critical in the early stages of embryonic bone formation,

like in the formation of the cartilaginous primordial limb bud mesenchyme and mesenchymal condensations, in addition to early and late chondrogenesis [13].

Adipogenesis is also regulated by oxygen concentrations because fatty acid metabolism depends on oxidative phosphorylation. The best known mechanism whereby hypoxia regulates adipocyte development is by inhibiting the expression of peroxisome proliferative activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ), a type II nuclear receptor that promotes adipocyte differentiation from mesenchymal precursor cells [14]. Other mechanisms involving Wnt/ $\beta$ catenin pathway repression of adipogenesis have also been reported. This pathway could be promoted in hypoxia by upregulation of tetradecanoyl phorbol acetate induced sequence-7 (TIS7) [15] or Wnt10b [16].

Hematopoietic Stem Cells (HSCs) are located in the bone marrow, a tissue that has less oxygen tension than the peripheral blood. Also, the architecture of the sinusoidal endothelium in the medulla and the arterial blood flow pattern generates an oxygen gradient in which different hematopoietic cells are distributed. HSCs reside in the most hypoxic niches of the bone marrow (10 mmHg, 1.3% [4], and this hypoxic environment is essential for their quiescence [17].

Mesenchymal Stem Cells (MSCs) can be found in almost all tissues in both newborns and adults. MSCs are usually located in perivascular niches, especially in the bone marrow. A hypoxic environment enhances their migratory capability, maintenance of stem cell phenotype and pluripotency [18].

The Neural Stem Cell (NSC) niche located in the subgranular zone (SGZ) of the hippocampus is another stem cell hypoxic niche, which allows NSC proliferation, differentiation and maturation [19].

Recently, the adult mammalian epicardium and subepicardium has been identified as a hypoxic niche for cardiac progenitor cells. Progenitor cells in the hypoxic epicardial niche use glycolysis instead of oxidative phosphorylation, in which hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  (HIF1 $\alpha$ ) maintains the cells in a glycolytic undifferentiated state [19].

In conclusion, evidence indicates that many types of stem cells are located in hypoxic niches. The implications and reasons for this localization will be discussed later.

## 1.3. Hypoxia in Pathological Tissues

Unlike normal differentiated cells, which obtain most of the energy they need for cellular processes from oxidative phosphorylation (OXPHOS) on mitochondria, it was observed that most cancer cells (over 60% of all cancers) [20] rely instead on glycolysis even in normoxic conditions. This phenomenon is known as "the Warburg effect" in honor of Otto Warburg, who in 1956 postulated that this change in the metabolism towards glycolysis lead by irreversible damage to the oxidative phosphorylation machinery in mitochondria, was the fundamental cause of cancer [21]. Although

this simplistic view was later refuted, almost every different cancer investigated until now show mtDNA (mitochondrial DNA) mutations. These mutations range from point mutations, polymorphisms, deletions of large chromosomal regions and content alterations, which cause a number of varied respiratory dysfunctions and changes in ROS production [20]. Even though the mtDNA mutates, most cancer cells still retain their mitochondrial function [13]. This result suggests that damaged mitochondria are not the primary cause of aerobic glycolysis in cancer cells, but rather alterations in glycolysis itself. Impaired expression of glycolytic enzymes such as phosphoglycerate dehydrogenase (PHGDH), phosphoglycerate mutase 1 (PGAM1) and pyruvate kinase M2 (PKM2) has been reported to restrict the pyruvate production from glucose, promoting anabolic pathways like pentose phosphate and serine biosynthesis. At the same time, this metabolic shift also leads to tumor cell survival due to redox regulation of cytochrome c and consequently inhibition of apoptosis [22]. The underlying cause of the impairment of OXPHOS comprises both mitochondrial and nuclear genes mutations as well as reduced mtDNA content [23].

Paradoxically, cancer cells need more energy than normal cells to maintain their elevated growth rate, but in contrast, they use glycolysis, a relatively inefficient metabolic pathway, as the main source of energy. This reaction only produces 2 ATPs per each molecule of glucose, whereas the complete oxidation of one glucose by oxidative phosphorylation produces up to 36 ATPs [24]. However, this inefficient production of ATP only represents a problem in environments of limited resources, different to the one for proliferating mammalian cells, which are provided continuously by the circulating blood.

A hypothesis for this metabolic alteration is to promote the anabolic pathways in order to increase the biomass needed to grow quickly and produce new cells. Proliferating cells in multicellular organisms suffer a selective pressure for growth rate, favoring anabolic metabolism instead of efficiency of energy production provided by OXPHOS. This proliferative metabolism is promoted by growth factor signaling but, in cancer cells, the downstream signaling pathways of growth factor receptors can be constitutively activated in the absence of extracellular growth factors [25]. Several studies support the idea that the metabolic switch in tumor cells mimics the metabolism of normal proliferative cells. Different signaling pathways typically related to cell proliferation are also implicated in the regulation of anabolic pathways, and several mutations associated with cancer allow the cancer cells to acquire and metabolize nutrients in a way that promotes proliferation instead of efficient ATP production [26].

Compared with non-tumor cells, cancer cells present an increased uptake of glucose, a higher rate of glycolysis, a reduced oxidative phosphorylation and an increase in lactic acid production. At the same time, cancer cells show increase in most of the anabolic pathways, such as gluconeogenesis, glutaminolytic

activity, *de novo* fatty acid synthesis, pentose phosphate pathway activity, glycerol turnover and amino acid synthesis, and reduced catabolic pathways like fatty acid oxidation, and amino acid catabolism [20].

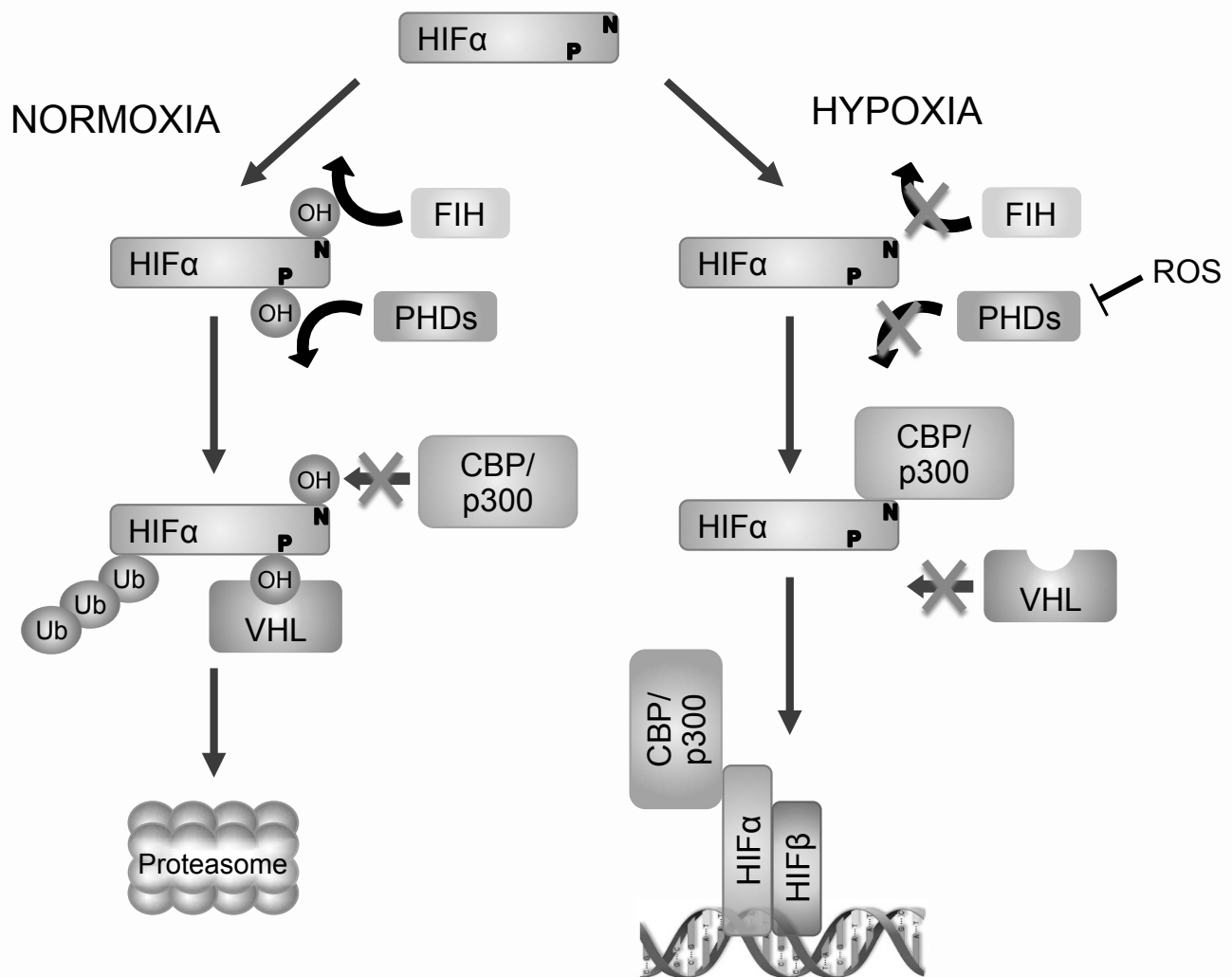
One common function of several oncogenes is to promote this proliferative metabolism along with driving cell-autonomous nutrient uptake, whereas most tumor suppressor genes have the function of preventing the biomass increase by blocking anabolic processes. According to this model, cancer cells need mutations to give them both the ability to acquire nutrients and to regulate metabolic pathways to favor proliferation. All these alterations in metabolic control could be the result of reverting to an embryonic program, or of the acquisition of a new capability in the existing cell that supports cell growth [26]. In the embryonic tissues there are many rapidly dividing cells that show Warburg-like metabolism, suggesting a widely represented role in proliferative cells, supporting the required biosynthetic programs [27].

## 2. HYPOXIA INDUCIBLE FACTORS (HIFs)

The primary mediators of the hypoxic response in mammalian cells are the Hypoxia-Inducible Factors (HIFs). HIFs are heterodimeric transcription factors composed of an alpha and a beta subunit. The constant  $\beta$ -subunit, known as the Aryl Hydrocarbon Nuclear Translocator (ARNT), is constitutively expressed in all cells [28,29]. The  $\alpha$ -subunit is variable, there being three different isoforms of HIF $\alpha$  (HIF1, HIF2 and HIF3) [29]. Both subunits belong to the PER-ARNT-SIM (PAS) subfamily of the basic helix-loop-helix (bHLH) family of transcription factors [30]. The heterodimer formed by an inducible  $\alpha$  subunit and the constitutively expressed HIF $\beta$  translocates to the nucleus, recruits transcription coactivators such as p300/CBP or proteins from the SRC/p160 family and drives the expression of target genes [31,32].

All three HIF $\alpha$  isoforms are greatly conserved in terms of amino acid sequence and have similar biochemical properties: they bind HIF $\beta$ , coactivators and HREs [33]; however, they differ in their expression. HIF1 $\alpha$  has a ubiquitous expression, and HIF2 $\alpha$  is also expressed in almost every cell type, however, HIF2 $\alpha$  is particularly elevated in certain cell types, such as vascular endothelial cells, kidney fibroblasts, hepatocytes, glial cells, interstitial cells of the pancreas, epithelial cells of the intestinal lumen, neural crest cell derivatives and lung type II pneumocytes [34], and it is believed to be a master regulator of oxidant stress response [19]. HIF3 $\alpha$  is expressed in the thymus, Purkinje cells, corneal epithelium [35], vascular endothelial cells (ECs), type II pneumocytes, renal interstitial cells, liver parenchymal cells and cells of the myeloid lineage [35]. In addition, HIF3 $\alpha$  has plenty of splicing variants, and some of them have been reported to inhibit HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$  [36-38].

