



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Facultad de **C**iencias **B**iológicas

Departamento de Biología Celular

REPROGRAMACIÓN CELULAR,
DINÁMICA MITOCONDRIAL
Y METABOLISMO

TESIS DOCTORAL

Presentada por D. Javier Prieto Martínez

Dirigida por el Dr. José Manuel Torres Ibáñez

Programa de Doctorado en Biotecnología

Noviembre de 2016



VNIVERSITAT
D VALÈNCIA

Departament de Biologia Cel·lular,
Biologia Funcional i Antropologia Física

D. **José Manuel Torres Ibáñez**, investigador del Departamento de Biología Celular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Valencia,

CERTIFICA QUE

D. **Javier Prieto Martínez**, licenciado en Bioquímica y máster en Aproximaciones Moleculares en Ciencias de la Salud por la Universidad de Valencia, ha realizado bajo su dirección el trabajo de investigación titulado "*Reprogramación celular, dinámica mitocondrial y metabolismo*" para la obtención del título de Doctor por la Universidad de Valencia

Para que así conste, y en cumplimiento de la legislación vigente, firma el presente certificado en

Valencia, 14 de noviembre de 2016

Dr. José Manuel Torres Ibáñez

VLC/CAMPUS
VALENCIA, INTERNATIONAL CAMPUS OF EXCELLENCE



CAMPUSHABITAT5U

Campus de Burjassot-Paterna
Av. Vicent Andrés Estellés, 50
46100, Burjassot (Valencia)

telf. 963544681 fax 963544284 www.uv.es/biocelfunc
dep.biologia.celular.funcional.antropolo.fis@uv.es

Para la realización de este trabajo de tesis doctoral, el autor ha sido beneficiario de una *ayuda para la contratación de personal investigador de carácter predoctoral* del Programa VALi+d (Exp. ACIF/2013/237) de la Conselleria d'Educació, Formació i Ocupació (DOCV. Num. 6791 / 07.06.2012) de la Generalitat Valenciana.

La investigación se ha enmarcado dentro de los proyectos: “Células madre pluripotentes inducidas para el modelado de la enfermedad Charcot-Marie-Tooth” 2013-2015 (PI12/00638) del Instituto de Saludo Carlos III, Fondo de Investigación Sanitaria (FIS), Ministerio de Economía y Competitividad, y “Papel de las MAP quinasas y la dinámica mitocondrial en la reprogramación y la transdiferenciación celular” 2016-2018 (BFU2015-68366-R) del Ministerio de Economía y Competitividad; ambos co-financiados por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).

Durante este trabajo, el autor fue beneficiario de una *beca para estancias cortas de contratados predoctorales en centros de investigación fuera de la Comunidad Valenciana* del Programa VALi+d (Exp. BEFPI/2015/040) de la Conselleria d'Educació, Investigació, Cultura i Esport (DOCV. Num. 7332 / 05.08.2014) de la Generalitat Valenciana para la realización de una estancia de 6 meses en el centro National Institutes of Health, Bethesda, USA, bajo la supervisión de la Dra. Jennifer Lippincott-Schwartz (Cell Biology and Metabolism Department, National Institute of Child Health and Human Development, Bethesda, USA).

Además, se establecieron otras colaboraciones con los grupos de investigación del Dr. José M. Cuezva (Departamento de Biología Celular e Inmunología, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, España), del Dr. Antonio Pineda-Lucena (Unidad de Metabolómica, Centro de Investigación Principe Felipe-La Fe, Valencia, España) y del Dr. Agustín Lahoz (Grupo de Biomarcadores y Metabolómica, Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, Valencia España).

Agradezco a mi familia, mis amigos y mis compañeros la ayuda y el apoyo que, de una u otra forma, siempre me brindaron durante estos años dedicados a la ciencia. En especial al Dr. Josema Torres, por ser mi mentor en este largo y arduo camino; a los doctores Xavier Ponsoda, Asunción Molowny y Carlos López-García, por acogernos con los abrazos abiertos y compartir su experiencia conmigo; y a mi amiga e infatigable compañera de laboratorio Marian León, por soportarme todos los días con una sonrisa.

A mis padres,
Juan y Marian

A mi hermana,
Belén

A ti,
Gemma

En cuanto las personas descubran la fuente de alegría que es investigar y aprender una cosa no sabida, se darán cuenta de que hasta el orgasmo es una broma en comparación con la permanencia, la solidez y la seguridad que da la capacidad de aprender.

Antonio Escotado

Abreviaturas

Acc	carboxilasa del acetil-CoA (del inglés, <i>acetyl-CoA carboxylase</i>)	Atpif1	factor inhibidor 1 de la ATP sintasa (del inglés, <i>ATP synthase inhibitory factor 1</i>)
Acly	liasa de ATP-citrato (del inglés, <i>ATP citrate lyase</i>)	Bmp	proteína morfogenética del hueso (del inglés, <i>bone morphogenetic protein</i>)
ADP	adenosín difosfato (del inglés, <i>adenosine diphosphate</i>)	BrdU	5-bromo-2'-desoxiuridina
Afp	fetoproteína alpha (del inglés, <i>alpha-fetoprotein</i>)	BSA	albúmina de suero bovino (del inglés, <i>bovine serum albumin</i>)
AG	ácidos grasos	c-Myc	factor transcripcional celular homólogo al oncogén v-Myc de la mielocitomatosis viral aviar (del inglés, <i>v-Myc avian myelocytomatosis viral oncogen cellular homolog</i>)
Akt	quinasa homóloga al oncogén viral v-Akt del timoma murino (del inglés, <i>v-Akt murine thymoma viral oncogene homolog</i>)	CAC	ciclo del ácido cítrico (del inglés, <i>citric acid cycle</i>)
AMP	adenosín monofosfato	Camk1α	quinasa de proteínas I alpha dependiente de calcio/Calmodulina (del inglés, <i>calcium/Calmodulin-dependent protein kinase I alpha</i>)
Ampk	quinasa de proteínas activada por AMP (del inglés, <i>AMP-activated protein kinase</i>)	Cdk1	quinasa de proteínas 1 dependiente de ciclinas (del inglés, <i>cyclin-dependent kinase 1</i>)
Ampkα	subunidad alfa de la quinasa de proteínas activada por AMP (del inglés, <i>AMP-activated protein kinase subunitiy alpha</i>)	Cdk5	quinasa de proteínas 5 dependiente de ciclinas (del inglés, <i>cyclin-dependent kinase 5</i>)
AP	fosfatasa alcalina (del inglés, <i>alkaline phosphatase</i>)	Cebpα	proteína alfa de unión a cajas CCAAT (del inglés, <i>CCAAT/enhancer-binding protein alpha</i>)
Atg5	proteína 5 relacionada con autofagia (del inglés, <i>autophagic-related protein 5</i>)	Cebpβ	proteína beta de unión a cajas CCAAT (del inglés, <i>CCAAT/enhancer-binding protein beta</i>)
ATP	adenosín trifosfato (del inglés, <i>adenosine triphosphate</i>)		
Atp5b	proteína beta de la ATP sintasa mitocondrial (del inglés, <i>mitochondrial ATP synthase polypeptide beta</i>)		

Cer1	cerberus 1	DUSP	fosfatasa de especificidad dual (del inglés, <i>dual specificity phosphatases</i>)
CER	ceramidas	Dusp1	fosfatasa 1 de especificidad dual (del inglés, <i>dual specificity phosphatase 1</i>)
Cip1	proteína 1 de interacción con CDK (del inglés, <i>CDK-interacting protein 1</i>)	Dusp2	fosfatasa 2 de especificidad dual (del inglés, <i>dual specificity phosphatase 2</i>)
CL	cardiolipinas	Dusp5	fosfatasa 5 de especificidad dual (del inglés, <i>dual specificity phosphatase 5</i>)
Cox4	subunidad 4 de la oxidasa del citocromo (del inglés, <i>cytochrome oxidase subunit 4</i>)	Dusp6	fosfatasa 6 de especificidad dual (del inglés, <i>dual specificity phosphatase 6</i>)
CP	componente principal	Dusp7	fosfatasa 7 de especificidad dual (del inglés, <i>dual specificity phosphatase 7</i>)
CREB	elemento de unión regulado por AMP cíclico (del inglés, <i>cyclic AMP regulated element binding</i>)	EB	cuerpos embrioides (del inglés, <i>embryoid bodies</i>)
Crtc3	coactivador 3 de la transcripción regulada por CREB (del inglés, <i>CREB regulated transcription coactivator 3</i>)	Eno1	enolasa 1
CSC	células madre del cáncer (del inglés, <i>cancer stem cells</i>)	EpiSC	células madre del epiblasto (del inglés, <i>epiblast stem cells</i>)
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol (del inglés, <i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>)	ER	retículo endoplásmico (del inglés, <i>endoplasmic reticulum</i>)
DHEA	dehidroepiandrosterona	Erk1/2	quinasas de proteínas 1 y 2 reguladas por señalización extracelular (del inglés, <i>extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2</i>)
DMEM	medio Eagle modificado de Dulbecco (del inglés, <i>Dulbecco's Modified Eagle medium</i>)	Errα	receptor alfa relacionado con el estrógeno (del inglés, <i>estrogen-related receptor alpha</i>)
DNA	ácido desoxirribonucleico (del inglés, <i>deoxyribonucleic acid</i>)	ESC	células madre embrionarias (del inglés, <i>embryonic stem cells</i>)
Drp1	proteína 1 relacionada con la dinamina (del inglés, <i>dynammin-related protein 1</i>)		

esiRNA	siRNA preparados por endoribonucleasas (del inglés, <i>endoribonuclease-prepared siRNAs</i>)	GA3P	gliceraldehído-3-fosfato (del inglés, <i>glyceraldehyde-3-phosphate</i>)
Esrrb	receptor beta relacionado con el estrógeno (del inglés, <i>estrogen-related receptor beta</i>)	Gapdh	deshidrogenasa del gliceraldehído-3-fosfato (del inglés, <i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>)
FACS	separación de células activada por fluorescencia (del inglés, <i>fluorescent-activated cell sorting</i>)	Gata1	factor transcripcional 1 de unión a cajas GATA (del inglés, <i>GATA binding protein 1</i>)
Fasn	sintasa de ácidos grasos (del inglés, <i>fatty acid synthase</i>)	Gata6	factor transcripcional 6 de unión a cajas GATA (del inglés, <i>GATA binding protein 6</i>)
FC	citometría de flujo (del inglés, <i>flow cytometry</i>)	Gdap1	proteína 1 asociada a la diferenciación inducida por gangliósidos (del inglés, <i>ganglioside-induced differentiation associated protein 1</i>)
FDR	tasa de descubrimientos falsos (del inglés, <i>false discovery rate</i>)	GDP	guanosín difosfato (del inglés, <i>guanosine diphosphate</i>)
Fgf4	factor 4 de crecimiento de fibroblastos (del inglés, <i>fibroblast growth factor 4</i>)	GED	dominio efector de la GTPasa (del inglés, <i>GTPase effector domain</i>)
Fgfr2	receptor 2 del factor de crecimiento de fibroblastos (del inglés, <i>fibroblast growth factor receptor 2</i>)	Gfp	proteína fluorescente verde (del inglés, <i>green fluorescent protein</i>)
Fis1	proteína 1 de fisión mitocondrial	Gls	glutaminasa
FOC	incremento relativo (del inglés, <i>fold change</i>)	Glud	deshidrogenasa del glutamato (del inglés, <i>glutamate dehydrogenase</i>)
Foxa1	factor transcripcional a1 de caja de horquilla (del inglés, <i>forkhead box protein a1</i>)	Gp130	glucoproteína 130
G6P	glucosa-6-fosfato (del inglés, <i>glucose-6-phosphate</i>)	Gsc	proteína Goosecoid
G6pd	deshidrogenasa de la glucosa-6-fosfato (del inglés, <i>glucose-6-phosphate dehydrogenase</i>)	Gsk3	quinasa 3 de la sintasa del glucógeno (del inglés, <i>glycogen synthase kinase 3</i>)

Gsk3β	isoforma beta de la quinasa 3 de la sintasa del glucógeno (del inglés, <i>glycogen synthase kinase 3 isoform beta</i>)	kDa	kilodaltons
GTP	guanosín trifosfato (del inglés, <i>guanosine triphosphate</i>)	Kdr	receptor con dominio quinasa insertado (del inglés, <i>kinase insert domain receptor</i>)
GTPasa	trifosfatasa de guanosina (del inglés, <i>guanosine triphosphatase</i>)	Kip1	proteína inhibidora 1 de quinazas (del inglés, <i>kinase inhibitor protein 1</i>)
HEMA	2-hidroxietil metacrilato	Klf2	factor transcripcional 2 tipo Krüppel (del inglés, <i>Krüppel-like factor 2</i>)
Hadha	subunidad alfa de la deshidrogenasa del hidroxiacil-CoA (del inglés, <i>hydroxyacyl-CoA dehydrogenase subunit alpha</i>)	Klf4	factor transcripcional 4 tipo Krüppel (del inglés, <i>Krüppel-like factor 4</i>)
Hif1	factor 1 inducible por hipoxia (del inglés, <i>hypoxia inducible factor 1</i>)	Klf5	factor transcripcional 5 tipo Krüppel (del inglés, <i>Krüppel-like factor 5</i>)
Hk1	hexoquinasa 1	Lc3b	cadena ligera 3b de la proteína asociada a microtúbulos (del inglés, <i>microtubule associated protein light chain 3b</i>)
Hk2	hexoquinasa 2	LC-MS	cromatografía líquida-espectrometría de masas (del inglés, <i>liquid chromatography-mass spectrometry</i>)
hLIF	factor inhibidor de la leucemia humano (del inglés, <i>human leukemia inhibitory factor</i>)	LC-MS/MS	cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem (del inglés, <i>liquid chromatography-tandem mass spectrometry</i>)
ICM	masa celular interna (del inglés, <i>inner cell mass</i>)	Ldh	deshidrogenasa del lactato (del inglés, <i>lactate dehydrogenase</i>)
iDrp1	inhibidor de Drp1	Ldha	deshidrogenasa a del lactato (del inglés, <i>lactate dehydrogenase a</i>)
IF	inmunofluorescencia	Lif	factor inhibidor de la leucemia (del inglés, <i>leukemia inhibitory factor</i>)
iMek	inhibidor de Mek1/2	Lifr	receptor del factor inhibidor de la leucemia (del inglés, <i>leukemia inhibitory factor receptor</i>)
iPSC	células madre pluripotentes inducidas (del inglés, <i>induced pluripotent stem cells</i>)		
IRES	sitio interno de entrada del ribosoma (del inglés, <i>internal ribosomal entry site</i>)		
Jak	quinasa de proteínas Janus (del inglés, <i>Janus protein kinase</i>)		

LPC	lisofosfatidilcolinas (del inglés, <i>lysophosphatidylcholines</i>)	MMI	membrana mitocondrial interna
LPE	lisofosfatidiletanolaminas (del inglés, <i>lysophosphatidylethanolamines</i>)	mtDNA	DNA mitocondrial (del inglés, <i>mitochondrial DNA</i>)
MAPK	quinasas de proteínas activadas por mitógenos (del inglés, <i>mitogen-activated protein kinases</i>)	Myod1	proteína 1 de diferenciación miogénica (del inglés, <i>myogenic differentiation protein 1</i>)
MEF	fibroblastos embrionarios de ratón (del inglés, <i>mouse embryonic fibroblasts</i>)	N-Myc	factor transcripcional de neuroblastoma homólogo al oncogén v-Myc de la mielocitomatosis viral aviar (del inglés, <i>v-Myc avian myelocytomatosis viral oncogen neuroblastoma</i>)
Mek1/2	quinasas 1 y 2 de MAPK/Erk (del inglés, <i>Mapk/Erk kinases 1 and 2</i>)	NAD⁺	dinucleótido oxidado de nicotinamida y adenina (del inglés, <i>oxidized nicotinamide adenine dinucleotide</i>)
Meox1	factor transcripcional mesenquimal 1 de unión a homeobox (del inglés, <i>mesenchyme homeobox protein 1</i>)	NADH	dinucleótido reducido de nicotinamida y adenina (del inglés, <i>reduced nicotinamide adenine dinucleotide</i>)
MET	transición de mesénquima a epitelio (del inglés, <i>mesenchymal-to-epithelial transition</i>)	NADP⁺	dinucleótido fosfato oxidado de nicotinamida y adenina (del inglés, <i>oxidized nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>)
Mff	factor de fisión mitocondrial (del inglés, <i>mitochondrial fission factor</i>)	NADPH	dinucleótido fosfato reducido de nicotinamida y adenina (del inglés, <i>reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>)
Mfn1	mitofusina 1	Ndufs3	proteína 3 de hierro-azufre deshidrogenasa de NADH (del inglés, <i>NADH dehydrogenase iron-sulfur protein 3</i>)
Mfn2	mitofusina 2		
Mid49	proteína de dinámica mitocondrial de 49 kDa (del inglés, <i>mitochondrial dynamic protein of 49 kDa</i>)		
Mid51	proteína de dinámica mitocondrial de 51 kDa (del inglés, <i>mitochondrial dynamic protein of 51 kDa</i>)		
MME	membrana mitocondrial externa		

Nf-kb	factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (del inglés, <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>)	p53	proteína de tumores de 53 kDa (del inglés, <i>tumor protein of 53 kDa</i>)
Nrf1	factor respiratorio nuclear 1 (del inglés, <i>nuclear respiratory factor 1</i>)	PBS	tampón fosfato salino (del inglés, <i>phosphate buffered saline</i>)
Nrf2	factor respiratorio nuclear 2 (del inglés, <i>nuclear respiratory factor 2</i>)	PC	fosfatidilcolinas (del inglés, <i>phosphatidylcholines</i>)
Nurd	complejo desacetilasa y remodelador del nucleosoma (del inglés, <i>nucleosome remodeling and deacetylase complex</i>)	PCC	coeficiente de correlación de Pearson (del inglés, <i>Pearson's correlation coefficient</i>)
OCR	tasa de consumo de oxígeno (del inglés, <i>oxygen consumption rate</i>)	Pdh	deshidrogenasa del piruvato (del inglés, <i>pyruvate dehydrogenase</i>)
Oct4	factor transcripcional 4 de unión a octámeros (del inglés, <i>octamer-binding transcription factor 4</i>)	Pdhe1α	subunidad e1 alfa de la deshidrogenasa del piruvato (del inglés, <i>pyruvate dehydrogenase subunit e1 alpha</i>)
Opa1	proteína 1 de la atrofia óptica	Pdk	quinasa de la deshidrogenasa del piruvato (del inglés, <i>pyruvate dehydrogenase kinase</i>)
OSKM	cóctel de Yamanaka con los 4 factores de transcripción Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc	PE	fosfatidiletanolaminas (del inglés, <i>phosphatidylethanolamines</i>)
OSK	cóctel de Yamanaka con los 3 factores de transcripción Oct4, Sox2 y Klf4	PEI	polietilenimina
OXPHOS	fosforilación oxidativa (del inglés, <i>oxidative phosphorylation</i>)	Pfk	fosfofructoquinasa (del inglés, <i>phosphofructokinase</i>)
p21	proteína de tumores de 21 kDa (del inglés, <i>tumor protein of 21 kDa</i>)	PG	fosfatidilglicerol (del inglés, <i>phosphatidylglycerols</i>)
p27	proteína de tumores de 27 kDa (del inglés, <i>tumor protein of 27 kDa</i>)	PGC	células primordiales germinales (del inglés, <i>primordial germ cells</i>)

Pgc1α	coactivador 1 alfa del receptor gamma peroxisomal activado por proliferación (del inglés, <i>peroxisome proliferative activated-receptor gamma coactivator 1 alpha</i>)	qPCR	reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa o a tiempo real (del inglés, <i>quantitative polymerase chain reaction</i>)
Pir	piruvato	R5P	ribosa-5-fosfato (del inglés, <i>ribose-5-phosphate</i>)
Pi3k	quinasa del fosfatidilinositol-3 (del inglés, <i>phosphoinositide-3 kinase</i>)	Raf	quinasa homóloga al oncogén viral v-Raf de la leucemia murina (del inglés, <i>v-Raf murine leukemia viral oncogene homolog</i>)
Pk	quinasa del piruvato (del inglés, <i>pyruvate kinase</i>)	RalA	proteína A unida a GTP relacionada con Ras (del inglés, <i>Ras related GTP binding protein A</i>)
Pka	quinasa de proteínas A (del inglés, <i>protein kinase A</i>)	Ralbp1	proteína 1 de unión a RalA (del inglés, <i>RalA binding protein 1</i>)
Pkcδ	quinasa de proteínas C delta (del inglés, <i>protein kinase C delta</i>)	Ras	proteína homóloga al oncogén del sarcoma viral de rata (del inglés, <i>rat sarcoma viral oncogen homolog</i>)
Pkm1/2	quinasas 1 y 2 del piruvato del músculo (del inglés, <i>pyruvate kinases of muscle 1 and 2</i>)	Rex1	proteína 1 de expresión reducida (del inglés, <i>reduced expression protein 1</i>)
Pkm2	quinasa 2 del piruvato del músculo (del inglés, <i>pyruvate kinase of muscle 2</i>)	RMN	resonancia magnética nuclear
PMA	chip de proteínas (del inglés, <i>protein microarray</i>)	RNA	ácido ribonucleico (del inglés, <i>ribonucleic acid</i>)
Pou5f1	factor transcripcional 1 de dominio POU clase 5 (del inglés, <i>POU domain class 5 transcription factor 1</i>)	Rock1	quinasa de proteínas I asociada a Rho (del inglés, <i>Rho-associated protein kinase I</i>)
PPP	ruta de las pentosas fosfato (del inglés, <i>pentose phosphate pathway</i>)	ROS	especies reactivas del oxígeno (del inglés, <i>reactive oxygen species</i>)
Pten	proteína homóloga a fosfatasa y tensina (del inglés, <i>phosphatase and tensin homolog</i>)	Sall4	factor transcripcional 4 tipo Spalt (del inglés, <i>Spalt-like transcription factor 4</i>)