As mentioned earlier, HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$  have similar biochemical properties, including that they recognize



**Fig. (1). HIF regulation.** Molecular mechanisms of HIF regulation under normoxic and hypoxic conditions. In the presence of  $O_2$  HIF $\alpha$  is hydroxylated by PHDs and finally degraded by the proteasome, whereas in hypoxia the degradation is inhibited and HIF $\alpha$  can bind to HIF $\beta$  and act as a transcription factor. Also, in normoxia FIH hydroxylates HIF $\alpha$  mediating the disruption of the interaction between HIF $\alpha$  and its transcription coactivator, p300/CBP, and impairing the transcriptional activity of HIF, causing HIF transcriptionally inactive. In hypoxia, p300/CBP can act as transcription coactivator of HIF $\alpha$ . P, proline residue; N, asparagin residue; PHDs, prolyl hydroxylases; FIH-1, factor inhibiting HIF-1; CBP/p300, CREB binding protein/p300; Ub, ubiquitin; VHL, von Hippel-Lindau protein; ROS, reactive oxygen species; HRE, hypoxia response elements.

the same DNA consensus sequence [39]. However, their functions do not overlap, and the deletion of these factors in mouse embryos exhibits that they are not redundant [40,41]. Also, while HIF1 $\alpha$  has been connected with a metabolic switch toward glycolysis and angiogenesis, HIF2 $\alpha$  has been linked with cell migration, cell proliferation, cooperation with E26 transformation-specific transcription factors, pluripotency through Oct4 induction and angiogenesis [39,42,43].

**HIF regulation** is complex, involving many factors that exert different effects both in the stability of the  $\alpha$ -subunit and in the transcriptional activity of the protein. The primary regulation process involves HIF $\alpha$  protein oxygen dependent degradation (Fig. 1).

Under normoxic conditions, HIF $\alpha$  is hydroxylated by three different Prolyl Hydroxylase Domain (PHD)

containing proteins (PDH1, PDH2 and PDH3). These proteins require 2-oxoglutarate, iron and  $O_2$  as cofactors, thus they are regarded as oxygen sensors [29,44]. In the presence of oxygen, PHDs hydroxylate prolines located within the oxygen-dependent degradation domain (ODDD) of HIF $\alpha$  in a Leu-X-X-Leu-Ala-Pro sequence motif [45]. This modification is then recognized by the von Hippel-Lindau (VHL) protein, which is a component of the E3 ubiquitin ligase complex formed by the proper VHL, elongin B, elongin C, Cul2 and Rbx1 [46-48]. Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated 8 (NEDD8) is a ubiquitin-like molecule that binds to Cullin-2 (CUL2) in the VHLcbc complex. This association is required for the degradation of HIF1 $\alpha$  mediated by VHL. As a result, HIF $\alpha$  is ubiquitinated and is therefore recognized for degradation via the 26S proteasome [49-51].

Under hypoxic conditions, HIF $\alpha$  degradation is inhibited due to lack of oxygen as a substrate of hydroxylation. PHDs exert their function, and no HIF $\alpha$  subunits are available for heterodimer formation. Therefore, HIF $\alpha$  accumulates in the nucleus where it binds to HIF $\beta$  (ARNT), promoting the activation of genes with hypoxia response elements (HREs) [31]. HIF binding to HREs could be regulated by additional modifiers such as the forkhead box protein A2 (FOXA2) and Reptin, a chromatin modifier [29].

HIF activity can also be regulated by other pathways. One involves factor inhibiting HIF1 (FIH-1), which binds HIF $\alpha$  at its C-terminal transcriptional activation domain (C-TAD) [52]. FIH-1 then hydroxylates an asparagine residue, blocking HIF $\alpha$  interaction with CREB binding protein/p300 and thus impairing HIF transcriptional activity [49,52-54]. Because of its function, FIH-1 also requires O<sub>2</sub>, thus, it supposes a second oxygen sensor in the HIF pathway [52]. In fact, FIH-1 has a higher affinity for oxygen than PHDs [55,56]. As a result, an inhibition of HIF $\alpha$  by FIH-1 would be taking place at oxygen levels where PHDs are less active [57]. Apart from FIH-1, the coactivators p300/CBP also bind many other factors. Therefore, a competitive inhibition scenario for p300/CBP might be established and might interfere with HIF signaling [33].

Environmental stresses also affect HIF-1 expression. It has been reported that under normoxic conditions HIF-1 expression could be promoted by Reactive Oxygen Species (ROS), nitric oxide (NO) and heat shock [58]. Mitochondria stimulate the production of ROS under moderate hypoxia, which inhibits PHD activity and therefore HIF degradation [29,59]. The increased ROS production stimulated by mitochondria under moderate hypoxia also favors HIF stabilization by inhibition of PHD activity [29].

Sirtuins, a NAD<sup>+</sup> dependent family of histone deacetylases, have recently been reported to modulate HIF activity as well. These enzymes represent sensors of the cellular redox state by responding to variations in the ratio of NAD<sup>+</sup>/NADH and, therefore, strengthening the link between cellular stress and HIF responses. Sirt1 has been reported to bind HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$  and to deacetylate lysine residues located within the proteins [60], as well as to enhance HIF2 $\alpha$  transcriptional activity *in vitro* due to this acetylation. As far as HIF1 $\alpha$  is concerned, the deacetylation exerted by Sirt1 causes a decrease in its transcriptional activity [61]. Sirt6 is also related to HIF1 $\alpha$  and modulates glucose levels through HIF1 $\alpha$  inhibition [29,62].

Low levels of succinate dehydrogenase and fumarase, mitochondrial enzymes of the respiratory chain and the tricarboxylic acid (TCA) cycle respectively, have been linked to stabilization of HIF1 $\alpha$  under normoxic conditions [63,64], and the glucose metabolites pyruvate and oxaloacetate inhibit HIF1 $\alpha$  protein degradation [65]. PHDs use 2-oxoglutarate, a TCA cycle intermediate, as a substrate for their enzymatic activity, which can be inhibited by other TCA intermediates [37].

Growth factor signal transduction, like Stem Cell Factor (SCF), as well as activation of the phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways, have also been suggested to enhance HIF1 expression [66]. HIF1 expression could also be enhanced by mutations in different oncogenes such as Ras, Src and HER2/Neu [57].

Finally, HIF2 $\alpha$  can also be regulated by iron, because the 5'UTR contained in its RNA includes an iron-response element [67].

### 3. HYPOXIA RESPONSE (HREs)

When activated, HIFs assemble into a heterodimer that recognizes and binds hypoxia-responsive elements (HREs) in DNA, triggering the expression of hypoxia response genes [39]. HREs contain the consensus sequence RCGTG [29], found in hundreds of genes. A previous study has shown that over 2% of all human genome is regulated by HIF1 $\alpha$  in endothelial cells [68]. HIF enables the expression of genes involved in a great variety of processes, such as erythropoiesis, angiogenesis, glucose transport and metabolism, proliferation, apoptosis, autophagy, cell motility, iron metabolism and amino-acid metabolism (Table 1) (for reviews see [69-71]). HIF $\alpha$  regulates the expression of those hundreds of genes heavily dependent on cell type and cell context [72].

### 4. HIF-INDEPENDENT HYPOXIA SIGNALING

Although less investigated, a number of studies indicate that hypoxia-induced gene expression can also be stimulated *via* HIF-independent pathways. In a model of hindlimb ischemia, peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC1 $\alpha$ ), independently from HIF, intervenes in neoangiogenesis *via* induction of VEGF expression [73]. Nuclear Factor Kappa-B (NF- $\kappa$ B) can also induce VEGF expression through HIF-independent mechanisms [74].

Hypoxia has a rapid molecular consequence: the inhibition of mRNA translation in general primarily disrupting mTOR activity [75]. It was later reported that mTOR inhibition was taking place through a HIF-independent pathway, in which AMP-activated protein kinase (AMPK) activated the tuberous sclerous protein 1 and 2 (TSC1-TSC2) complex, which resulted in mTOR downregulation [76].

Hypoxia also triggers the unfolded protein response (UPR). This response is triggered when misfolded proteins accumulate in the ER. Upon endoplasmic reticulum (ER) stress due to cell homeostasis disturbance (e.g., hypoxia), misfolded proteins accumulate and trigger UPR [77]. UPR includes three proteins that act as a sensor: PKR-like ER Kinase (PERK), inositol-requiring protein 1 (IRE1) and activating transcription factor 6 (ATF6). These three proteins are ER transmembrane integral proteins associated with a chaperone, binding immunoglobulin protein (BiP), which are able to signal ER stress to the



**Table 1. Genes regulated by HIFs.**

Cell Process	HIF-Induced Genes
<b>Survival</b>	ADM, EPO, IGF2, IGF-BP1, IGF-BP-2, IGF-BP-3, NOS2, TGF- $\alpha$ , VEGF, BCL-2
<b>Proliferation</b>	Cyclin G2, IGF2, IGF-BP1, IGF-BP-2, IGF-BP-3, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 3, c-Myc, MX1
<b>Apoptosis</b>	BNIP3, BNIP3L, Ddit4, p21, NOXA
<b>Motility</b>	AMF, c-MET, LRP1, TGF- $\alpha$ , SEMA3A
<b>Cytoskeletal structure</b>	KRT14, KRT18, KRT19, VIM, $\alpha$ 5 $\beta$ 3 integrin, $\alpha$ 5 $\beta$ 5 integrin, $\beta$ 1 integrin
<b>Adhesion</b>	CD99
<b>Transcriptional regulation</b>	DEC1, DEC2, ETS-1, nr4a1
<b>pH regulation</b>	Carbonic anhydrase 9
<b>HIF-1 activity regulation</b>	CITED2
<b>Epithelial homeostasis</b>	Intestinal trefoil factor
<b>Drug resistance</b>	MDR1, ABCB1, ABCG2
<b>Nucleotide metabolism</b>	Adenylate kinase 3, Ecto-5'-nucleotidase
<b>Iron metabolism</b>	Ceruloplasmin, Transferrin, Transferrin receptor 1, SLC25A28
<b>Glucose metabolism</b>	HK1, HK2, AMF, ENO1, GLUT1, GLUT3, GLUT4, GAPDH, PFKBF3, PFKL, PGK1, PKM, TPI, ALDA, ALDC, PGAM1, ALDOC, MIF, GYS1
<b>TCA</b>	CYCS, ABCF2, VDAC1, TMEM70, ISCU, ALDH4A1, FH
<b>Extracellular-matrix metabolism</b>	CATHD, Collagen type V ( $\alpha$ 1), FN1, MMP2, MMP9, PAI1, Prolyl-4-hydroxylase $\alpha$ (1), UPAR
<b>Energy metabolism</b>	LEP
<b>Amino-Acid metabolism</b>	Transglutaminase 2, CAD, PLOD1, P4HA1, P4HA2
<b>Pluripotency</b>	ID2, Oct4
<b>Chemokine receptors</b>	CXCR4
<b>Cancer malignancy</b>	LOX, E-cadherin, CTGF, TRPM1, TWIST
<b>Melanin synthesis</b>	SLC45A2, PMEL
<b>Erythropoiesis</b>	EPO
<b>Angiogenesis</b>	EG-VEGF, ENG, LEP, LRP1, TGF- $\beta$ 3, VEGF
<b>Vascular tone</b>	$\alpha$ 1B -adrenergic receptor, ADM, EDN1, HO-1, NOS2
<b>Other</b>	POMC, SOX9, ANKRD37, IL-8, slc11a2, RCOR2, NDRG1