SCNT	transferencia nuclear de células somáticas (del inglés, <i>somatic cell nuclear transfer</i>)	SSC	dispersión lateral (del inglés, <i>side scatter</i>)
Sdha	subunidad a del complejo deshidrogenasa del succinato (del inglés, <i>succinate dehydrogenase complex subunit a</i>)	SSEA1	antígeno 1 específico de la etapa embrionaria (del inglés, <i>stage-specific embryonic antigen 1</i>)
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (del inglés, <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)	Stat3	transductor de señal y activador de transcripción 3 (del inglés, <i>signal transducer and activator of transcription 3</i>)
SEM	error estándar de la media (del inglés, <i>standard error of the mean</i>)	TBST	tampón salino Tris con Tween-20 (del inglés, <i>Tris-buffered saline with Tween-20</i>)
shRNA	RNA de horquillas cortas (del inglés, <i>short hairpin RNA</i>)	Tbx3	factor transcripcional 3 de caja T (del inglés, <i>T-box transcription factor 3</i>)
siRNA	RNA pequeños de interferencia (del inglés, <i>small interfering RNAs</i>)	Tcf3	factor transcripcional 3 (del inglés, <i>transcription factor 3</i>)
SM	esfingomielinas (del inglés, <i>sphingomyelins</i>)	TEM	microscopía electrónica de transmisión (del inglés, <i>transmission electron microscopy</i>)
Sma	actina del músculo liso (del inglés, <i>smooth muscle actin</i>)	Thy1	antígeno 1 de timocitos (del inglés, <i>thymocytes antigen 1</i>)
Sox1	factor transcripcional 1 de unión a cajas SRY (del inglés, <i>SRY-box protein 1</i>)	Tom20	translocasa de membrana externa de 20 kDa (del inglés, <i>translocase of outer membrane of 20 kDa</i>)
Sox2	factor transcripcional 2 de unión a cajas SRY (del inglés, <i>SRY-box protein 2</i>)	Tom40	translocasa de membrana externa de 40 kDa (del inglés, <i>translocase of outer membrane of 40 kDa</i>)
Sox3	factor transcripcional 3 de unión a cajas SRY (del inglés, <i>SRY-box protein 3</i>)	Ucp2	<i>proteína desacoplante 2</i> (del inglés, <i>uncoupling protein 2</i>)
SRY	región Y de determinación del sexo (del inglés, <i>sex determining region Y</i>)	Uqcrc2	proteína 2 del núcleo de la reductasa ubiquitinol-citocromo c (del inglés, <i>ubiquinol-cytochrome c reductase core protein 2</i>)

- Waf1** fragmento 1 activado por p53 silvestre (del inglés, *wild-type p53-activated fragment 1*)
- WB** inmunodetección de proteínas (del inglés, *western blotting*)
- WT** tipo silvestre (del inglés, *wild type*)
- Zic1** factor transcripcional 1 de dedos de zinc (del inglés, *zinc-finger protein 1*)

Índice

<i>ABSTRACT</i> _____	1
INTRODUCCIÓN _____	5
1. Pluripotencia celular _____	7
1.1. Concepto de célula madre _____	7
1.2. Células madre embrionarias _____	8
1.3. Rutas de señalización en el mantenimiento de la pluripotencia _____	9
1.4. Estados de pluripotencia en ESC _____	12
1.5. Control transcripcional de la pluripotencia _____	14
2. Reprogramación celular _____	18
2.1. Reinterpretación del paisaje de Waddington _____	18
2.2. Factores de transcripción y pluripotencia inducida _____	21
2.3. El proceso de reprogramación celular _____	22
2.4. Función de los factores transcripcionales durante la reprogramación celular _____	25
3. Dinámica mitocondrial _____	29
3.1. La mitocondria y su dinámica _____	29
3.2. La maquinaria de la dinámica mitocondrial _____	30
3.3. Regulación de las proteínas de dinámica mitocondrial _____	33
3.4. Dinámica mitocondrial en células pluripotentes _____	35
4. Pluripotencia celular y metabolismo _____	37
4.1. Metabolismo durante el desarrollo embrionario _____	37
4.2. Metabolismo en células proliferativas: ESC y CSC _____	39
4.3. Reprogramación metabólica: de la OXPHOS a la glucólisis _____	45
OBJETIVOS _____	47

MATERIAL Y MÉTODOS _____	51
1. Cultivo celular _____	53
1.1. Cultivo primario de fibroblastos embrionarios de ratón _____	53
1.2. Líneas celulares _____	54
2. Plásmidos y esiRNA _____	55
3. Ensayos <i>in vitro</i> _____	56
3.1. Transducción con retrovirus _____	56
3.2. Ensayos de reprogramación celular _____	57
3.3. Transfección con esiRNA _____	58
3.4. Transfección de ESC _____	58
3.5. Ensayo de diferenciación hacia las tres capas germinales por “gota colgante” _____	59
3.6. Ensayo de actividad deshidrogenasa de la glucosa-6-fosfato _____	59
4. Análisis celular por microscopía _____	60
4.1. Inmunofluorescencia _____	60
4.2. Tinción de fosfatasa alcalina _____	61
4.3. Análisis por microscopía confocal _____	61
4.4. Análisis por microscopía electrónica de transmisión _____	62
4.5. Análisis de alto rendimiento por microscopía IN Cell Analyzer _____	62
5. Análisis celular por citometría de flujo _____	63
5.1. Análisis de masa mitocondrial _____	63
5.2. Análisis de gotas lipídicas _____	63
5.3. Separación de células basada en la expresión de Thy1 _____	64
6. Análisis de proteínas _____	64
6.1. Lisis celular _____	64
6.2. Fraccionamiento subcelular _____	65
6.3. Electroforesis SDS-PAGE y transferencia de proteínas _____	65
6.4. Inmunodetección de proteínas _____	66
6.5. Inmunoprecipitación _____	67
6.6. Cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem o LC-MS/MS _____	67
6.7. Buscador ProteinPilot v5.0 (ABSciex) _____	68

6.8. Impresión y procesamiento de chips de proteína en fase reversa _____	68
7. Análisis de expresión génica _____	69
7.1. Extracción de RNA _____	69
7.2. Síntesis de cDNA _____	70
7.3. Análisis por qPCR _____	70
8. Análisis metabólicos _____	70
8.1. Respirimetría _____	70
8.2. Análisis metabólico por resonancia magnética nuclear o RMN _	71
8.3. Análisis lipidómico por cromatografía líquida-espectrometría de masas o LC-MS _____	72
9. Análisis estadístico de los datos _____	74
Tabla 1 – Anticuerpos primarios utilizados _____	75
Tabla 2 – Anticuerpos secundarios utilizados _____	77
Tabla 3 – Sondas Taqman utilizadas _____	78
Tabla 4 – Secuencias de los cebadores utilizados _____	79
RESULTADOS _____	81
Capítulo 1 – La fisión mitocondrial es una barrera temprana de la reprogramación celular _____	83
1.1. La reprogramación celular induce fisión mitocondrial _____	85
1.2. Los intermediarios de la reprogramación celular contienen mitocondrias fragmentadas _____	88
1.3. La reducción mitocondrial inducida por OSKM no está asociada a mitofagia dependiente de Lc3b _____	90
1.4. La fisión mitocondrial inducida por OSKM es dependiente de Drp1 _____	93
Capítulo 2 – El eje Dusp6-Erk1/2-Drp1 controla la fisión mitocondrial durante la fase estocástica de la reprogramación celular _____	99
2.1. La expresión de <i>OSKM</i> induce la fosforilación en la Ser579 de Drp1 _____	101
2.2. La fragmentación mitocondrial inducida por OSKM es	

dependiente de la señalización a través de Erk1/2 _____	104
2.3. La fosforilación de Drp1-S579 por Erk1/2 es dependiente del silenciamiento de <i>Dusp6</i> _____	106
 Capítulo 3 – La fisión mitocondrial asociada a la reprogramación celular es dependiente de c-Myc _____	109
3.1. La fisión mitocondrial inducida por la reprogramación celular es dependiente de c-Myc _____	111
3.2. La fosforilación de Drp1-S579 inducida por OSKM es dependiente de Cdk1 _____	114
 Capítulo 4 – El cambio metabólico asociado a la reprogramación celular ocurre simultáneamente a la fisión mitocondrial y es dependiente de c-Myc _	119
4.1. El remodelado metabólico durante la fase estocástica de la reprogramación celular es dependiente de c-Myc _____	121
4.2. La maquinaria enzimática de la glucólisis y la OXPHOS es inducida por c-Myc _____	125
4.3. La inhibición de la OXPHOS durante la fase estocástica de la reprogramación celular es dependiente de c-Myc _____	128
4.4. La activación del anabolismo durante la fase estocástica de la reprogramación celular es dependiente de c-Myc _____	131
4.5. La reprogramación celular induce un cambio en el contenido lipídico celular dependiente de c-Myc _____	135
 Anexo resultados – Caracterización molecular y funcional de la línea de iPSC utilizada como control _____	141
 DISCUSIÓN _____	145
 CONCLUSIONES _____	161
 BIBLIOGRAFÍA _____	167
 ANEXO _____	203

Abstract

Cell reprogramming is a cellular restructuring process of somatic cell fate into a pluripotent state similar to that of embryonic stem cells. Given the significant differences between both states, this transformation is associated with a profound reorganization of the cellular phenotype at all levels. To do this, somatic cells must overcome many cellular and molecular barriers along the process. Both cellular states show differences in the mitochondrial morphology and cell metabolism: somatic cells have to modify their mitochondrial network, from a tubular to a fragmented morphology, and reconvert their metabolism, from an oxidative to a glycolytic state. This doctoral dissertation reveals that the mitochondrial and metabolic reorganization is an early barrier that cells must overcome to reach the pluripotent state. It is shown that cell reprogramming-induced mitochondrial fission is dependent on an early Drp1-S579 phosphorylation by Erk1/2 and Cdk1 kinases in a c-Myc-dependent manner. Simultaneously, Erk1/2 activation is dependent on downregulation of *Dusp6* by expression of *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* and *c-Myc*. Data shown here suggest that c-Myc orchestrate the metabolic change during this cellular reconversion. Thus, c-Myc promotes aerobic glycolysis by inducing the expression of glycolytic enzymes and inhibiting oxidative phosphorylation by upregulation of *Atpif1*. In parallel, c-Myc also activates both pentose phosphate pathway and *de novo* fatty acid biosynthesis, two anabolic pathways that support the macromolecular synthesis necessary for cell proliferation. During this metabolic switch, a remodeling of lipid content takes place in a c-Myc-dependent manner. Overall, these data suggest significant similarities between the stochastic phase of cell reprogramming and the early events that lead to tumor development.

Introducción

1. Pluripotencia celular

1.1. Concepto de célula madre

Las células madre son un tipo particular de células capaces de autorrenovarse y diferenciarse. La autorrenovación es la capacidad de dar lugar a copias exactas de sí mismas; pudiendo ser de dos tipos: simétrica, donde la división celular genera dos células hijas con propiedades idénticas a las de su progenitora, o asimétrica, donde una división desigual genera una copia idéntica a la progenitora y otra comprometida con su diferenciación. La diferenciación es el proceso de cambio en el fenotipo celular como consecuencia de la activación de un patrón de expresión génica específico que finaliza con la adquisición de una funcionalidad celular concreta (Morrison et al., 1997; Potten and Loeffler, 1990).

Las células madre pueden ser clasificadas según su capacidad de diferenciarse en uno o varios tipos de celulares. Así, sólo el cigoto y los blastómeros generados en las dos primeras divisiones del desarrollo poseen la capacidad de generar un individuo completo: tejidos embrionarios y extraembrionarios. Son totipotentes (Kelly, 1977). Los blastómeros generan dos tipos celulares distintos: el trofoblasto y la masa celular interna o ICM (del inglés, *inner cell mass*). Ambos conforman el blastocisto. El trofoblasto permite la implantación del embrión en el endometrio materno y genera los tejidos extraembrionarios (placenta). La ICM genera dos nuevas estructuras: el hipoblasto, un segundo linaje extraembrionario que da lugar al saco vitelino, y el epiblasto pluripotente, que genera todos los tejidos embrionarios de las tres capas germinales: ectodermo, mesodermo y endodermo (Gardner, 1998; Gardner and Beddington, 1988; Kaji et al., 2007; Odorico et al., 2001). A partir del epiblasto se derivan las células madres embrionarias o ESC (del inglés, *embryonic stem cells*). Tras la implantación del blastocisto, las células van perdiendo gradualmente su pluripotencialidad y se van diferenciando hasta alcanzar el estado somático funcional de los tejidos especializados o formar las gonadas. Inmediatamente después de la implantación, todavía se pueden obtener del embrión las denominadas células madre del epiblasto o EpiSC (del inglés, *epiblast stem cell*). Las EpiSC son células madre similares a las ESC que han perdido cierta pluripotencia y no participan en la generación de todos los tejidos cuando se utilizan en ensayos de quimerismo en ratones (Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007). Las células madre también se encuentran en los tejidos adultos del organismo; son las denominadas células madre adultas. Este tipo de células madre sólo son capaces de generar un reducido número de tipos celulares específicos de su linaje celular para regenerar y renovar permanentemente los tejidos. Son multipotentes o unipotentes dependiendo de su

capacidad de diferenciación (Alison and Islam, 2009). Las condiciones ambientales o nichos en estos tejidos son muy importantes para garantizar la autorrenovación de las células madre adultas y, por tanto, la homeostasis tisular. Tras la diferenciación terminal, las células han perdido todo su potencial de desarrollo (Fig. 1).

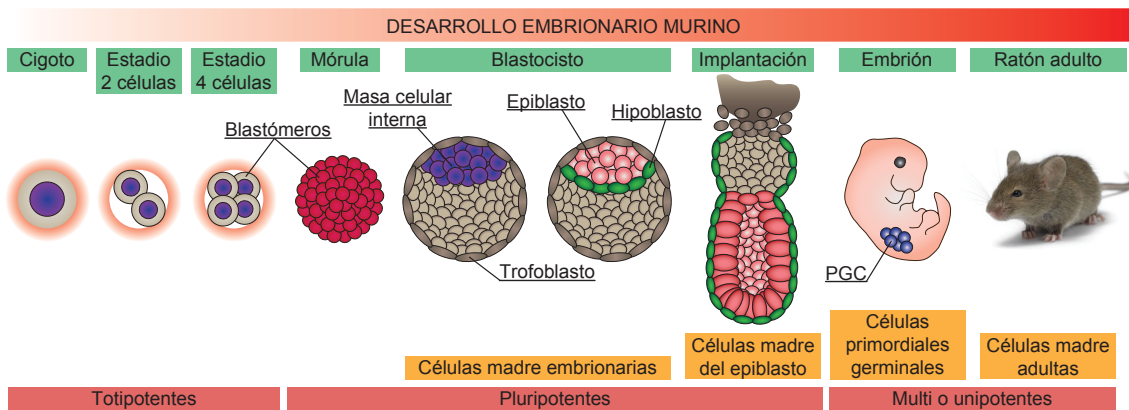


Figura 1. Células madre y su potencialidad a lo largo del desarrollo embrionario. Representación gráfica de los distintos estadios del desarrollo embrionario del ratón. Sólo el cigoto y los blastómeros generados en las dos primeras divisiones del desarrollo poseen la capacidad de generar un individuo completo: tejidos embrionarios y extraembrionarios. Son totipotentes. Los blastómeros generan dos tipos celulares distintos: el trofoblasto y la masa celular interna. La ICM genera dos nuevas estructuras: el hipoblasto, un segundo linaje extraembrionario que genera el saco vitelino, y el epiblasto pluripotente, que genera los tejidos embrionarios de las tres capas germinales. A partir del epiblasto se derivan las células madres embrionarias. Tras la implantación, se pueden obtener las células madre del epiblasto, células madre que ya han perdido cierta pluripotencia. El embrión contiene células primordiales germinales o PGC que pueden transformarse en células madre pluripotentes, denominadas células embrionales germinales. Las células madre adultas se encuentran en los tejidos adultos del organismo.

1.2. Células madre embrionarias

El desarrollo de las células madre embrionarias surge a raíz del estudio de unas particulares estructuras tumorales denominadas teratocarcinomas. El teratocarcinoma es un tumor de origen germinal que contiene en su interior regiones celulares completamente diferenciadas, pero también células indiferenciadas. Estas células, que tienen la capacidad de autorrenovarse y de propagar este tipo de tumores, se denominan células de carcinoma embrionario (Kleinsmith and Pierce, 1964; Stevens and Little, 1954). Este tipo de células exhiben una morfología similar a la de las células presentes en la ICM, pueden ser expandidas como líneas celulares y muestran una elevada flexibilidad para producir tejidos de todos los linajes somáticos (Finch and Ephrussi, 1967; Kahan and Ephrussi, 1970; Stevens, 1968). Martin Evans y Gail Martin establecieron las condiciones de cultivo adecuadas para controlar y preservar la

pluripotencia de este tipo particular de células (Martin, 1975; Martin and Evans, 1975), sin embargo, la pluripotencia de estas células nunca llegó a ser completa debido a las aneuploidías cromosómicas que suelen presentar (Bradley et al., 1984; Brinster, 1974; Martin, 1980). El estudio del comportamiento de estas células en cultivo permitió a Evans y Martin derivar por primera vez células madre embrionarias en 1981 (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981). Diez años más tarde, se demostró que, en condiciones de cultivo específicas, las células primordiales germinales o PGC (del inglés, *primordial germ cells*) del embrión de ratón pueden transformarse en células madre pluripotentes, denominadas células embrionales germinales, indistinguibles de las células madre embrionarias (Matsui et al., 1992; Resnick et al., 1992) (Fig. 1).

Las ESC son el tipo de célula madre con mayor pluripotencia que se haya podido cultivar *in vitro* de forma indefinida sin perder sus atributos funcionales: son las únicas capaces de producir embriones durante la complementación tetraploide (Eggan et al., 2001; Nagy et al., 1990). La complementación tetraploide consiste en la inyección de ESC en un blastocisto cuyas células de la ICM se han manipulado para ser tetraploides. Esto se consigue mediante la fusión de los blastómeros en el estadio de desarrollo de dos células. Este tipo de células tetraploides no son capaces de formar tejidos embrionarios, pero sí extraembrionarios. Tras la inyección de las nuevas ESC sobre la ICM tetraploide, todos los tejidos del embrión en desarrollo se generarán exclusivamente a partir de estas nuevas células, siempre y cuando posean el suficiente potencial de desarrollo.

El carácter pluripotente de las células madre embrionarias o ESC hace de éstas una herramienta formidable para: 1) el estudio del desarrollo embrionario (Spagnoli and Hemmati-Brivanlou, 2006), 2) la generación de animales modificados genéticamente (Robertson et al., 1986; Thompson et al., 1989), 3) el establecimiento de modelos *in vitro* de enfermedades de origen genético (Di Giorgio et al., 2007) y 4) el abordaje de nuevas terapias de regeneración en el campo de la biomedicina (Keller, 2005).

1.3. Rutas de señalización en el mantenimiento de la pluripotencia

Las células madre embrionarias necesitan unas condiciones tróficas determinadas para mantener su pluripotencia: contactos célula-célula y factores tróficos que inhiben la diferenciación (Martin and Evans, 1975; Smith and Hooper, 1987). El factor inhibidor de la leucemia o Lif (del inglés, *leukemia inhibitory factor*) es el principal factor que garantiza la autorrenovación de las ESC murinas en cultivo

(Smith et al., 1988; Williams et al., 1988). Lif se une a su receptor heterodimérico formado por el receptor de Lif o Lifr (del inglés, *leukemia inhibitory factor receptor*) y la glucoproteína 130 o Gp130, y transmite la señal a través de las quinasas de proteínas Janus o Jak (del inglés, *Janus protein kinases*). Las quinasas Jak activan tres rutas de señalización diferentes: la ruta Jak/Stat3, la ruta Pi3k/Akt y la ruta MAPK/Erk1/2. (Ohtsuka et al., 2015) (Fig. 2).

El transductor de señal y activador de la transcripción 3 o Stat3 (del inglés, *signal transducer and activator of transcription 3*) es el principal efector de la autorrenovación dependiente de Lif (Boeuf et al., 1997; Matsuda et al., 1999; Niwa et al., 1998). La señalización por Lif induce el reclutamiento de Stat3 hacia el receptor y su activación mediante fosforilación directa de Jak. Stat3 fosforilado dimeriza, y los homodímeros son transportados al núcleo para activar el programa transcripcional que mantiene la pluripotencia (Ohtsuka et al., 2015) (Fig. 2).

La señalización a través de la quinasa del fosfatidilinositol-3 o Pi3k (del inglés, *phosphoinositide-3 kinase*) y su efector, la quinasa homóloga al oncogén viral v-Akt del timoma murino o Akt (del inglés, *v-Akt murine thymoma viral oncogene homolog*), es necesaria para la activación del ciclo celular en ESC y la expresión de factores de transcripción, como Nanog (Niwa et al., 2009). El supresor de tumores homólogo a fosfatasa y tensina o Pten (del inglés, *phosphatase and tensin homolog*) es un antagonista de la actividad Pi3k. Así, en ausencia de Pten, las ESC presentan una mayor viabilidad y tasa de proliferación (Ohtsuka et al., 2015) (Fig. 2).