ABCB1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1; ABCF2, ATP-binding cassette, sub-family F (GCN20), member 2; ABCG2, ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2; ADM, adrenomedullin; ALDA, aldolase A; ALDC, aldolase C; ALDH4a1, aldehyde dehydrogenase 4 family, member A1; AMF, autocrine motility factor; BCL-2, B-cell leukemia/lymphoma 2; ANKRD37, ankyrin repeat domain 37; BNIP3, BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3; BNIP3L, BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like; CAD, carbamoyl-phosphate synthetase 2, aspartate transcarbamylase, and dihydroorotase; CATHD, cathepsin D; CITED2, Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 2; CTGF, connective tissue growth factor; CXCR4, chemokine (C-X-C motif) receptor 4; CYCS, cytochrome c somatic; Ddit4, DNA-damage-inducible transcript 4; DEC1, deleted in esophageal cancer; DEC2, deleted in esophageal cancer; EDN1, endothelin 1; EG-VEGF, endocrine gland-derived VEGF; ENG, endoglin; ENO1, enolase 1; EPO, erythropoietin; ET1, endothelin-1; ETS1, v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1; FH, fumarate hydratase; FN1, fibronectin 1; GAPDH, glyceraldehyde-3-P-dehydrogenase; GLUT1, glucose transporter 1; GLUT3, glucose transporter 3; GLUT4, glucose transporter 4; GYS1, glycogen synthase 1; HK1, hexokinase 1; HK2, hexokinase 2; HO-1, hemoxygenase 1; ID2, inhibitor of DNA binding 2; IGF2, insulin-like growth factor 2; IGF-BP1, IGF-factor binding protein 1; IGF-BP2, IGF-factor binding protein 2; IGF-BP3, IGF-factor binding protein 3; ISCU, iron-sulfur cluster assembly enzyme; KRT14, keratin 14; KRT18, keratin 18; KRT19, keratin 19; LDHA, lactate dehydrogenase A; LEP, leptin; LOX, lysyl oxidase; LRP1, LDL-receptor-related protein 1; MDR1, multidrug resistance 1; MIF, macrophage migration inhibitory factor; MMP2, matrix metalloproteinase 2; MMP9, matrix metalloproteinase 9; MX1, Max-interacting protein 1; NDRG1, N-myc downstream regulated 1; NOS2, nitric oxide synthase 2; nr4a1, nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1; P4HA1, prolyl 4-hydroxylase, alpha polypeptide I; P4HA2, prolyl 4-hydroxylase, alpha polypeptide II; PAI1, plasminogen-activator inhibitor 1; PFKBF3, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase-3; PFKL, phosphofructokinase L; PGAM1, phosphoglycerate mutase 1; PGK 1, phosphoglycerate kinase 1; PKM, pyruvate kinase M; PLOD1, procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1; PMEL, premelanosome protein; POMC, proopiomelanocortin; RCOR2, REST corepressor 2; SEMA3A, Semaphorin 3a; slc11a2, solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporter), member 2; slc25a28, solute carrier family 25, member 28; slc45a2, solute carrier family 45, member 2; TGF- $\alpha$ , transforming growth factor- $\alpha$ ; TGF- $\beta$ 3, transforming growth factor- $\beta$ 3; TMEM70, transmembrane protein 70; TPI, triosephosphate isomerase; TRPM1, transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 1; UPAR, urokinase plasminogen activator receptor; Vdac1, voltage-dependent anion channel 1; VEGF, vascular endothelial growth factor; VEGFR2, VEGF receptor-2; VIM, vimentin.

cytosol. Misfolded proteins can directly bind the sensors or bind the BiP chaperone. When the first and/or the latter events take place, sensors become

effectors themselves and act upon targets, rendering an inhibition of protein translation. The primary substrates of PERK are eIF2a [78,79] and eIF4F [80].

However, inhibition of translation must be bypassed in order to achieve the protein synthesis required for a cellular adaptation to hypoxia. For that purpose, there are mRNAs that include internal ribosome entry site (IRES) elements. These sequences are located in the 5' untranslated region within mRNA (5' UTR). These elements allow ribosome assembly away from the cap structure [81]. Thus, these transcripts reveal themselves as resistant to inhibition through eIF4F [75]. IRESs can be found in proteins involved in cell death, growth or angiogenesis, such as VEGF-a and FGF2 [82].

**5. HYPOXIA AND CELL METABOLISM**

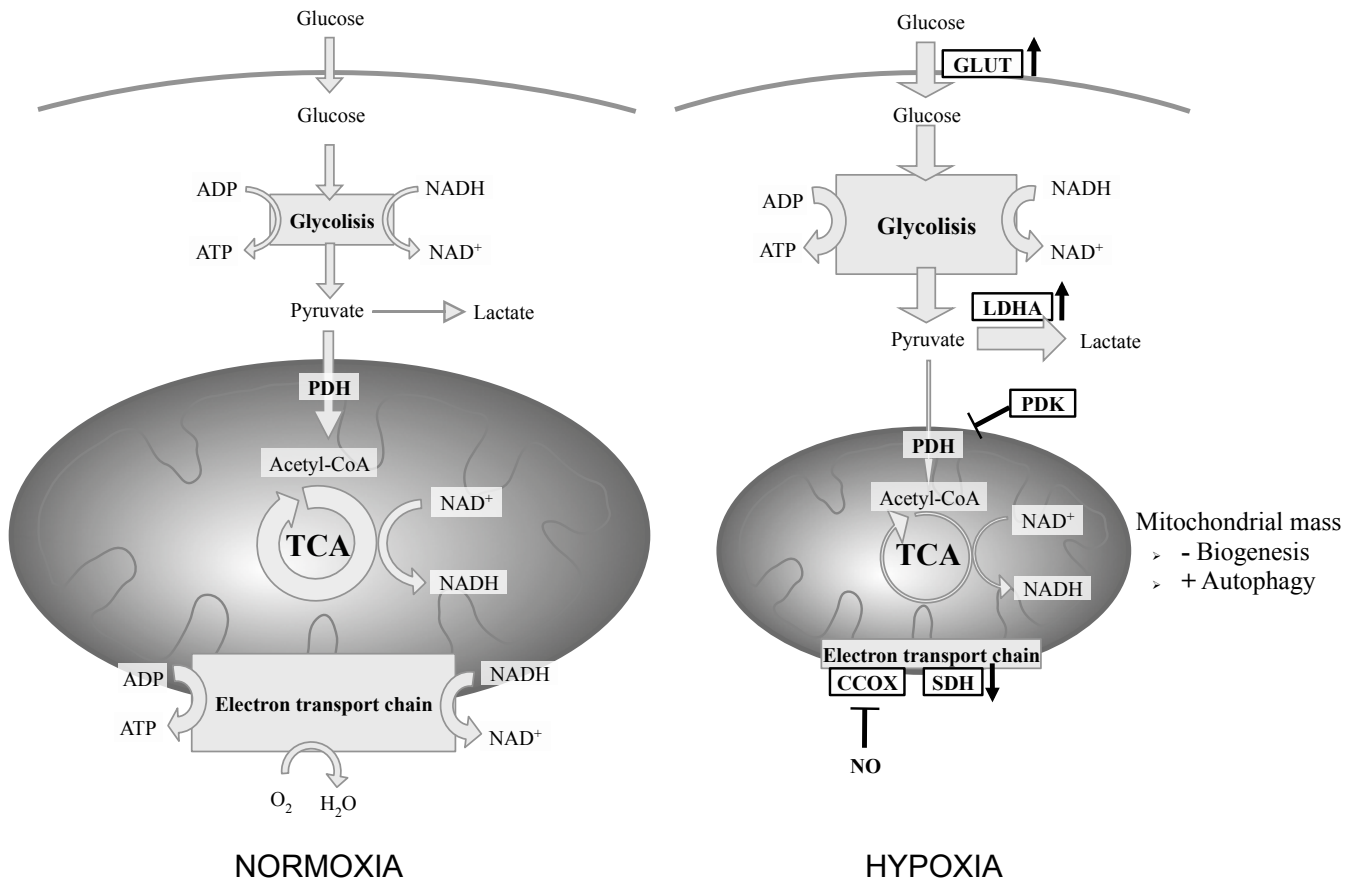
Since oxygen is the terminal electron acceptor for oxidative phosphorylation (OXPHOS) in the mitochondria, low oxygen levels lead to a switch in the cellular metabolism from OXPHOS to glycolysis (Fig. 2). An increase in the glucose consumption and uptake is necessary in order to sustain the energy demand of the cell with a glycolytic metabolism instead of a OXPHOS one. This is owing to the inefficiency of glycolysis regarding energy production, generating only 2 ATPs per molecule of glucose, instead of the 36 ATPs generated by OXPHOS. Glucose transporters like GLUT1 and GLUT4 are upregulated by HIF in hypoxia, allowing to meet this increased demand of

glucose [24,83]. The inefficiency of glycolysis promotes the reduction of the processes requiring energy that are not essential to cellular survival, like transcription, translation and related processes which rely on protein synthesis, such as cellular growth and proliferation [84]. As a result, usually, limited O<sub>2</sub> availability leads to the cessation of growth in favor of cellular survival.

This reversible metabolic reprogramming consists of mechanisms which cause several cell adaptative responses: a) the inhibition of mitochondrial oxygen consumption, b) the diversion of carbohydrates away from oxidative pathways and (c) a reduction in mitochondrial mass [85]. All these mechanisms are associated with increased levels of HIF-1α:

**5.1. Inhibition of Mitochondrial Oxygen Consumption**

This is achieved by two specific mechanisms: The first is the inhibition of cytochrome c oxidase (COX). Cytochrome c oxidase is the complex IV of the mitochondrial electron transport chain and is reversibly inhibited by nitric oxide (NO) which acts as a competitive inhibitor for O<sub>2</sub> binding [86]. When oxygen concentrations decrease, the IC<sub>50</sub> for NO decreases substantially allowing to compete for binding to COX, decreasing oxygen consumption and leading to



**Fig. (2). Hypoxia and cell metabolism.** Preferential oxphos vs glycolysis processes in cells under normoxic and hypoxic conditions, respectively. GLUT, glucose transporter; LDHA, lactate dehydrogenase A; PDH, pyruvate dehydrogenase; PDK, pyruvate dehydrogenase kinase; COX, cytochrome c oxidase; SDH, succinate dehydrogenase; NO, nitric oxide.

increased cellular oxygen availability [87]. NO Synthase isoforms (eNOS, iNOS) are reported to be upregulated directly by HIF-1 in many cell types, increasing the production of NO at the same time that oxygen concentration is falling [88,89].

The second mechanism involves the inhibition of the enzyme succinate dehydrogenase (SDH). SDH is an intermediate metabolite of the tricarboxylic acid cycle (TCA) that catalyzes the conversion of succinate to fumarate and also acts as complex II in the mitochondrial electron transport chain, enabling transfer of electrons from FADH to ubiquinone. The expression of the SDH B subunit (SDHB) is suppressed under hypoxic conditions, and therefore the oxygen consumption decreases despite of the inhibition of complex II of the electron transport chain [90]. Moreover, this inhibition impairs the transformation of succinate to fumarate in the TCA, increasing the level of succinate in the mitochondria, which acts as a competitive inhibitor of PHDs, thus preventing HIF $\alpha$  degradation [65].

### 5.2. Diversion of Metabolism from Oxidative Phosphorylation to Anaerobic Metabolism

Anaerobic metabolism must be promoted in hypoxia in order to maintain proper energy production. Pyruvate dehydrogenase (PDH) controls in large part the balance between aerobic and anaerobic metabolism. Pyruvate dehydrogenase kinase (PDK) inhibits PDH by phosphorylation of the PDH E1 regulatory subunit, blocking the entry of carbohydrates into the TCA cycle and forcing carbon flux from glucose towards lactate rather than providing reducing equivalents for oxidative metabolism (Fig. 2). In hypoxia, HIF-1 triggers the transcription of PDK1 isoform, which reduces the substrate availability for oxidative metabolism, thus decreasing oxygen consumption and again leading to increased oxygen availability. This in turn promotes the reduction in ROS production and decreases cell death [91,92].

Lactate dehydrogenase A (LDHA), an enzyme that catalyses the interconversion of pyruvate and lactate at the end of the glycolytic pathway, is also upregulated by HIF. This upregulation serves to channel pyruvate, the product of the glycolytic pathway, towards generation of lactate rather than providing substrates for the TCA cycle [70,93].