La señalización a través de las quinasas de proteínas 1 y 2 reguladas por señalización extracelular o Erk1/2 (del inglés, *extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2*), sin embargo, no es necesaria para la autorrenovación de las ESC murinas. Más al contrario, su activación es el principal antagonista de la autorrenovación de estas células (Burdon et al., 1999; Kunath et al., 2007; Tee et al., 2014). En ausencia de señales externas que induzcan diferenciación, existe un programa paracrino autónomo de diferenciación en ESC a través de la señalización por el factor 4 de crecimiento de fibroblastos o Fgf4 (del inglés, *fibroblast growth factor 4*). Las ESC producen cantidades apreciables de Fgf4 y, a diferencia de las células del epiblasto, expresan su correspondiente receptor (Guo et al., 2010), el receptor 2 del factor de crecimiento de fibroblastos o Fgfr2 (del inglés, *fibroblast growth factor receptor 2*). Fgf4 es el mayor activador de la ruta Erk1/2 en ESC. Erk1/2 pertenecen a la familia de las quinasas de proteínas activadas por mitógenos o MAPK (del inglés, *mitogen-activated protein kinases*). Las MAPK son quinasas de residuos de serina y/o treonina que participan en una gran variedad de procesos celulares, como

proliferación, diferenciación celular, supervivencia, etc. La activación de la ruta de MAPK depende del balance entre su fosforilación por quinasas activadoras y su desfosforilación por fosfatasas de proteínas. La familia de las fosfatasas de proteínas de especificidad dual o DUSP (del inglés, *dual specificity phosphatases*) es una de las más importantes en el control de Erk1/2 (Caunt and Keyse, 2013; Nunes-Xavier et al., 2013). Erk1/2 hace efectiva la señal extracelular mediante la fosforilación de diferentes sustratos, incluyendo factores de transcripción, quinasas de proteínas y fosfatasas de proteínas, entre otros factores (Roskoski, 2012). La activación de esta cascada induce el compromiso celular de las ESC con su diferenciación. Durante el desarrollo embrionario, esta ruta es crucial para la formación del epiblasto e hipoblasto a partir de la ICM. Dado que la señalización por Lif también puede activar esta ruta (Ohtsuka et al., 2015), inhibidores específicos de las quinasas 1 y 2 de MAPK/Erk o Mek1/2 (del inglés, *MAPK/Erk kinases 1 and 2*) habilitan una aproximación química y controlada del cultivo *in vitro* de las ESC. El uso de este tipo de inhibidores en combinación con Lif permite un mantenimiento robusto de la autorrenovación de las ESC murinas (Ying et al., 2008) (Fig. 2).

La quinasa 3 de la sintasa del glucógeno o Gsk3 (del inglés, *glycogen synthase kinase 3*), es otro antagonista de la autorrenovación de las ESC (Anton et al., 2007; Doble et al., 2007; Li et al., 2012b; Sato et al., 2004). La señalización por Lif parece favorecer su inhibición a través de Akt (Paling et al., 2004). La Gsk3 es un regulador negativo de la ruta Wnt/Catenina β (Clevers, 2006): Gsk3 fosforila a Catenina β , siendo ésta degradada por el proteasoma. La inhibición de Gsk3 hace que Catenina β se acumule en el núcleo de las ESC secuestrando al factor transcripcional 3 o Tcf3 (del inglés, *transcription factor 3*). Tcf3 reprime un número importante de genes clave para el mantenimiento de la pluripotencia (Wray et al., 2011). Gsk3 también regula negativamente al factor transcripcional celular homólogo al oncogén v-Myc de la mielocitomatosis viral aviar o c-Myc (del inglés, *v-Myc avian myelocytomatosis viral oncogen cellular homolog*) (Cartwright et al., 2005), que participa en la autorrenovación y proliferación de las ESC (ver más adelante). De forma similar a la inhibición de Mek1/2, la inhibición química de Gsk3 en presencia de Lif favorece la autorrenovación de las ESC murinas (Fig. 2).

Sin embargo, la señalización por Lif no es suficiente. En ausencia de suero, las ESC continúan proliferando pero pierden sus características de células madre, diferenciándose finalmente a precursores neurales (Ying et al., 2003b). Las proteínas morfogenéticas del hueso o BMP (del inglés, *bone morphogenetic protein*) es un potente antagonista de la especificación neural y puede sustituir el efecto del suero y

favorecer la autorrenovación en presencia de Lif (Morikawa et al., 2016; Ying et al., 2003a). Sin embargo, dado que la señalización por Bmp participa en procesos de diferenciación no neuronales (Torres et al., 2012; Wiles and Johansson, 1999), su utilización en el mantenimiento rutinario de la autorrenovación de las ESC ha sido descartado. Así, ambos, Lif y el suero, actúan como antagonistas de la diferenciación, garantizando la autorrenovación de las ESC murinas en cultivo.

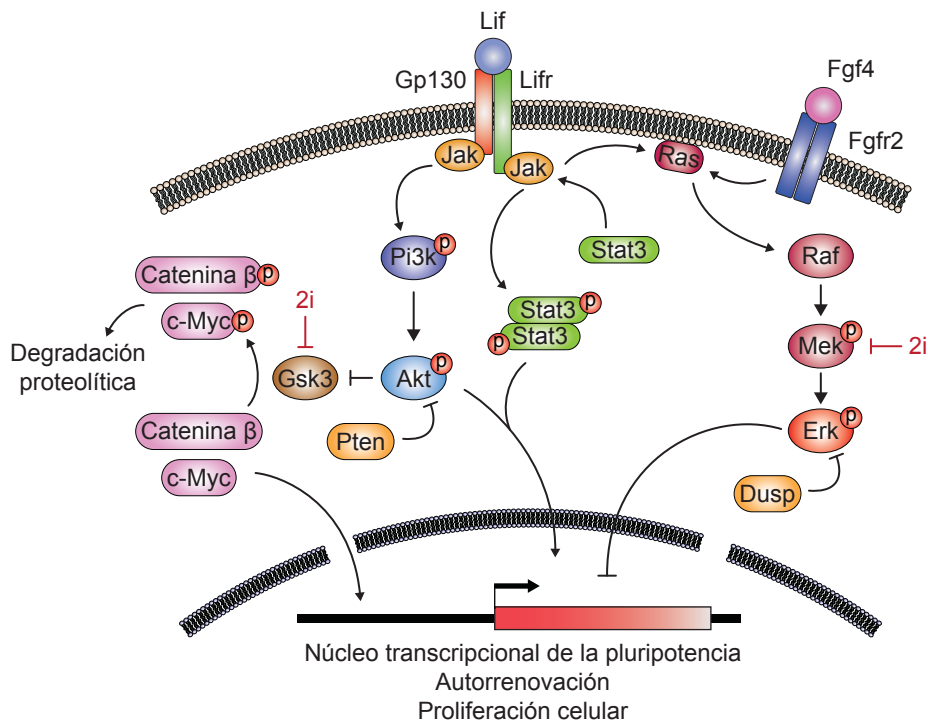


Figura 2. Rutas de señalización en el mantenimiento de la pluripotencia. El factor inhibidor de la leucemia o Lif activa las rutas Jak/Stat3, Pi3k/Akt y MAPK/Erk1/2. Stat3 y Akt participan en el mantenimiento de la autorrenovación y la proliferación celular de las ESC. La activación de la ruta Erk1/2 a través de Fgf4 es el principal antagonista de la autorrenovación de las ESC, comprometiendo a la célula hacia la diferenciación. La inhibición química de Mek1/2 y Gsk3 (2i) en presencia de Lif favorece la autorrenovación de las ESC. Raf, quinasa homóloga al oncogén viral v-Raf de la leucemia murina (del inglés, *v-Raf murine leukemia viral oncogene homolog*); Ras, proteína homóloga al oncogén viral del sarcoma de rata (del inglés, *rat sarcoma viral oncogene homolog*).

1.4. Estados de pluripotencia en ESC

La función de las células madre en el organismo adulto es mantener la homeostasis tisular en condiciones normales o patológicas mediante los procesos de autorrenovación y diferenciación. Sin embargo, debido a que el desarrollo embrionario es un proceso dinámico y la ICM una población transitoria, se desconoce si existe un significado fisiológico al proceso de autorrenovación observado en las ESC en cultivo.

De hecho, la existencia de un equivalente de las ESC en la ICM todavía es controvertida (Martello and Smith, 2014).

La combinación de los inhibidores de Mek1/2 y Gsk3 (2i) con Lif permite un mantenimiento sencillo y controlado de las ESC *in vitro* (Ying et al., 2008). Este sistema ha permitido generar genuinas ESC de estirpes de ratón y primates no humanos que antes eran refractarias a su derivación (Buehr et al., 2008; Izpisua Belmonte et al., 2015; Li et al., 2008; Nichols et al., 2009a). Las ESC cultivadas con Lif y los factores tróficos del suero se caracterizan por ser una población celular heterogénea en ciclos constantes de renovación y diferenciación (Ying et al., 2008). El cultivo de las ESC en 2i más Lif genera una población celular homogénea e indiferenciada. Se trata de una captura *in vitro* del estado pluripotente del epiblasto embrionario antes de la implantación (Fig. 3), denominado estado naíf de pluripotencia (Silva and Smith, 2008; Ying et al., 2008).

El estado naíf presenta importantes diferencias con la situación anterior, denominado estado condicionado¹: 1) molecularmente, las células del estado naíf presentan más similitudes a las células del epiblasto temprano de la ICM (Nichols et al., 2009b; Nichols and Smith, 2009), mientras que las células del estado condicionado se asemejan a las células del epiblasto post-implantación (EpiSC) (Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007); 2) la dinámica mitocondrial y el metabolismo en ambos estados es diferente (Zhou et al., 2012); 3) la red transcripcional que controla la pluripotencia es similar en cuanto a los factores participantes, pero diferente en cuanto a las relaciones entre ellos (Dunn et al., 2014; Silva et al., 2009); y 4) el patrón epigenético en ambos estados es completamente distinto (Marks et al., 2012). En resumen, frente al estado naíf, el estado condicionado es un estado metaestable comprometido con la diferenciación, disponiendo y preparando toda su maquinaria celular hacia el destino celular subsiguiente. Este compromiso celular se adquiere desde el estado naíf (epiblasto pluripotente) a través de la señalización por Fgf/Erk, de ahí que su bloqueo con 2i permita capturar a las ESC en dicho estado de pluripotencia. Una vez se alcanza el estado condicionado, la señalización por Fgf/Erk se vuelve crucial en el mantenimiento de la pluripotencia de estas células (Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007) (Fig. 3).

¹ Esta distinción entre ambos estados ha venido aplicándose al campo de las ESC murinas. Las ESC humanas obtenidas presentan mayores similitudes a las EpiSC (Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007), aunque se les sigue denominando ESC. Recientemente, se han publicado diversos trabajos en los que se describen nuevos sistemas para adquirir la pluripotencia naíf en ESC humanas (Gafni et al., 2013; Guo et al., 2016; Ware et al., 2014).

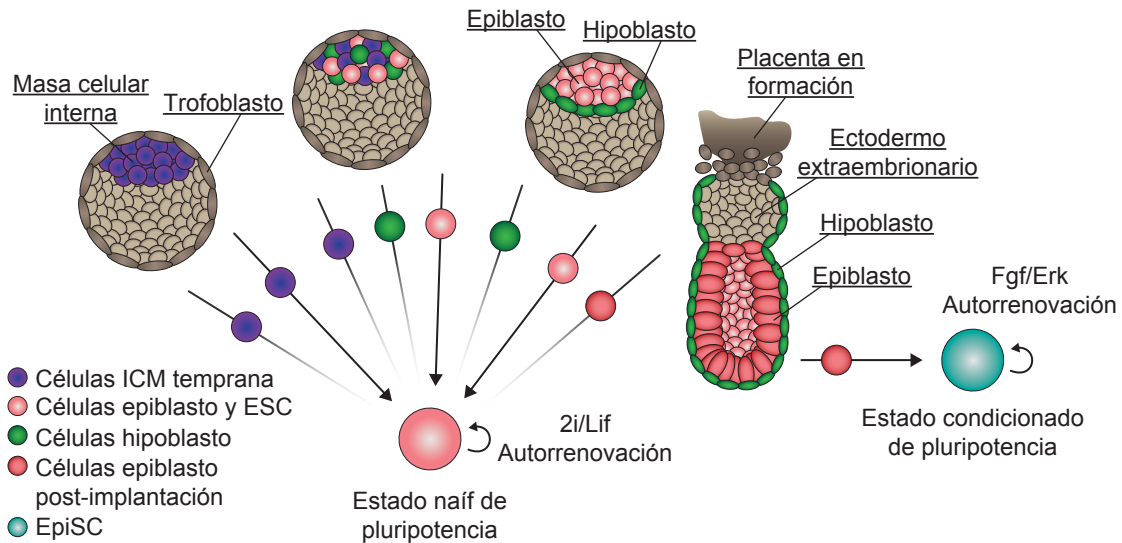


Figura 3. Estados naíf y condicionado de pluripotencia celular. Las células en el estado naíf presentan importantes diferencias con las células en el estado condicionado. Las células del estado naíf presentan más similitudes a las células del epiblasto temprano de la ICM, mientras que las células del estado condicionado se asemejan a las células del epiblasto post-implantación (EpiSC). Este compromiso se adquiere desde el estado naíf a través de la señalización por Fgf/Erk. Su bloqueo *in vitro* permite capturar a las ESC en dicho estado de pluripotencia. La señalización por Fgf/Erk pasa a ser crucial para mantener la pluripotencia de las células en el estado condicionado. Las flechas indican la capacidad o no para derivar células en los estados de pluripotencia naíf y/o condicionado. Adaptado de Plusa and Hadjantonakis, 2014.

1.5. Control transcripcional de la pluripotencia

Históricamente, los factores transcripcionales implicados en el mantenimiento de la pluripotencia se han identificado por su expresión específica en ESC o en embriones tempranos (Mitsui et al., 2003; Okamoto et al., 1990; Scholer et al., 1990), o a través de cribados genéticos (Chambers et al., 2003; Ivanova et al., 2006).

El factor transcripcional 4 de unión a octámeros u Oct4 (del inglés, *octamer-binding transcription factor 4*), también conocido como Pou5f1 (del inglés, *POU domain class 5 transcription factor 1*) fue el primer factor identificado y caracterizado como regulador de la pluripotencia (Okamoto et al., 1990; Scholer et al., 1990). Oct4 se expresa en el oocito y la ICM, tanto en el epiblasto como en el hipoblasto temprano, extendiendo su expresión después de la implantación (Nichols et al., 2009b). Durante el estado postnatal y adulto, mantiene su expresión en la línea germinal. La delección de Oct4 implica anomalías durante el desarrollo temprano y pérdida de la pluripotencia en ESC en cultivo. Pese a considerarse el factor central de la pluripotencia, la expresión de Oct4 ni consolida ni aumenta la autorrenovación de las ESC, más al contrario, induce diferenciación a diversos linajes (Niwa et al., 2000). El mantenimiento

de la expresión de *Oct4* tras la implantación del embrión sugiere que este factor juega algún papel durante el compromiso del linaje de las ESC (Osorno et al., 2012; Thomson et al., 2011).

El factor transcripcional 2 de unión a cajas SRY o Sox2 (del inglés, *SRY-box protein 2*) es también esencial en el mantenimiento de la pluripotencia. Su inactivación en ESC induce la formación del trofoblasto (Masui et al., 2007). Sox2 interacciona físicamente con Oct4, uniéndose al DNA de forma conjunta en regiones Oct/Sox (Ambrosetti et al., 1997; Chen et al., 2008). A diferencia de *Oct4*, Sox2 posee una expresión más extendida en el organismo. Se expresa en todo el tejido neuroectodérmico y en algunos tejidos endodérmicos y epiteliales (Kopp et al., 2008; Zhao et al., 2004).

El factor transcripcional Nanog es otro de los factores importantes que gobiernan la pluripotencia de las ESC (Chambers et al., 2003; Mitsui et al., 2003; Torres and Watt, 2008). La expresión de *Nanog* está mucho más restringida que la de *Oct4* o Sox2. Se expresa exclusivamente en la mórula y la ICM, desapareciendo en el trofoblasto. Concretamente, la proteína Nanog en la ICM, junto con el factor transcripcional 6 de unión a cajas GATA o Gata6 (del inglés, *GATA binding protein 6*), dirige la formación del epiblasto e hipoblasto a través del control de la ruta Fgf/Fgfr/Erk (modelo *salt-and-pepper*, Fig. 4): las células que expresan *Nanog* reprimen *Gata6* y se convierten en células del epiblasto, y las células que expresan *Gata6* reprimen *Nanog* y se convierten en células del hipoblasto (Bessonard et al., 2014; Schrode et al., 2014; Silva et al., 2009). Este sistema sufre una retroalimentación a través de la ruta Fgf/Fgfr: Nanog induce la expresión de *Fgf4*, pero no de *Fgfr*, en el epiblasto, mientras que *Gata6* induce la expresión de *Fgfr*, pero no de *Fgf4*, en el hipoblasto (Fig. 4). Tras la implantación, la expresión de *Nanog* se reduce drásticamente. Esta expresión restringida a estas fases del desarrollo embrionario ha hecho de *Nanog* un gran marcador del estado naíf de pluripotencia (Okita et al., 2007; Silva et al., 2009; Silva and Smith, 2008). La sobreexpresión de *Nanog* permite el mantenimiento de la pluripotencia en ausencia de Lif (Chambers et al., 2003), en colaboración con Stat3 e inhibiendo al factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras *kappa* de las células B activadas o Nf-kb (del inglés, *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) (Torres and Watt, 2008). La pérdida de *Nanog* desestabiliza el cultivo de las ESC (Chambers et al., 2007) y la formación del epiblasto (Mitsui et al., 2003; Silva et al., 2009). Sin embargo, su ausencia no afecta a la autorrenovación de las ESC en condiciones 2i/Lif, sugiriendo que *Nanog* es sólo la puerta hacia el estado naíf de pluripotencia (Silva et al., 2009).

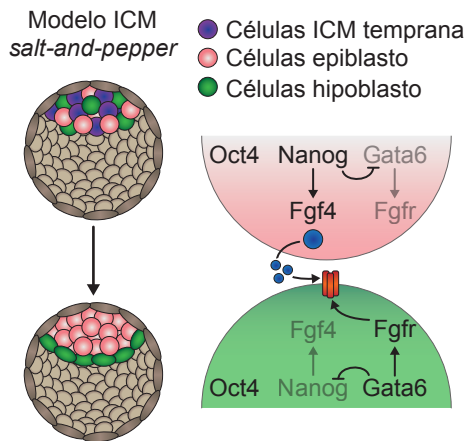


Figura 4. Especificación del epiblasto e hipoblasto en el modelo *salt-and-pepper* de la ICM (Chazaud et al., 2006).

En la ICM temprana (morado), las células que expresan *Nanog* reprimen *Gata6* y se convierten en células del epiblasto (rosa), y las células que expresan *Gata6* reprimen *Nanog* y se convierten en células del hipoblasto (verde). Este sistema sufre una retroalimentación a través de la ruta Fgf/Fgfr: *Nanog* induce la expresión de *Fgf4*, pero no de *Fgfr*, en el epiblasto, mientras que *Gata6* induce la expresión de *Fgfr*, pero no de *Fgf4*, en el hipoblasto. Esta señalización desde el epiblasto al hipoblasto refuerza el sistema. Tras la implantación, la expresión de *Nanog* se reduce drásticamente. Adaptado de Schrode et al., 2014.

La idea de que Oct4, Sox2 y Nanog conforman el núcleo transcripcional del control de la pluripotencia está ampliamente aceptada (Martello and Smith, 2014; Silva and Smith, 2008). *Grosso modo*, estos tres factores se encargarían de reprimir los genes asociados a la diferenciación y de activar los asociados a la pluripotencia (Boyer et al., 2005; Loh et al., 2006). La represión génica en las ESC a través de estos factores está asociada a los complejos modificadores de cromatina, como el complejo desacetilasa y remodelador del nucleosoma o NuRD (del inglés, *nucleosome remodeling and deacetylase complex*) (Kaji et al., 2006) o el complejo Polycomb (Boyer et al., 2005), que desacetilan y metilan las histonas, respectivamente, para garantizar el silenciamiento génico. Así, la principal señalización para la adquisición del estado comprometido de pluripotencia, Fgf/Erk, está estrechamente relacionada con estos tres factores: *Fgf4* está directamente regulado por Oct4 y Sox2 en las ESC y en el embrión, y el eje Fgf/Erk regula negativamente la expresión de *Nanog* (Ambrosetti et al., 1997; Bessonard et al., 2014; Nichols et al., 1998; Schrode et al., 2014; Silva et al., 2009). Los tres factores poseen una regulación entrecruzada, activándose a sí mismos y al resto (Kashyap et al., 2009; Masui et al., 2007; Young, 2011), excepto *Nanog* que se autorregula negativamente (Navarro et al., 2012). Curiosamente, el 90% de los promotores ocupados por OCT4 y SOX2 están también ocupados por NANOG en las ESC humanas (Boyer et al., 2005). Las diferentes propiedades de estos tres factores: 1) la extensa expresión en el organismo de Sox2, 2) la inducción de diferenciación por parte de la sobreexpresión de Oct4, 3) el mantenimiento del estado naíf en ausencia de Nanog, o 4) el hecho de que los tres factores se expresen también en las EpiSC, induce a sugerir que su expresión está rigurosamente regulada en las ESC para garantizar un correcto mantenimiento de la pluripotencia en el estado naíf (Fig. 5).

Otros factores importantes en el control de la pluripotencia son los factores transcripcionales 2 y 4 tipo Krüppel o Klf2/4 (del inglés, *Krüppel-like factor 2 and 4*), el receptor beta relacionado con el estrógeno o Esrrb (del inglés, *estrogen-related receptor beta*), el factor transcripcional 4 tipo Spalt o Sall4 (del inglés, *Spalt-like transcription factor 4*), el factor transcripcional 3 de caja T o Tbx3 (del inglés, *T-box transcription factor 3*) (Nichols and Smith, 2012). Así, por ejemplo, Klf4 induce la expresión de *Nanog* al reprimir la expresión de la proteína de tumores de 53 kDa o *p53* (del inglés, *tumor protein of 53 kDa*) (Rowland et al., 2005), un regulador negativo de *Nanog* (Lin et al., 2005), favoreciendo la adquisición del estado naíf de pluripotencia desde el estado condicionado (Guo et al., 2009) (Fig. 5); o Esrrb, regulado por *Nanog*, puede sustituir a éste durante el control de la pluripotencia (Festuccia et al., 2012). En el estado naíf de pluripotencia, estos factores transcripcionales, junto a Oct4, Sox2 y *Nanog*, están íntimamente relacionados entre sí. El uso de la biología computacional ha permitido establecer un esquema jerárquico mínimo del programa transcripcional que controla el estado naíf de pluripotencia de las ESC, sugiriendo la relación transcripcional de los factores y el efecto de las rutas de señalización implicadas (Dunn et al., 2014).