### 5.3. Reduction in Mitochondrial Mass

The reduction of mitochondrial mass is a much slower mechanism than the others. When HIF-1 is elevated, mitochondrial mass is decreased while when HIF-1 is suppressed, mitochondrial DNA is increased relative to nuclear DNA [94]. The changes in the amount of mitochondria depend on the balance between mitochondrial biogenesis and mitochondrial autophagy, both of which are being regulated by hypoxia. A direct relationship between mitochondrial biogenesis and HIF1 has been reported: HIF1 inhibits the expression and activity of the c-Myc transcription

factor, leading to reduced expression of PGC-1 $\beta$  (PPAR- $\gamma$  coactivator 1 $\beta$ ) and decreased mitochondrial biogenesis [94]. Also, mitochondrial autophagy is regulated by HIF1. Autophagy is a mechanism by which cells select altered or excess components and release them into lysosomes for its decomposition and recycling. Autophagy is promoted in response to both hypoxia and nutrient deprivation [95-97]. This process involves the induction of the apoptosis related protein BNIP3 (Bcl-2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3) by HIF1, as well as components of the autophagic machinery, including Bcl-2 and the Bcl-2 interacting protein, Beclin-1 [97]. This reduction in the mitochondria number leads to a reduced O<sub>2</sub> consumption and ROS production and, as a result, prevents cell death [98].

## 6. HYPOXIA AND CELL PROLIFERATION

The results of studies on hypoxia-induced proliferation are controversial and are heavily dependent on cell type and context. For example, in mouse embryonic stem cells (mES), hypoxia has been reported both to enhance proliferation [99] and to impair self-renewal [100].

First studies regarding the role of oxygen suggested that quiescent stem cells were found in more hypoxic areas suitable for their maintenance, whereas committed cells migrated to less hypoxic areas in order to proliferate [17]. HIF2 $\alpha$  has been shown to promote cell proliferation by stimulating c-Myc and Oct4 expression, which would provoke increased proliferation and a more undifferentiated state [42,101].

On the other hand, in human colorectal carcinoma, HIF1 $\alpha$  exerts the opposite effect and induces cell cycle arrest *via* Myc transcriptional activity inhibition [102]. Differences among HIFs in c-Myc activity are based on a proline residue located in the PAS-B (Per-Arnt-Sim) domain of various HIFs. In HIF1 $\alpha$ , this domain is responsible for association with Sp1, disrupting Sp1 association with c-Myc. However, HIF2 $\alpha$  has a proline residue within the PAS-B domain that is phosphorylated and blocks association with Sp1, which therefore remains free for association with c-Myc [103].

Remarkably, in VHL-deficient renal tumors expressing only HIF2 $\alpha$ , c-Myc-dependent proliferation is enhanced [101]. Again, inconsistent data arise from these observations because this HIF1 $\alpha$ -c-Myc downregulates the genes involved in DNA repair, which might provoke DNA damage and malignancy [104]. One more example of this is the role HIF2 $\alpha$  plays in a K-RAS-driven lung tumor model, in which loss of HIF2 $\alpha$  resulted in increased tumor growth due to the abrogation of HIF2 $\alpha$ -induced expression of secretoglobin 3a1, whereas HIF2 $\alpha$  overexpression also promoted tumor invasion [105]. HIF2 $\alpha$  has also been reported to provoke enhanced self-renewal, proliferation and survival in brain tumor stem cells [105]. The influence of HIF2 $\alpha$  on cancer stem cells and tumor growth has also been seen in glioblastomas and in colorectal and non-small lung carcinomas [106].

## 7. HYPOXIA AND PLURIPOTENCY

Several lines of data support the role of hypoxia in pluripotency, suggesting that environmental oxygen concentration is related to the development and maintenance of pluripotent stem cells. During early embryogenesis in mammals, before the onset of the circulatory system, the transport of oxygen into the embryo occurs through diffusion, which is limited to 150  $\mu\text{m}$ ; therefore, embryonic development occurs at low concentrations of oxygen, which range from 1.5% to 5.3% [7]. In adult organisms, a low oxygen concentration is found in the bone marrow, where hematopoietic and mesenchymal stem cells are found [17]. In this hypoxic microenvironment specific stem cell niches are created, which provide a suitable environment for the maintenance of the undifferentiated state and regulate the differentiation of stem cells [107] as well as confer possible protection against damage caused by oxygen [108].

Ezashi and colleagues [7] were the first to demonstrate that human embryonic stem cell (hESC) colonies maintained in a hypoxic environment showed a significant reduction in the percentage of spontaneous cell differentiation that normally takes place in hESC colonies grown in normoxia. This result demonstrated that low oxygen concentrations prevented the differentiation of hESCs, and a hypoxic condition is probably essential to keep most of the cells from an ESC colony in a state of full pluripotency. Surprisingly, in this study, the authors demonstrated that the hESCs cultured in hypoxia, when subjected to a differentiation protocol, showed an increased ability to form differentiated embryoid bodies (EBs) [7].

In studies of the gene expression analysis of hESCs cultured in a hypoxic environment, the mRNA levels of some genes involved in pluripotency (OCT4, NANOG and SOX2 (SRY (sex determining region Y)-box 2) are maintained, and other genes associated with pluripotency are overexpressed, including Lefty2, ENDRB, Sall1, Qtr2, ZIC2, FGFR2 and KLF11 SERPINE1. However, the genes associated with differentiation, such as HAND1, EOMES, H19, and MSX2 GATA6 show higher levels of expression in normoxia [109]. Similarly, other authors found that hESCs grown in hypoxia and subsequently exposed to normoxia increased the expression of lineage specific markers [110]. Another study in both human and mouse ESC showed an increase in genes related to pluripotency (Oct4, Nanog and Sox2) using a hypoxia mimetic molecule, Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP) [111].

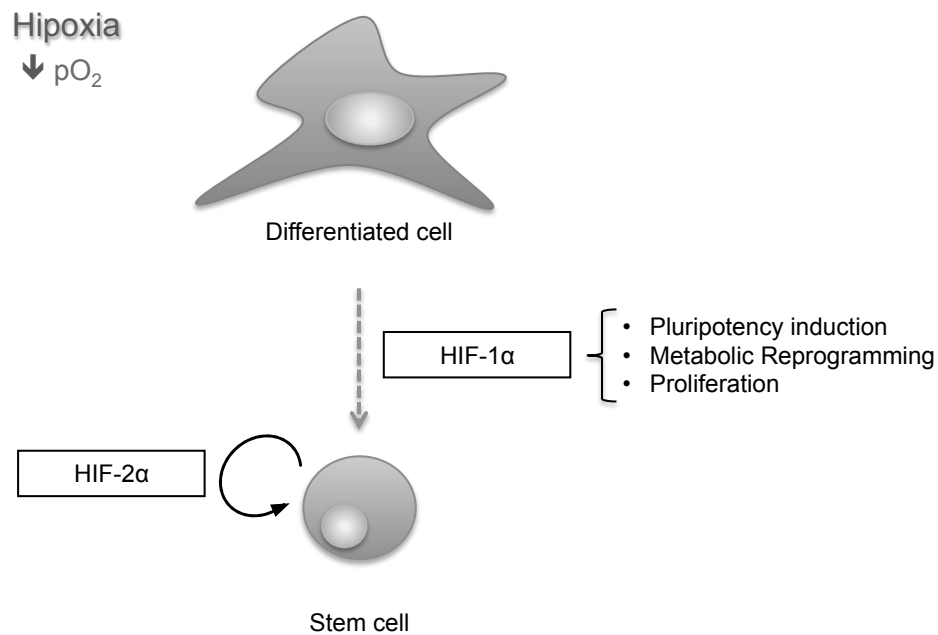
The activation of the response to hypoxia by hESCs has recently been validated in a study, which has shown HIF1 $\alpha$  expression under hypoxic conditions, but after a period of cultivation in these conditions the expression of HIF1 $\alpha$  was lost, whereas HIF2 $\alpha$  and HIF3 $\alpha$  continued to maintain their expression in the cell nucleus [112]. Silencing of HIF2 $\alpha$  and HIF3 $\alpha$  in hypoxia, but not HIF1 $\alpha$ , leads to a decrease in the levels of messenger RNA and protein of OCT4, NANOG and SOX2 genes in hESCs. In addition,

hESCs deficient in HIF2 $\alpha$  fail to proliferate, preventing their maintenance in culture [112]. These results imply that HIF1 $\alpha$  is activated in the initial response to hypoxia, but HIF2 $\alpha$  is apparently responsible for the long-term maintenance of hESCs in a hypoxic culture (Fig. 3).

In addition, neural and myogenic stem cells increase their proliferation and are maintained in an undifferentiated pluripotent state by hypoxic culture [113]. Stem neuroblastoma cells and breast cancer cells retain a more immature phenotype in hypoxic conditions [114]. However, when mESCs are cultured under 1% oxygen conditions, an inhibitory effect on self-renewal and a promotion of early differentiation through factor HIF1 $\alpha$  is exerted [100]. This result could be due to differences in the signaling pathways that maintain the pluripotent state in mouse and human cells and to the different hypoxic conditions, because variations in oxygen tension and hypoxia exposure time could lead to different genic/cellular responses [115].

Lately, studies of the genes implicated on stemness drove to the cutting-edge work of Yamanaka and Thomson, showing that compelled expression of only four transcription factors can induce mouse and human fibroblasts reprogramming into a full pluripotent state—the thus termed induced pluripotent stem cells (iPSCs) [116-118]. Interestingly, hypoxic conditions have been used to improve the efficiency of production of iPSCs from both mouse and human somatic cells, suggesting a decisive role in this reprogramming, allowing for the derivation of iPSCs using only Oct4 and Klf4 (Kruppel-like factor 4) [119]. Recently, it has been demonstrated that physiological hypoxia combined with chemical inhibitors and the classical retroviral transduction of Oct4, Sox2, Klf4 and L-Myc decreases the timing of the reprogramming process [120]. The hypoxic conditions also affect the induced iPSC differentiation, as demonstrated in a recent study in which hypoxia disrupts cardiomyocyte differentiation and enhances Wnt pathway in undifferentiated iPSCs [121].

It has recently been acknowledged that reprogramming is accompanied by metabolic changes. In particular, energy metabolism shifts from oxidative phosphorylation to glycolysis [122,123]. Moreover, several studies demonstrate that the metabolic shift is a process that occurs in cell reprogramming [122,124,125], and that a stimulation of the transcription of glycolytic genes is ahead of the augmentation of the transcription of genes that regulate self-renewal, implying that the metabolic shift has an active and early role in reprogramming. Besides, reprogramming to pluripotency is more efficient the more similar the glycolytic and oxidative phosphorylation energy metabolism profile of the starting somatic cells is to that of ESC [122], inferring some kind of metabolic memory. In this regard, hypoxia is able to revert hESC- or iPSC-derived differentiated cells back to a stem cell-like state by itself, as shown by re-activation of an Oct4-promoter reporter [126]. Moreover, we have recently demonstrated that hypoxia alone induces pluripotency in primordial germ cells



**Fig. (3). Hypoxia and pluripotency.** Molecular mechanisms involved in the cellular signaling pathway activated by hypoxia, associated with pluripotency and self-renewal of stem cells.

[127]. These findings and our data propose a way to induce the stem cell state by modifying cellular metabolism.

## 8. HYPOXIA AND CANCER PROGRESSION

There is significant evidence that solid tumors have regions that are subjected to hypoxia. Cancer cells with a high rate of proliferation cause tumors that rapidly increase in size, but are not accompanied by appropriate vascular development, limiting the diffusion of O<sub>2</sub> and generating areas of hypoxia in the tumor mass. Stress induced by hypoxia might be brought about by perfusion defects as well, as a consequence of altered structure and function of blood vessels in the tumor. It is therefore not surprising that solid tumors often show high levels of HIF1α [35]. In addition, the expression of HIF1α in cancer cells is increased by hypoxia-independent mechanisms. Genetic disorders, such as mutations in the VHL gene in renal carcinoma cells and mutations in the Wnt/β-catenin signaling pathway in colon carcinoma cells, have been demonstrated to stabilize HIF1α expression [128]. These results suggest that the transcription of HIF1α and the activation of the response to hypoxia are common in numerous types of cancers. The importance of the activity of HIF has been proven by the correlation of elevated levels of HIFα with a poor clinical prognosis in various kinds of cancer [129], and it has been shown that pharmacological HIF inhibition significantly limits tumor growth and progression in multiple cell types [130].