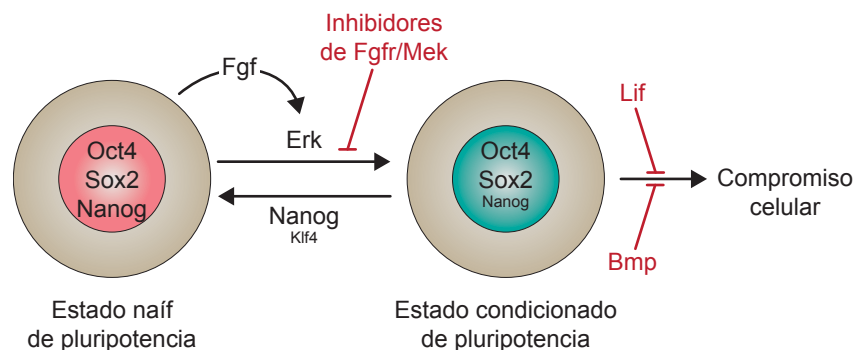


Figura 5. Control molecular de los estados de pluripotencia. El estado condicionado es un estado metaestable comprometido con la diferenciación. Este compromiso se adquiere a través de la señalización por Fgf/Erk. Su bloqueo permite capturar a las ESC en su estado naíf de pluripotencia. Lif y el suero (o Bmp) actúan como antagonistas de la diferenciación, garantizando la autorrenovación. La red transcripcional que controla la pluripotencia es similar en cuanto a los participantes, pero diferente en cuanto a las relaciones entre ellos: Oct4, Sox2 y *Nanog* se expresan en ambos estados, sin embargo, su expresión está rigurosamente regulada para garantizar estados de pluripotencia diferentes. Klf4 y, en especial, *Nanog* actúan como puerta hacia el estado naíf de pluripotencia. Adaptado de Silva and Smith, 2008.

2. Reprogramación celular

2.1. Reinterpretación del paisaje de Waddington

A finales del siglo XIX, August Weismann en su obra *The Germ-Plasm: A theory of heredity* describió la teoría genética conocida como *la barrera de Weismann* (Weismann, 1893). Esta teoría postulaba que la información hereditaria se desplaza siempre de los genes a las células del organismo, pero nunca al revés. O dicho de otro modo, desde las células germinales hacia las células somáticas. Como resultado de esta teoría, a mediados del siglo XX, Conrad Waddington postuló un modelo del desarrollo embrionario, denominado paisaje epigenético o paisaje de Waddington, a modo de bola que rueda cuesta abajo por un valle (Waddington, 1957), desde lo alto de la montaña (estado totipotente) hasta el fondo del valle (estado somático). De manera similar a la barrera de Weismann, este modelo describe un estado somático terminal y permanente debido a las modificaciones epigenéticas que el proceso de diferenciación celular impone sobre el genoma de las células (Fig. 6).

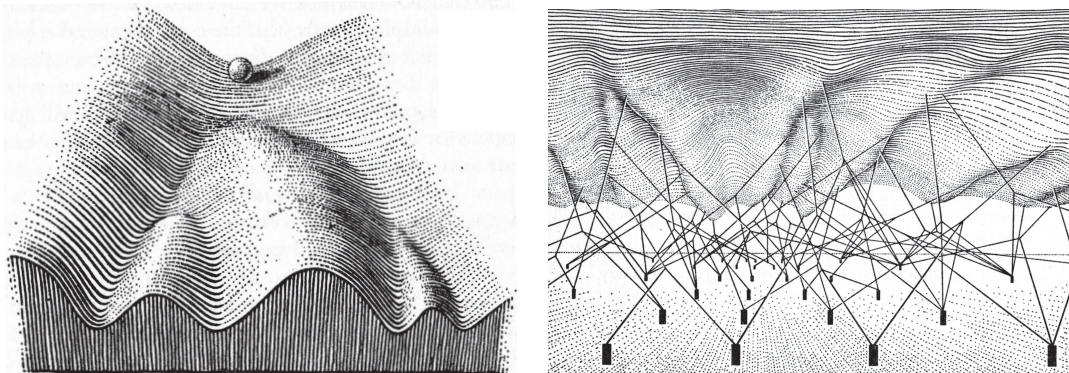


Figura 6. Diagramas de Conrad Waddington. El paisaje de Waddington postula un modelo del desarrollo embrionario a modo de bola que rueda cuesta abajo, desde lo alto de la montaña (estado totipotente) hasta el fondo del valle (estado somático), postulando un estado somático terminal y permanente (diagrama de la izquierda). El carácter terminal y permanente de este estado reside en la impronta epigenética que el proceso de diferenciación establece sobre los genes (diagrama de la derecha). Diagramas originales de la obra de Conrad Waddington *The Strategy of the genes: a discussion of some aspects of theoretical biology* (George Allen & Unwin, 1957), de acuerdo con el Artículo 32 del Real Decreto Legislativo 1/1996 de 12 de Abril, Ley de Propiedad Intelectual.

Sin embargo, la transferencia nuclear de células somáticas o SCNT (del inglés, *somatic cell nuclear transfer*), desarrollada en la década de los 50 por Robert Briggs y Thomas King (Briggs and King, 1952; King and Briggs, 1955), y los experimentos seminales de Sir John Gurdon (Gurdon, 1962; Gurdon et al., 1975) demostraron que

las células somáticas de los anfibios retenían la información necesaria para producir un nuevo individuo. Durante la SCNT, el núcleo de una célula somática es transferido a un oocito enucleado, el cual comienza a dividirse y a desarrollar un individuo genéticamente idéntico al donante de la célula somática. El gran descubrimiento de estos experimentos fue demostrar que la impronta epigenética que el desarrollo impone sobre el genoma es reversible (Fig. 7). La clonación de la oveja Dolly y otros mamíferos por SCNT (Wakayama et al., 1998; Wilmut et al., 1997) y la obtención de células madre embrionarias de epiblastos generados por SCNT (SCNT-ESC) (Cibelli et al., 1998; Munsie et al., 2000; Wakayama et al., 2001) extendió esta idea y sus aplicaciones más allá de los anfibios a finales del siglo XX (Fig. 7).

En paralelo a los estudios de SCNT, los trabajos de fusión o hibridación celular sugirieron conclusiones similares. Así, la fusión de células somáticas, como timocitos, con células del carcinoma embrionario inducen su reconversión y la extinción de sus propiedades somáticas, como por ejemplo, la reactivación del cromosoma X (Miller and Ruddle, 1976, 1977; Takagi et al., 1983). Resultados similares se obtuvieron cuando las células somáticas eran fusionadas con ESC (Cowan et al., 2005; Tada et al., 2001; Ying et al., 2002). La fusión con ESC consigue reorganizar la epigenética de las células somáticas. Este tipo de células madre tetraploides o $4n$ llegan a expresar marcadores clásicos de células madre embrionarias, como Oct4 (Fig. 7).

Todos estos trabajos no sólo asentaron la idea de que la regulación epigenética impuesta sobre el genoma de las células somáticas durante el desarrollo es reversible, sino que demostraron que las células pluripotentes, oocitos en la SCNT o ESC en la fusión celular, contenían uno o varios factores capaces de reprogramar los núcleos de las células somáticas. Los estudios posteriores de conversión directa de células somáticas o transdiferenciación gracias a la expresión de factores de transcripción hizo que se asociará esta función de “reprogramación celular” a este tipo de proteínas (Fig. 7). Se demostró que la expresión de la proteína 1 de diferenciación miogénica o *Myod1* (del inglés, *myogenic differentiation protein 1*) en fibroblastos induce la formación de fibras musculares (Davis et al., 1987), que la expresión ectópica del factor transcripcional de eritrocitos *Gata1* (del inglés, *GATA binding protein 1*) puede convertir mieloblastos en megacariocitos y precursores de eritrocitos (Kulesa et al., 1995), o que la sobreexpresión de la proteína alfa/beta de unión a cajas CCAAT o *Cebpa/β* (del inglés, *CCAAT/enhancer-binding protein alpha/beta*) induce la conversión de linfocitos en macrófagos (Xie et al., 2004). Desde entonces, multitud de conversiones directas han sido descritas, demostrando que casi cualquier

transdiferenciación es posible, si se utilizan los factores transcripcionales adecuados (Nicholas and Kriegstein, 2010).

Los ensayos de SCNT, fusión celular y transdiferenciación, así como el conocimiento de la biología molecular de las ESC, asentaron las bases para el desarrollo de la pluripotencia inducida por factores de transcripción o reprogramación celular² en 2006 por Kazutoshi Takahashi y Shinya Yamanaka (Takahashi and Yamanaka, 2006).

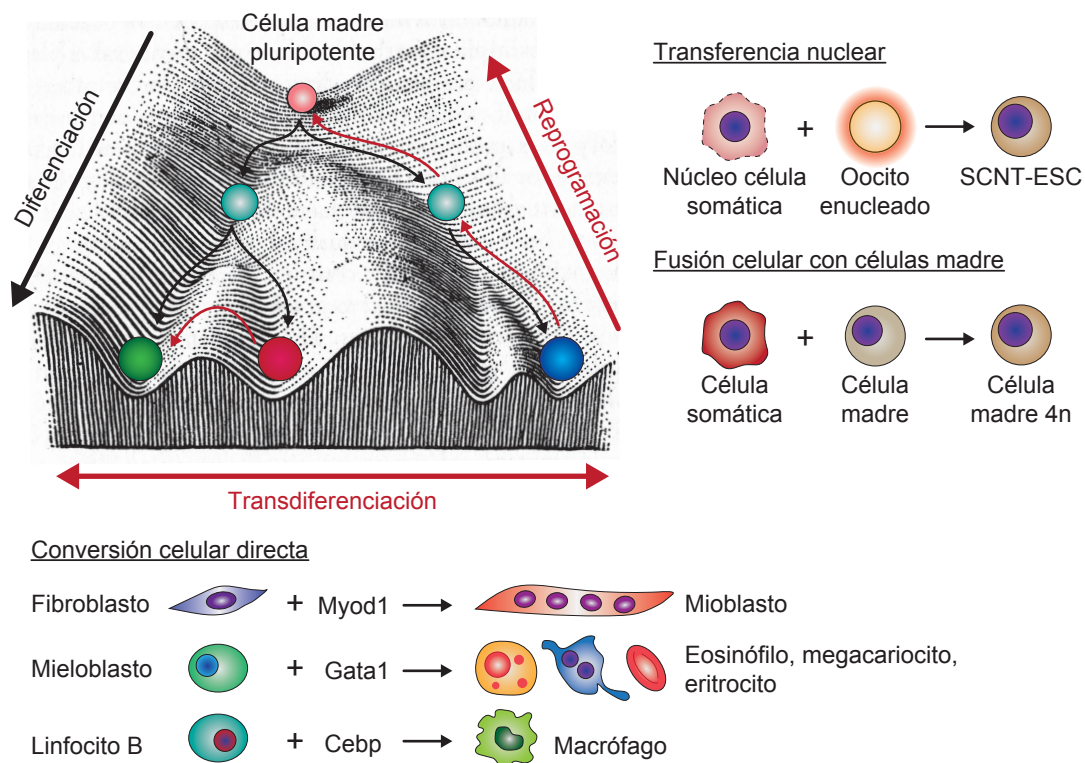


Figura 7. Reinterpretación del paisaje de Waddington. Los estudios de la SCNT, la fusión celular y la conversión directa han demostrado que el paisaje de Waddington era un modelo, cuando menos, incompleto. Las posibles reconversiones celulares no sólo están acotadas al desarrollo embrionario o a la diferenciación *in vitro* (flechas en negro): desde las células madre (rosa) hasta las células somáticas (verde, rojo o azul), pasando por la fase de progenitores (cian), sino que existe casi cualquier combinación posible (flechas en rojo): diferenciación celular, de célula pluripotente a célula somática; transdiferenciación celular directa, de célula somática a célula somática (transdiferenciación indirecta, de célula somática a célula somática, pasando por un estado de progenitor celular); reprogramación celular, de célula somática a célula madre pluripotente. Adaptado de Takahashi and Yamanaka, 2016, a partir de los diagramas originales de la obra de Conrad Waddington *The Strategy of the genes: a discussion of some aspects of theoretical biology* (George Allen & Unwin, 1957), de acuerdo con el Artículo 32 del Real Decreto Legislativo 1/1996 de 12 de Abril, Ley de Propiedad Intelectual.