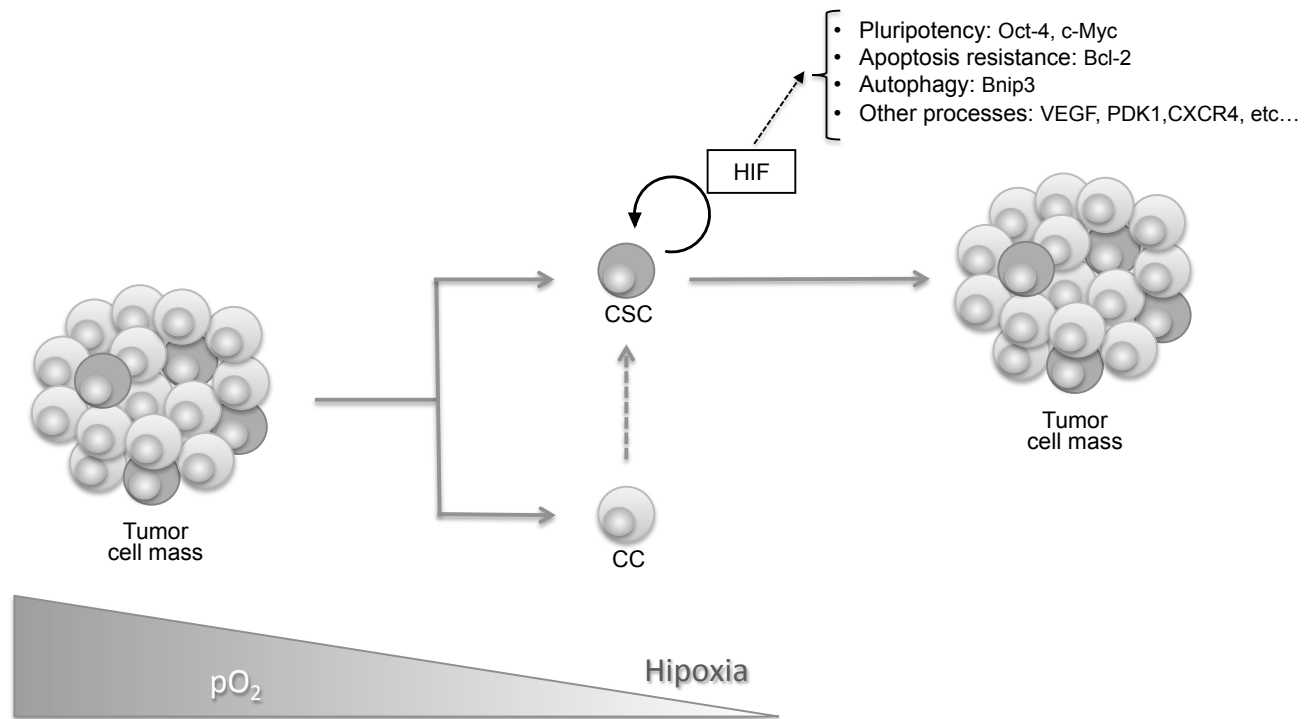
The genetic response to HIF has been partially elucidated in many aspects of tumor development, such as proliferation (MYC), angiogenesis (VEGF, platelet-derived growth factor (PDGF)), apoptosis/

autophagy (NDRG2, BNIP3), metabolism (PDK1, LDHA), response to DNA damage (growth arrest and DNA-damage-inducible alpha (GADD45A)), microRNAs (MIR210), remodeling of the extracellular matrix (LOX, MMP1), and cell migration and invasion (CXCR4, SDF1) [35,128,131].

An increasing amount of data is being gathered about the role of hypoxia in the enhancement of the appearance of cancer stem cells (CSCs) [132]. These cells constitute a subpopulation within a tumor that possess the property of self-renewal and the potential to give rise to malignant cells [133,134] (Fig. 4). CSCs are commonly chemo- and radioresistant [135].

Cancer stem cells have been associated with a niche microenvironment of low oxygen. Some authors point to the effect of hypoxia not only in promoting the maintenance of pluripotency and self-renewal characteristics, but also as an inducer of these stem cell characteristics. This idea correlates with the hypothesis defended by many authors in which cancer stem cells can be derived from differentiated cells *in vivo* [136] (Fig. 3). Therefore, cancer stem cells could result from cancer or differentiated cells under the impact of environmental factors such as hypoxia. In this regard, in distinct kinds of cancer cells, such as breast cancer cells and neuroblastoma cells [114], it has been observed that hypoxia induces a more immature phenotype of these cells, and it has been proven that hypoxia decreases typical neural markers and induces the expression of typical genes of neural progenitors, such as c-kit and Notch-1 [137].

Experimentally, it has been shown that hypoxia regulates expression of pluripotency-related genes in cancer cells. One of the mechanisms by which hypoxia is thought to induce a CSC phenotype is by targeting



**Fig. (4). Hypoxia and cancer.** Induction, maintenance and differentiation of cancer stem cells within the hypoxic tumor microenvironment.

some of the HIF downstream genes such as Oct4 and Notch-1 [138]. In this regard, embryonal carcinoma cells, the most aggressive cell population of the germ-line tumors that are considered the malignant counterpart of ES cells, express the genes Oct4, Crtr-1 and Rex-1 at similar levels as ES cultures in different low oxygen conditions [139]. In addition, Oct4 upregulation due to HIF2 $\alpha$  induction is involved in the formation of ES-derived tumors [109]. Furthermore, hypoxia has been reported to enhance oncogenic miR-21 expression [140], involved in decreased expression of the tumor suppressor PTEN [141] in antiapoptotic and invasive phenotypes [142] and in increased angiogenesis *via* HIF1 $\alpha$  [143].

In this regard, a recent study has shown that pluripotency and tumorigenicity are closely associated processes, which can be induced using similar methods for the production of iPSCs and oncogenic foci (OF), a form of *in vitro* tumor cells [144]. A study has shown that hypoxia can induce a hESC-like expression profile, including the iPSC inducers OCT4, NANOG, SOX2, KLF4, cMYC and microRNA-302 in 11 cancer cell lines from the prostate, brain, kidney, cervix, lung, colon, liver and breast [145]. The regulation of the oncogen c-Myc in hypoxic conditions has been extensively studied. It has been shown that HIF2 $\alpha$  promotes the expression of c-Myc [101], but also that HIF1 $\alpha$  antagonizes its function [146]. Apparently, when MYC family proteins are categorically overexpressed in tumors, they bypass the inhibitory action of HIF1 $\alpha$ , and promote proliferation under hypoxic conditions. In contrast, when tumors express reduced MYC levels, they are sensitive to HIF1 $\alpha$

inhibition, explaining the anti-tumorigenic action of HIF1 $\alpha$  [115].

HIFs can also alter p53 activity. Low oxygen tension activates p53. If HIF1 $\alpha$  sees its expression induced beyond HIF $\beta$  levels, HIF1 $\alpha$  can bind p53 and prevent its degradation [147]. Once p53 is stabilized, this dimer can trigger p53-dependent expression of BH3-only family members, such as NOXA and p53 upregulated modulator of apoptosis (PUMA) [148]. However, it has also been noted that HIF1 $\alpha$  is capable of inducing p53 degradation *via* mouse double minute 2 homolog (MDM2) -mediated ubiquitination [149].

Solid tumors with hypoxic regions are associated with chemotherapy resistance, and therefore, poor prognoses for patients. In a recent study utilizing 7 cancer cell lines exposed to different apoptotic drugs used in chemotherapy, it was shown that hypoxia partly prevented cell death, modulating the levels of the majority of proteins of the BCL-2 family following a cell type-dependent pattern [150]. Hypoxia can alter various signaling pathways involved in apoptosis, involving the factor HIF1 as a mechanism by which cancer cells protect themselves from apoptosis and lead to treatment resistance. This agrees with a study of prostate cancer cells, showing that overexpression of BCL-xL, an anti-apoptotic protein of the Bcl-2 family, is upregulated by HIF1 $\alpha$  [151].

Another mechanism promoting cancer cell survival in hypoxic conditions is autophagy (Fig. 4). Overexpression of Bnip3, a target gene of HIF1 $\alpha$ , is associated with induction of autophagy in cells under conditions of stress, such as hypoxia (data observed in our laboratory). Overexpression of Bnip3 in cancer

cells under hypoxia appears to be the most important modulator of the protective mechanism by which hypoxic cells protect themselves against etoposide-induced apoptotic cell death [152].

## 9. HYPOXIA AND DNA REPAIR

Genetic instability can be induced by several endogenous and exogenous cellular agents. It has been found that various levels of hypoxia cause DNA damage, which is normally produced in the form of single- or double-strand breaks (DSBs) [153]. This damage activates the DNA damage response (DDR), which consists of various kinase-signaling pathways, including ataxia telangiectasia mutated (ATM) and ataxia telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) kinases [154]. These activated pathways primarily result in a cellular response of cell cycle arrest, DNA repair, senescence or apoptosis [155]. The coordinated action of all the sensors and effectors involved in these kinase-signaling pathways, with cross-talk between them, gives rise to a defense against the original insult to maintain the integrity of the genome.

The canonical effect of hypoxia in solid tumors has been elucidated, given hypoxic regions can be found in most solid tumors. These regions have been associated with an increase in resistance to radiotherapy. It has been suggested that this fraction of tumor cells might contain the highest numbers of cancer stem cells [156]. Various levels of hypoxia have been found to induce DDR. Interestingly, this response occurs in the absence of detectable single- or double-strand breaks and in a cell state of repressed DNA repair. Controversially, inhibition of DNA repair in hypoxic cells has been proposed as a mechanism contributing to the increased genetic instability found in hypoxic conditions (recently reviewed by [157]). In cancer cells HIF-1 $\alpha$  interacts with central components of DDR, such as breast cancer susceptibility gene 1 (BRCA1) [158], ATM [159], poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) [160], DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) [161] and DNA telomeric integrity [162]. Of these, BRCA1 and DNA-PK play a crucial role in DSBs. Interestingly, hypoxia induces the autophosphorylation and recruitment of DNA-PK, which has been shown to modulate HIF-1-mediated signaling and has been associated with hypoxia-mediated changes in histone 3 acetylation [163]. It is important to mention that specific chromatin changes also occur during the initiation of the DDR response and serve to amplify signaling and facilitate repair. Hypoxia appears to be a strong modulator of many different chromatin modifications, and many hypoxia-induced histone modifications have been reported, including a set of repressive histone marks at the *BRCA* promoter [164].

In addition, ATR has recently been demonstrated to regulate HIF-1 $\alpha$ . Cells grown as spheroids treated with an ATR inhibitor (VE-821) were found to delay the induction of HIF-1 $\alpha$  and its target genes, such as GLUT-1, in hypoxic conditions. This inhibitory effect of HIF-1 $\alpha$  by ATR appears to be transient and is probably

due to the simultaneous induction of ATM, which has a stabilization function on HIF-1 $\alpha$  [165].

Homologous recombination (HR) is a critical pathway involved in the repair of breaks in the S and G2 phases of the cell cycle. Components of this pathway include RAD51, RAD52, BRCA1, and BRCA2. Hegan *et al.* [166] have proven that RAD51 and BRCA1 are transcriptionally downregulated by chronic hypoxia. This downregulation of RAD51 and BRCA1 also reduces functional HR activity. Chronic hypoxia downregulates several HR proteins, including RAD51, RAD51B/C, RAD54 and XRCC3 in a human lung carcinoma cell line [167]. Recently, a new pathway was reported to downregulate the HR gene RAD52 by hypoxia: [168] revealed that HIF1-dependent upregulation of the microRNAs mir-210 and mir-373 provokes the suppression of RAD52 transcription. They demonstrated that both microRNAs interact with the 3' untranslated region of RAD52, suggesting that mir-210 and mir-373 cause the repression of RAD52. These results imply that impairment of HR by hypoxia might force a cell to use error-prone nonhomologous end-joining signaling (NHEJ), generating many genetic alterations.

Regarding non-canonical hypoxia's effect on DNA repair, stem cell pluripotency induction is one of the most remarkable. Pluripotent stem cells lean on two different pathways in order to maintain their genomic integrity: first, they have low levels of reactive oxygen species (ROS), elevated expression of antioxidant molecules and increased fidelity of repair mechanisms; second, if they fail to amend changes caused by damaged DNA, stem cells rapidly start a senescence or a differentiation program [169,170]. In induced pluripotent stem (iPS) cells, paradoxically, this could be due to the lesser DNA damage suffered during their reprogramming in hypoxic conditions, which will not activate the set of repair genes. Hypoxia reduces mitochondria numbers and the probability of oxidative damage, which is intimately related to genomic instability. Moreover, recent studies infer that DNA repair plays an essential role in pluripotency maintenance [171], and furthermore, DNA repair processes appear to be required for successful reprogramming [170]. In fact, cell reprogramming must switch on the powerful systems of genomic stability maintenance required by pluripotent stem cells to ensure their capacity to give rise to multiple cell lineages while avoiding mutations. Studies of whether reprogramming under hypoxic conditions favors or prevents the switching on of this efficient DNA repair mechanism will be of interest not only in embryonic germ cells (EGCs) but also in iPS cells. In fact, it has been proven that at least half of the protein-coding point mutations detected in 22 analyzed iPS cell lines took place during reprogramming, regardless of the methods used [172]. Also, even when the karyotype is normal, microsatellite instability and reduced DNA repair capacities have been encountered [173], highlighting the need to address not only karyotype stability but also DNA repair ability before iPS use.

Because hypoxia is one of the factors implicated in maintaining a pluripotent state in pluripotent stem cells, many studies have been carried out to determine the possible role of hypoxia in DNA damage repair pathways. The results obtained regarding the effect of hypoxia on DNA damage varied depending on the cells in which it was studied, and there is a great deal of controversy about how the time of exposure to hypoxia affects them. It has been suggested that in human ESC, the DNA repair pathways are enhanced relative to human differentiated cells in normoxia [174].

Genetic integrity and the various components of DNA repair systems are modulated by hypoxia, resulting in changes in DNA metabolism and epigenetic regulation. Therefore, it would be of great interest to study the expression levels of the various DNA repair mechanism genes (for example, the nucleotide excision repair mechanism, the base excision repair mechanism, the non-homologous end-joining mechanism and the double strand break mismatch repair mechanism) in hypoxia-generated iPS cells by different techniques. It would also be interesting to functionally test the differential abilities of hypoxia-generated iPS cells to repair DNA damage by conferring genotoxic stresses, including UV-C irradiation, hydrogen peroxide, etoposide or psoralen exposure and measure DNA repair kinetics. Much work needs to be done in this respect.

## CONCLUDING REMARKS

Hypoxia plays several roles, both in physiological niches such as embryonic development and in adult niches that are primarily related to stem cell compartments, as well as in aberrant niches such as solid tumors. The primary transducers of the cellular hypoxia response are hypoxia-inducible factors through hypoxia responsive elements in the DNA, causing increased transcription of a myriad of genes. Hypoxia exerts its functions not only through the metabolic change from oxidative phosphorylation toward glycolysis, but also in playing a role in several different cell processes such as survival, proliferation, autophagy, apoptosis, differentiation, pluripotency and malignancy. How these processes are interrelated and how the cell defends from this stressor are starting to be elucidated.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors confirm that this article content has no conflicts of interest.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported in part by grants SAF2010-19230 from the Spanish Ministry of Science and Innovation, and Marató TV3, Spain. Authors acknowledge Juliette Siegfried (ServingMed.com) for the English editing of this manuscript.

## REFERENCES

- [1] Simon MC, Keith B. The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9: 285-96.
- [2] Carreau A, El Hafny-Rahbi B, Matejuk A, Grillon C, Kieda C. Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. *J Cell Mol Med* 2011; 15: 1239-53.
- [3] Dewhirst MW, Ong ET, Rosner GL, *et al.* Arteriolar oxygenation in tumour and subcutaneous arterioles: effects of inspired air oxygen content. *Br J Cancer Suppl* 1996; 27: S241-6.
- [4] Parmar K, Mauch P, Vergilio JA, Sackstein R, Down JD. Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 5431-6.
- [5] Quinn P, Harlow GM. The effect of oxygen on the development of preimplantation mouse embryos *in vitro*. *J Exp Zool* 1978; 206: 73-80.
- [6] Morriss GM, New DA. Effect of oxygen concentration on morphogenesis of cranial neural folds and neural crest in cultured rat embryos. *J Embryol Exp Morphol* 1979; 54: 17-35.
- [7] Ezashi T, Das P, Roberts RM. Low O<sub>2</sub> tensions and the prevention of differentiation of hES cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 4783-8.
- [8] Fischer B, Bavister BD. Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *J Reprod Fertil* 1993; 99: 673-9.
- [9] Genbacev O, Zhou Y, Ludlow JW, Fisher SJ. Regulation of human placental development by oxygen tension. *Science* 1997; 277: 1669-72.
- [10] Caniggia I, Mostachfi H, Winter J, *et al.* Hypoxia-inducible factor-1 mediates the biological effects of oxygen on human trophoblast differentiation through TGFbeta(3). *J Clin Invest* 2000; 105: 577-87.
- [11] Aplin JD. Hypoxia and human placental development. *J Clin Invest* 2000; 105: 559-60.
- [12] Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, *et al.* Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 4604-13.
- [13] Provot S, Zinyk D, Gunes Y, *et al.* Hif-1alpha regulates differentiation of limb bud mesenchyme and joint development. *J Cell Biol* 2007; 177: 451-64.
- [14] Nunn AV, Bell J, Barter P. The integration of lipid-sensing and anti-inflammatory effects: how the PPARs play a role in metabolic balance. *Nucl Recept* 2007; 5: 1.
- [15] Nakamura Y, Hinoi E, Iezaki T, *et al.* Repression of adipogenesis through promotion of Wnt/beta-catenin signaling by TIS7 up-regulated in adipocytes under hypoxia. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1832: 1117-28.
- [16] Park YK, Park B, Lee S, *et al.* Hypoxia-inducible factor-2alpha-dependent hypoxic induction of Wnt10b expression in adipogenic cells. *J Biol Chem* 2013; 288: 26311-22.
- [17] Cipolleschi MG, Dello Sbarba P, Olivotto M. The role of hypoxia in the maintenance of hematopoietic stem cells. *Blood* 1993; 82: 2031-7.
- [18] Hass R, Kasper C, Bohm S, Jacobs R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal* 2011; 9: 12.
- [19] Kimura W, Sadek HA. The cardiac hypoxic niche: emerging role of hypoxic microenvironment in cardiac progenitors. *Cardiovasc Diagn Ther* 2012; 2: 278-89.
- [20] Dakubo GD. The Warburg Phenomenon and Other Metabolic Alterations of Cancer Cells. *Mitochondrial Genetics and Cancer*. Springer Berlin Heidelberg. 2010; pp. 39-66.
- [21] Warburg O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 1956; 124: 269-70.
- [22] Boland ML, Chourasia AH, Macleod KF. Mitochondrial Dysfunction in Cancer. *Front Oncol* 2013; 3: 292.
- [23] Ayyasamy V, Owens KM, Desouki MM, *et al.* Cellular model of Warburg effect identifies tumor promoting function of UCP2 in breast cancer and its suppression by genipin. *PLoS One* 2011; 6: e24792.



- [24] Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. Principles of Biochemistry; 2nd edition. Worth, New York. 1993; pp. 114.
- [25] Ward PS, Thompson CB. Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate. *Cancer Cell* 2012; 21: 297-308.
- [26] Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 2009; 324: 1029-33.
- [27] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144: 646-74.
- [28] Gradin K, McGuire J, Wenger RH, *et al.* Functional interference between hypoxia and dioxin signal transduction pathways: competition for recruitment of the Arnt transcription factor. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 5221-31.
- [29] Majmundar AJ, Wong WJ, Simon MC. Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Mol Cell* 2010; 40: 294-309.
- [30] Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 5510-4.
- [31] Carrero P, Okamoto K, Coumailleau P, *et al.* Redox-regulated recruitment of the transcriptional coactivators CREB-binding protein and SRC-1 to hypoxia-inducible factor 1alpha. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 402-15.
- [32] Ruas JL, Poellinger L. Hypoxia-dependent activation of HIF into a transcriptional regulator. *Semin Cell Dev Biol* 2005; 16: 514-22.
- [33] Kaluz S, Kaluzova M, Stanbridge EJ. Regulation of gene expression by hypoxia: integration of the HIF-transduced hypoxic signal at the hypoxia-responsive element. *Clin Chim Acta* 2008; 395: 6-13.
- [34] Wang V, Davis DA, Haque M, Huang LE, Yarchoan R. Differential gene up-regulation by hypoxia-inducible factor-1alpha and hypoxia-inducible factor-2alpha in HEK293T cells. *Cancer Res* 2005; 65: 3299-306.
- [35] Bertout JA, Patel SA, Simon MC. The impact of O<sub>2</sub> availability on human cancer. *Nat Rev Cancer* 2008; 8: 967-75.
- [36] Heikkila M, Pasanen A, Kivirikko KI, Myllyharju J. Roles of the human hypoxia-inducible factor (HIF)-3alpha variants in the hypoxia response. *Cell Mol Life Sci* 2011; 68: 3885-901.
- [37] Maynard MA, Evans AJ, Hosomi T, *et al.* Human HIF-3alpha4 is a dominant-negative regulator of HIF-1 and is down-regulated in renal cell carcinoma. *FASEB J* 2005; 19: 1396-406.
- [38] Maynard MA, Evans AJ, Shi W, *et al.* Dominant-negative HIF-3 alpha 4 suppresses VHL-null renal cell carcinoma progression. *Cell Cycle* 2007; 6: 2810-6.
- [39] Aprelikova O, Wood M, Tackett S, Chandramouli GV, Barrett JC. Role of ETS transcription factors in the hypoxia-inducible factor-2 target gene selection. *Cancer Res* 2006; 66: 5641-7.
- [40] Kotch LE, Iyer NV, Laughner E, Semenza GL. Defective vascularization of HIF-1alpha-null embryos is not associated with VEGF deficiency but with mesenchymal cell death. *Dev Biol* 1999; 209: 254-67.
- [41] Tian H, Hammer RE, Matsumoto AM, Russell DW, McKnight SL. The hypoxia-responsive transcription factor EPAS1 is essential for catecholamine homeostasis and protection against heart failure during embryonic development. *Genes Dev* 1998; 12: 3320-4.
- [42] Covello KL, Kehler J, Yu H, *et al.* HIF-2alpha regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. *Genes Dev* 2006; 20: 557-70.
- [43] Elvert G, Kappel A, Heidenreich R, *et al.* Cooperative interaction of hypoxia-inducible factor-2alpha (HIF-2alpha) and Ets-1 in the transcriptional activation of vascular endothelial growth factor receptor-2 (Flk-1). *J Biol Chem* 2003; 278: 7520-30.
- [44] Semenza GL. Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci* 2012; 33: 207-14.
- [45] Sharp FR, Ran R, Lu A, *et al.* Hypoxic preconditioning protects against ischemic brain injury. *NeuroRx* 2004; 1: 26-35.
- [46] Kaelin WG, Jr. The von Hippel-Lindau gene, kidney cancer, and oxygen sensing. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 2703-11.
- [47] Kamura T, Sato S, Iwai K, *et al.* Activation of HIF1alpha ubiquitination by a reconstituted von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 10430-5.
- [48] Kondo K, Kaelin WG, Jr. The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene. *Exp Cell Res* 2001; 264: 117-25.
- [49] Brahimi-Horn MC, Chiche J, Pouyssegur J. Hypoxia signalling controls metabolic demand. *Curr Opin Cell Biol* 2007; 19: 223-9.
- [50] Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, *et al.* The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 1999; 399: 271-5.
- [51] Salceda S, Caro J. Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem* 1997; 272: 22642-7.
- [52] Lando D, Peet DJ, Whelan DA, Gorman JJ, Whitelaw ML. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science* 2002; 295: 858-61.
- [53] Webb JD, Coleman ML, Pugh CW. Hypoxia, hypoxia-inducible factors (HIF), HIF hydroxylases and oxygen sensing. *Cell Mol Life Sci* 2009; 66: 3539-54.
- [54] Mahon PC, Hirota K, Semenza GL. FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev* 2001; 15: 2675-86.
- [55] Koivunen P, Hirsila M, Gunzler V, Kivirikko KI, Myllyharju J. Catalytic properties of the asparaginyl hydroxylase (FIH) in the oxygen sensing pathway are distinct from those of its prolyl 4-hydroxylases. *J Biol Chem* 2004; 279: 9899-904.
- [56] Peet DJ, Lando D, Whelan DA, Whitelaw ML, Gorman JJ. Oxygen-dependent asparagine hydroxylation. *Methods Enzymol* 2004; 381: 467-87.
- [57] Zhang N, Fu Z, Linke S, *et al.* The asparaginyl hydroxylase factor inhibiting HIF-1alpha is an essential regulator of metabolism. *Cell Metab* 2010; 11: 364-78.
- [58] Lum JJ, Bui T, Gruber M, *et al.* The transcription factor HIF-1alpha plays a critical role in the growth factor-dependent regulation of both aerobic and anaerobic glycolysis. *Genes Dev* 2007; 21: 1037-49.
- [59] Kaelin WG, Jr. ROS: really involved in oxygen sensing. *Cell Metab* 2005; 1: 357-8.
- [60] Dioum EM, Chen R, Alexander MS, *et al.* Regulation of hypoxia-inducible factor 2alpha signaling by the stress-responsive deacetylase sirtuin 1. *Science* 2009; 324: 1289-93.
- [61] Lim JH, Lee YM, Chun YS, *et al.* Sirtuin 1 modulates cellular responses to hypoxia by deacetylating hypoxia-inducible factor 1alpha. *Mol Cell* 2010; 38: 864-78.
- [62] Zhong L, D'Urso A, Toiber D, *et al.* The histone deacetylase Sirt6 regulates glucose homeostasis via Hif1alpha. *Cell* 2010; 140: 280-93.
- [63] Isaacs JS, Jung YJ, Mole DR, *et al.* HIF overexpression correlates with biallelic loss of fumarate hydratase in renal cancer: novel role of fumarate in regulation of HIF stability. *Cancer Cell* 2005; 8: 143-53.
- [64] Selak MA, Armour SM, MacKenzie ED, *et al.* Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF-alpha prolyl hydroxylase. *Cancer Cell* 2005; 7: 77-85.
- [65] Lu H, Dalgard CL, Mohyeldin A, *et al.* Reversible inactivation of HIF-1 prolyl hydroxylases allows cell metabolism to control basal HIF-1. *J Biol Chem* 2005; 280: 41928-39.
- [66] Pedersen M, Lofstedt T, Sun J, *et al.* Stem cell factor induces HIF-1alpha at normoxia in hematopoietic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 377: 98-103.
- [67] Sanchez M, Galy B, Muckenthaler MU, Hentze MW. Iron-regulatory proteins limit hypoxia-inducible factor-2alpha expression in iron deficiency. *Nat Struct Mol Biol* 2007; 14: 420-6.

- [68] Manalo DJ, Rowan A, Lavoie T, *et al.* Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood* 2005; 105: 659-69.
- [69] Lee JW, Bae SH, Jeong JW, Kim SH, Kim KW. Hypoxia-inducible factor (HIF-1)alpha: its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med* 2004; 36: 1-12.
- [70] Semenza GL. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends Mol Med* 2002; 8: S62-7.
- [71] Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 721-32.
- [72] Zbytek B, Peacock DL, Seagroves TN, Slominski A. Putative role of HIF transcriptional activity in melanocytes and melanoma biology. *Dermatoendocrinol* 2013; 5: 239-51.
- [73] Arany Z, Foo SY, Ma Y, *et al.* HIF-independent regulation of VEGF and angiogenesis by the transcriptional coactivator PGC-1alpha. *Nature* 2008; 451: 1008-12.
- [74] Mizukami Y, Kohgo Y, Chung DC. Hypoxia inducible factor-1 independent pathways in tumor angiogenesis. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 5670-4.
- [75] Arsham AM, Howell JJ, Simon MC. A novel hypoxia-inducible factor-independent hypoxic response regulating mammalian target of rapamycin and its targets. *J Biol Chem* 2003; 278: 29655-60.
- [76] Liu L, Cash TP, Jones RG, *et al.* Hypoxia-induced energy stress regulates mRNA translation and cell growth. *Mol Cell* 2006; 21: 521-31.
- [77] Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 519-29.
- [78] Koumenis C, Wouters BG. "Translating" tumor hypoxia: unfolded protein response (UPR)-dependent and UPR-independent pathways. *Mol Cancer Res* 2006; 4: 423-36.
- [79] Wouters BG, Koritzinsky M. Hypoxia signalling through mTOR and the unfolded protein response in cancer. *Nat Rev Cancer* 2008; 8: 851-64.
- [80] Dever TE. Gene-specific regulation by general translation factors. *Cell* 2002; 108: 545-56.
- [81] Vagner S, Galy B, Pyronnet S. Irresistible IRES. Attracting the translation machinery to internal ribosome entry sites. *EMBO Rep* 2001; 2: 893-8.
- [82] Bornes S, Prado-Lourenco L, Bastide A, *et al.* Translational induction of VEGF internal ribosome entry site elements during the early response to ischemic stress. *Circ Res* 2007; 100: 305-8.
- [83] Hu CJ, Iyer S, Sataur A, *et al.* Differential regulation of the transcriptional activities of hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in stem cells. *Mol Cell Biol* 2006; 26: 3514-26.
- [84] Hochachka PW, Lutz PL. Mechanism, origin, and evolution of anoxia tolerance in animals. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2001; 130: 435-59.
- [85] Illsley NP, Caniggia I, Zamudio S. Placental metabolic reprogramming: do changes in the mix of energy-generating substrates modulate fetal growth? *Int J Dev Biol* 2010; 54: 409-19.
- [86] Erusalimsky JD, Moncada S. Nitric oxide and mitochondrial signaling: from physiology to pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 2524-31.
- [87] Hagen T, Taylor CT, Lam F, Moncada S. Redistribution of intracellular oxygen in hypoxia by nitric oxide: effect on HIF1alpha. *Science* 2003; 302: 1975-8.
- [88] Abe H, Ishikawa W, Kushima T, *et al.* Nitric oxide induces vascular endothelial growth factor expression in the rat placenta *in vivo* and *in vitro*. *Biosci Biotechnol Biochem* 2013; 77: 971-6.
- [89] Cullis ER, Kalber TL, Ashton SE, *et al.* Tumour overexpression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) increases angiogenesis and may modulate the anti-tumour effects of the vascular disrupting agent ZD6126. *Microvasc Res* 2006; 71: 76-84.
- [90] Dahia PL, Ross KN, Wright ME, *et al.* A HIF1alpha regulatory loop links hypoxia and mitochondrial signals in pheochromocytomas. *PLoS Genet* 2005; 1: 72-80.
- [91] Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab* 2006; 3: 177-85.
- [92] Papatreou I, Cairns RA, Fontana L, Lim AL, Denko NC. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab* 2006; 3: 187-97.
- [93] Firth JD, Ebert BL, Ratcliffe PJ. Hypoxic regulation of lactate dehydrogenase A. Interaction between hypoxia-inducible factor 1 and cAMP response elements. *J Biol Chem* 1995; 270: 21021-7.
- [94] Zhang H, Gao P, Fukuda R, *et al.* HIF-1 inhibits mitochondrial biogenesis and cellular respiration in VHL-deficient renal cell carcinoma by repression of C-MYC activity. *Cancer Cell* 2007; 11: 407-20.
- [95] Hamacher-Brady A, Brady NR, Logue SE, *et al.* Response to myocardial ischemia/reperfusion injury involves Bnip3 and autophagy. *Cell Death Differ* 2007; 14: 146-57.
- [96] Yan L, Vatner DE, Kim SJ, *et al.* Autophagy in chronically ischemic myocardium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 13807-12.
- [97] Zhu H, Tannous P, Johnstone JL, *et al.* Cardiac autophagy is a maladaptive response to hemodynamic stress. *J Clin Invest* 2007; 117: 1782-93.
- [98] Zhang H, Bosch-Marce M, Shimoda LA, *et al.* Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *J Biol Chem* 2008; 283: 10892-903.
- [99] Lee SH, Heo JS, Han HJ. Effect of hypoxia on 2-deoxyglucose uptake and cell cycle regulatory protein expression of mouse embryonic stem cells: involvement of Ca<sup>2+</sup> /PKC, MAPKs and HIF-1alpha. *Cell Physiol Biochem* 2007; 19: 269-82.
- [100] Jeong CH, Lee HJ, Cha JH, *et al.* Hypoxia-inducible factor-1 alpha inhibits self-renewal of mouse embryonic stem cells *in Vitro* via negative regulation of the leukemia inhibitory factor-STAT3 pathway. *J Biol Chem* 2007; 282: 13672-9.
- [101] Gordan JD, Bertout JA, Hu CJ, Diehl JA, Simon MC. HIF-2alpha promotes hypoxic cell proliferation by enhancing c-myc transcriptional activity. *Cancer Cell* 2007; 11: 335-47.
- [102] Koshiji M, Kageyama Y, Pete EA, *et al.* HIF-1alpha induces cell cycle arrest by functionally counteracting Myc. *EMBO J* 2004; 23: 1949-56.
- [103] To KK, Sedelnikova OA, Samons M, Bonner WM, Huang LE. The phosphorylation status of PAS-B distinguishes HIF-1alpha from HIF-2alpha in NBS1 repression. *EMBO J* 2006; 25: 4784-94.
- [104] Yoo YG, Hayashi M, Christensen J, Huang LE. An essential role of the HIF-1alpha-c-Myc axis in malignant progression. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1177: 198-204.
- [105] Kim WY, Perera S, Zhou B, *et al.* HIF2alpha cooperates with RAS to promote lung tumorigenesis in mice. *J Clin Invest* 2009; 119: 2160-70.
- [106] Franovic A, Holterman CE, Payette J, Lee S. Human cancers converge at the HIF-2alpha oncogenic axis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 21306-11.
- [107] Moore KA, Lemischka IR. Stem cells and their niches. *Science* 2006; 311: 1880-5.
- [108] Diabira S, Morandi X. Gliomagenesis and neural stem cells: Key role of hypoxia and concept of tumor "neo-niche". *Med Hypotheses* 2008; 70: 96-104.
- [109] Westfall SD, Sachdev S, Das P, *et al.* Identification of oxygen-sensitive transcriptional programs in human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 2008; 17: 869-81.
- [110] Lengner CJ, Gimelbrant AA, Erwin JA, *et al.* Derivation of pre-X inactivation human embryonic stem cells under physiological oxygen concentrations. *Cell* 2010; 141: 872-83.
- [111] Mandal S, Lindgren AG, Srivastava AS, Clark AT, Banerjee U. Mitochondrial function controls proliferation and early differentiation potential of embryonic stem cells. *Stem Cells* 2011; 29: 486-95.
- [112] Forrestal CE, Wright KL, Hanley NA, Oreffo RO, Houghton FD. Hypoxia inducible factors regulate pluripotency and proliferation in human embryonic stem cells cultured at reduced oxygen tensions. *Reproduction* 2010; 139: 85-97.

- [113] Gustafsson MV, Zheng X, Pereira T, *et al.* Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state. *Dev Cell* 2005; 9: 617-28.
- [114] Axelson H, Fredlund E, Ovenberger M, Landberg G, Pahlman S. Hypoxia-induced dedifferentiation of tumor cells—a mechanism behind heterogeneity and aggressiveness of solid tumors. *Semin Cell Dev Biol* 2005; 16: 554-63.
- [115] Keith B, Johnson RS, Simon MC. HIF1alpha and HIF2alpha: sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nat Rev Cancer* 2012; 12: 9-22.
- [116] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131: 861-72.
- [117] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126: 663-76.
- [118] Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, *et al.* Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science* 2009; 324: 797-801.
- [119] Yoshida Y, Takahashi K, Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Hypoxia enhances the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2009; 5: 237-41.
- [120] Shimada H, Hashimoto Y, Nakada A, Shigeno K, Nakamura T. Accelerated generation of human induced pluripotent stem cells with retroviral transduction and chemical inhibitors under physiologic hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 417: 659-64.
- [121] Medley TL, Furtado M, Lam NT, *et al.* Effect of oxygen on cardiac differentiation in mouse iPS cells: role of hypoxia inducible factor-1 and Wnt/beta-catenin signaling. *PLoS One* 2013; 8: e80280.
- [122] Panopoulos AD, Yanes O, Ruiz S, *et al.* The metabolome of induced pluripotent stem cells reveals metabolic changes occurring in somatic cell reprogramming. *Cell Res* 2012; 22: 168-77.
- [123] Zhang J, Nuebel E, Daley GQ, Koehler CM, Teitell MA. Metabolic regulation in pluripotent stem cells during reprogramming and self-renewal. *Cell Stem Cell* 2012; 11: 589-95.
- [124] Folmes CD, Nelson TJ, Martinez-Fernandez A, *et al.* Somatic oxidative bioenergetics transitions into pluripotency-dependent glycolysis to facilitate nuclear reprogramming. *Cell Metab* 2011; 14: 264-71.
- [125] Zhu S, Li W, Zhou H, *et al.* Reprogramming of human primary somatic cells by OCT4 and chemical compounds. *Cell Stem Cell* 2010; 7: 651-5.
- [126] Mathieu J, Zhang Z, Nelson A, *et al.* Hypoxia induces re-entry of committed cells into pluripotency. *Stem Cells* 2013; 31: 1737-48.
- [127] Lopez-Iglesias P, Alcaina Y, Tapia N, *et al.* Hypoxia Induces Pluripotency in Primordial Germ Cells by HIF1alpha Stabilization and Oct4 Dereglulation. *Antioxid Redox Signal* 2015; 22: 205-23.
- [128] Kaelin WG, Jr. The von Hippel-Lindau tumour suppressor protein: O2 sensing and cancer. *Nat Rev Cancer* 2008; 8: 865-73.
- [129] Semenza GL. Evaluation of HIF-1 inhibitors as anticancer agents. *Drug Discov Today* 2007; 12: 853-9.
- [130] Shay JE, Imtiyaz HZ, Sivanand S, *et al.* Inhibition of hypoxia-inducible factors limits tumor progression in a mouse model of colorectal cancer. *Carcinogenesis* 2014; 35: 1067-77.
- [131] Huang X, Ding L, Bennewith KL, *et al.* Hypoxia-inducible mir-210 regulates normoxic gene expression involved in tumor initiation. *Mol Cell* 2009; 35: 856-67.
- [132] Heddeleston JM, Li Z, Lathia JD, *et al.* Hypoxia inducible factors in cancer stem cells. *Br J Cancer* 2010; 102: 789-95.
- [133] Raya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414: 105-11.
- [134] Sarkar FH, Li Y, Wang Z, Kong D. Pancreatic cancer stem cells and EMT in drug resistance and metastasis. *Minerva Chir* 2009; 64: 489-500.
- [135] Bao S, Wu Q, McLendon RE, *et al.* Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 2006; 444: 756-60.
- [136] Krivtsov AV, Twomey D, Feng Z, *et al.* Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. *Nature* 2006; 442: 818-22.
- [137] Jogi A, Ora I, Nilsson H, *et al.* Hypoxia alters gene expression in human neuroblastoma cells toward an immature and neural crest-like phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 7021-6.
- [138] McCord AM, Jamal M, Shankavaram UT, *et al.* Physiologic oxygen concentration enhances the stem-like properties of CD133+ human glioblastoma cells *in vitro*. *Mol Cancer Res* 2009; 7: 489-97.
- [139] Silvan U, Diez-Torre A, Arluzea J, *et al.* Hypoxia and pluripotency in embryonic and embryonal carcinoma stem cell biology. *Differentiation* 2009; 78: 159-68.
- [140] Bao B, Ahmad A, Kong D, *et al.* Hypoxia induced aggressiveness of prostate cancer cells is linked with deregulated expression of VEGF, IL-6 and miRNAs that are attenuated by CDF. *PLoS One* 2012; 7: e43726.
- [141] Bao B, Ali S, Kong D, *et al.* Anti-tumor activity of a novel compound-CDF is mediated by regulating miR-21, miR-200, and PTEN in pancreatic cancer. *PLoS One* 2011; 6: e17850.
- [142] Moriyama T, Ohuchida K, Mizumoto K, *et al.* MicroRNA-21 modulates biological functions of pancreatic cancer cells including their proliferation, invasion, and chemoresistance. *Mol Cancer Ther* 2009; 8: 1067-74.
- [143] Liu LZ, Li C, Chen Q, *et al.* MiR-21 induced angiogenesis through AKT and ERK activation and HIF-1alpha expression. *PLoS One* 2011; 6: e19139.
- [144] Riggs JW, Barrilleaux BL, Varlakhanova N, *et al.* Induced pluripotency and oncogenic transformation are related processes. *Stem Cells Dev* 2013; 22: 37-50.
- [145] Mathieu J, Zhang Z, Zhou W, *et al.* HIF induces human embryonic stem cell markers in cancer cells. *Cancer Res* 2011; 71: 4640-52.
- [146] Gordan JD, Thompson CB, Simon MC. HIF and c-Myc: sibling rivals for control of cancer cell metabolism and proliferation. *Cancer Cell* 2007; 12: 108-13.
- [147] An WG, Kanekal M, Simon MC, *et al.* Stabilization of wild-type p53 by hypoxia-inducible factor 1alpha. *Nature* 1998; 392: 405-8.
- [148] Aminova LR, Siddiq A, Ratan RR. Antioxidants, HIF prolyl hydroxylase inhibitors or short interfering RNAs to BNIP3 or PUMA, can prevent prodeath effects of the transcriptional activator, HIF-1alpha, in a mouse hippocampal neuronal line. *Antioxid Redox Signal* 2008; 10: 1989-98.
- [149] Ravi R, Mookerjee B, Bhujwala ZM, *et al.* Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Genes Dev* 2000; 14: 34-44.
- [150] Sermeus A, Genin M, Maincent A, *et al.* Hypoxia-induced modulation of apoptosis and BCL-2 family proteins in different cancer cell types. *PLoS One* 2012; 7: e47519.
- [151] Chen N, Chen X, Huang R, *et al.* BCL-xL is a target gene regulated by hypoxia-inducible factor-1{alpha}. *J Biol Chem* 2009; 284: 10004-12.
- [152] Cosse JP, Rommelaere G, Ninane N, Arnould T, Michiels C. BNIP3 protects HepG2 cells against etoposide-induced cell death under hypoxia by an autophagy-independent pathway. *Biochem Pharmacol* 2010; 80: 1160-9.
- [153] Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 2009; 461: 1071-8.
- [154] Cimprich KA, Cortez D. ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9: 616-27.
- [155] Ciccia A, Elledge SJ. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell* 2010; 40: 179-204.
- [156] Heddeleston JM, Li Z, McLendon RE, Hjelmeland AB, Rich JN. The hypoxic microenvironment maintains glioblastoma stem cells and promotes reprogramming towards a cancer stem cell phenotype. *Cell Cycle* 2009; 8: 3274-84.
- [157] Olcina MM, Hammond EM. Hypoxia and the DNA Damage Response. In: Melillo G, editor. *Hypoxia and Cancer: Biological Implications and Therapeutic Opportunities*: Springer Science & Business Media. 2013; pp. 377.
- [158] Rohwer N, Zasada C, Kempa S, Cramer T. The growing complexity of HIF-1alpha's role in tumorigenesis: DNA repair and beyond. *Oncogene* 2013; 32: 3569-76.

- [159] Cam H, Easton JB, High A, Houghton PJ. mTORC1 signaling under hypoxic conditions is controlled by ATM-dependent phosphorylation of HIF-1 $\alpha$ . *Mol Cell* 2010; 40: 509-20.
- [160] Elser M, Borsig L, Hassa PO, *et al.* Poly(ADP-ribose) polymerase 1 promotes tumor cell survival by coactivating hypoxia-inducible factor-1-dependent gene expression. *Mol Cancer Res* 2008; 6: 282-90.
- [161] Wirthner R, Wrann S, Balamurugan K, Wenger RH, Stiehl DP. Impaired DNA double-strand break repair contributes to chemoresistance in HIF-1  $\alpha$ -deficient mouse embryonic fibroblasts. *Carcinogenesis* 2008; 29: 2306-16.
- [162] Yatabe N, Kyo S, Maida Y, *et al.* HIF-1-mediated activation of telomerase in cervical cancer cells. *Oncogene* 2004; 23: 3708-15.
- [163] Bouquet F, Ousset M, Biard D, *et al.* A DNA-dependent stress response involving DNA-PK occurs in hypoxic cells and contributes to cellular adaptation to hypoxia. *J Cell Sci* 2011; 124: 1943-51.
- [164] Glazer PM, Hegan DC, Lu Y, Czocho J, Scanlon SE. Hypoxia and DNA repair. *Yale J Biol Med* 2013; 86: 443-51.
- [165] Pires IM, Olcina MM, Anbalagan S, *et al.* Targeting radiation-resistant hypoxic tumour cells through ATR inhibition. *Br J Cancer* 2012; 107: 291-9.
- [166] Hegan DC, Lu Y, Stachelek GC, *et al.* Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase down-regulates BRCA1 and RAD51 in a pathway mediated by E2F4 and p130. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 2201-6.
- [167] Chan N, Koritzinsky M, Zhao H, *et al.* Chronic hypoxia decreases synthesis of homologous recombination proteins to offset chemoresistance and radioresistance. *Cancer Res* 2008; 68: 605-14.
- [168] Crosby ME, Devlin CM, Glazer PM, Calin GA, Ivan M. Emerging roles of microRNAs in the molecular responses to hypoxia. *Curr Pharm Des* 2009; 15: 3861-6.
- [169] Facucho-Oliveira JM, St John JC. The relationship between pluripotency and mitochondrial DNA proliferation during early embryo development and embryonic stem cell differentiation. *Stem Cell Rev* 2009; 5: 140-58.
- [170] Rocha CR, Lerner LK, Okamoto OK, Marchetto MC, Menck CF. The role of DNA repair in the pluripotency and differentiation of human stem cells. *Mutat Res* 2013; 752: 25-35.
- [171] Nagaria P, Robert C, Rassool FV. DNA double-strand break response in stem cells: mechanisms to maintain genomic integrity. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1830: 2345-53.
- [172] Gore A, Li Z, Fung HL, *et al.* Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. *Nature* 2011; 471: 63-7.
- [173] Luo LZ, Gopalakrishna-Pillai S, Nay SL, *et al.* DNA repair in human pluripotent stem cells is distinct from that in non-pluripotent human cells. *PLoS One* 2012; 7: e30541.
- [174] Maynard S, Swistowska AM, Lee JW, *et al.* Human embryonic stem cells have enhanced repair of multiple forms of DNA damage. *Stem Cells* 2008; 26: 2266-74.