² Estrictamente, toda conversión celular (diferenciación, transdiferenciación o desdiferenciación) es un proceso de reprogramación en el que el programa transcripcional se reorganiza para configurar un nuevo fenotipo celular concreto. Sin embargo, el término reprogramación celular es ampliamente utilizado para referirse al proceso descrito por Takahashi y Yamanaka.

2.2. Factores de transcripción y pluripotencia inducida

Para identificar los factores transcripcionales que podrían inducir la pluripotencia celular, Kazutoshi Takahashi y Shinya Yamanaka diseñaron una serie de experimentos con 24 genes que codificaban para marcadores estrechamente asociados a la pluripotencia de las ESC (Mitsui et al., 2003; Takahashi and Yamanaka, 2006). Originalmente, la sobreexpresión de los 24 candidatos indujo la aparición *in vitro* de unas agrupaciones celulares de tipo epitelial que presentaban una morfología similar a las ESC. Tras sucesivas rondas de eliminación mediante cribados secuenciales con cada uno de los 24 genes, identificaron la combinación mínima necesaria para generar este tipo de agrupaciones celulares, el denominado cóctel de Yamanaka: Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc (OSKM de ahora en adelante). Las células generadas por la expresión de OSKM expresaban marcadores de pluripotencia como *Oct4* o *Nanog*, generaban teratomas mediante inyección subcutánea en ratones, y contribuían en la generación de los diferentes tejidos tras su inyección en blastocistos (Takahashi and Yamanaka, 2006). Denominaron a este tipo de células células madre pluripotentes inducidas o iPSC (del inglés, *induced pluripotent stem cells*). Estas iPSC de primera generación, sin embargo, estaban parcialmente reprogramadas: presentaban una desmetilación parcial de algunos promotores, como los de *Oct4* o *Nanog*, y eran incapaces de generar ratones quiméricos viables o de contribuir al desarrollo de la línea germinal (Okita et al., 2007; Takahashi and Yamanaka, 2006). Posteriores trabajos en los que se usó como marcador de pluripotencia la expresión de *Nanog* u *Oct4* generaron iPSC completamente reprogramadas muy similares a las ESC (Maherali et al., 2007; Okita et al., 2007; Wernig et al., 2007). Desde entonces, mediante la expresión del cóctel de Yamanaka o derivados de éste, se han obtenido iPSC de diferentes especies, incluyendo humanos (Park et al., 2008; Takahashi et al., 2007b), ratas (Li et al., 2009b) y mono Rhesus (Liu et al., 2008); a partir de diferentes estados somáticos, como queratinocitos (Aasen et al., 2008; Maherali et al., 2008), células neurales (Eminli et al., 2008; Kim et al., 2008), células del estómago e hígado (Aoi et al., 2008), melanocitos (Utikal et al., 2009a), células β del páncreas (Stadtfield et al., 2008a) o linfocitos (Eminli et al., 2009; Hanna et al., 2008); e incluso en condiciones *in vivo* (Abad et al., 2013), indicando que el proceso que gobierna, mantiene y, ahora, induce la pluripotencia celular está evolutivamente conservado y es universalmente válido.

Las iPSC de primera generación se obtuvieron mediante la expresión retroviral de los cuatro factores (Maherali et al., 2007; Okita et al., 2007; Takahashi and Yamanaka, 2006; Wernig et al., 2007). Este sistema induce la integración y expresión de OSKM hasta la adquisición de la pluripotencia, momento en el cual los cuatro

factores se silencian (Stadtfield et al., 2008b) mediante metilación del DNA de origen retroviral (Lei et al., 1996) o de las histonas que lo envuelven (Matsui et al., 2010). Sin embargo, el silenciamiento incompleto puede generar líneas parcialmente reprogramadas (Mikkelsen et al., 2008; Sridharan et al., 2009; Takahashi and Yamanaka, 2006). Esta actividad residual puede interferir en una correcta diferenciación (Takahashi and Yamanaka, 2006) o incrementar el potencial tumorigénico de las células (Okita et al., 2007). Este hecho, el potencial mutagénico de los retrovirus integrativos y la baja eficiencia del proceso de reprogramación, entorno al 0,1% (Stadtfield and Hochedlinger, 2010), han incentivado el desarrollo de nuevos sistemas de reprogramación, como por ejemplo sistemas inducibles que controlan la expresión génica de los factores exógenos (Brambrink et al., 2008; Maherali et al., 2008; Stadtfield et al., 2008b; Wernig et al., 2008a; Woltjen et al., 2009) o sistemas no integrativos que, con eficiencias de reprogramación en ocasiones más bajas, evitan la integración de los factores en el genoma de las células (Kaji et al., 2009; Okita et al., 2008; Stadtfield et al., 2008c; Woltjen et al., 2009; Zhou et al., 2009; Zhou and Freed, 2009). De todos ellos, la aproximación que muestra mayores perspectivas de futuro es la inducción mediante compuestos químicos. Estos compuestos ayudan o sustituyen a los factores de reprogramación (Feng et al., 2009b; Hou et al., 2013; Li and Ding, 2010; Zhao et al., 2015), eliminando la necesidad de cualquier técnica de ingeniería genética, y con ello, toda la problemática mencionada.

Las primeras comparaciones entre ESC e iPSC revelaron patrones de expresión (Chin et al., 2009) y de metilación del DNA (Deng et al., 2009; Doi et al., 2009) diferentes, mostrando cierta persistencia del patrón original somático (Ghosh et al., 2010; Kim et al., 2011; Lister et al., 2011; Marchetto et al., 2009; Ohi et al., 2011). Sin embargo, estudios más exhaustivos con un mayor número de muestras de iPSC demuestran que estas diferencias son poco relevantes (Guenther et al., 2010; Newman and Cooper, 2010), o incluso inexistentes (Bock et al., 2011). Las iPSC pueden mostrar una mayor variabilidad entre diferentes líneas, llegando algunas de ellas a presentar diferencias significativas con las ESC en el patrón de expresión, la metilación de DNA o su habilidad para la diferenciación (Miura et al., 2009), sin embargo, ha quedado demostrado que algunas iPSC son indistinguibles de las ESC.

2.3. El proceso de reprogramación celular

Frente a la conversión directa, la reprogramación celular presenta un eficiencia menor y una cinética más lenta (Stadtfield and Hochedlinger, 2010). Así, por ejemplo, la

reconversión a macrófagos a partir de linfocitos por la expresión de *Cebpa* posee un eficiencia del 100% en tan sólo 48 horas (Xie et al., 2004). Este dato sugiere que la tarea de borrado o reprogramación epigenética que tienen que desempeñar los factores OSKM es mucho mayor, y que, en definitiva, el número de barreras que una célula debe salvar durante el proceso es mucho menor cuando la reconversión se produce entre dos estados somáticos cercanos (mismo linaje) que cuando se produce entre un estado somático y el estado pluripotente.

Para que la reprogramación celular llegue a término es necesario una organizada secuencia de eventos que empieza con el silenciamiento de los marcadores del estado somático (Stadtfield et al., 2008b); sigue con la activación del ciclo celular (Mikkelsen et al., 2008), el cambio metabólico (Folmes et al., 2011; Panopoulos et al., 2012) y los cambios asociados a la transición de mesénquima a epitelio o MET (del inglés, *mesenchymal-to-epithelial transition*) (Li et al., 2010; Samavarchi-Tehrani et al., 2010); y finaliza con el proceso de inmortalización celular (Banito et al., 2009; Hong et al., 2009; Kawamura et al., 2009; Li et al., 2012a; Li et al., 2009a; Marion et al., 2009; Utikal et al., 2009b) y la activación de los marcadores de pluripotencia tempranos, primero (como SSEA1 o la fosfatasa alcalina), y tardíos, después (como *Oct4* o *Nanog*) (Brambrink et al., 2008; Stadtfield et al., 2008b). Durante este proceso, las células han de ser capaces de independizar la estabilidad de su pluripotencia de los factores exógenos, mediante su silenciamiento y la reactivación del programa endógeno de control de la pluripotencia. Este proceso, así como la adquisición de un estado pluripotente total, se produce mediante un remodelado epigenético global a través de las enzimas que regulan las modificaciones de histonas (Ang et al., 2011; Ding et al., 2014; Wang et al., 2011b) y DNA, para el cual se han propuesto mecanismos de desmetilación pasiva o activa (Apostolou and Hochedlinger, 2013; Hochedlinger and Plath, 2009). Este proceso se incrementa de manera secuencial ciclo tras ciclo durante la proliferación celular (Maherali et al., 2007; Mikkelsen et al., 2008; Polo et al., 2010). Así, líneas de iPSC obtenidas de un mismo origen pero a tiempos distintos presentan patrones de expresión y metilación del DNA distintos (Meissner et al., 2007), reteniendo cierta memoria epigenética de su origen celular (Kim et al., 2010). Debido a la importancia que factores como *Nanog* juegan en la adquisición de la pluripotencia, la desmetilación que sufren sus promotores es una barrera crucial para la completa reprogramación de la célula (Hanna et al., 2009; Hochedlinger and Plath, 2009; Silva et al., 2009). Así, el análisis de intermediarios celulares ha revelado que éstos suelen quedar bloqueados en estados parcialmente reprogramados debido a 1) la represión incompleta de factores transcripcionales específicos del linaje de origen, 2) el incorrecto silenciamiento de los transgenes de

origen retroviral, o 3) la hipermetilación de los promotores de pluripotencia (Mikkelsen et al., 2008). Curiosamente, el patrón de expresión génica de estos intermediarios presenta similitudes con el de los intermediarios o progenitores que aparecen durante la diferenciación celular a lo largo del desarrollo embrionario, sugiriendo que la reprogramación celular pueda ser una suerte de ruta inversa al desarrollo embrionario (Cacchiarelli et al., 2015; O'Malley et al., 2013; Polo et al., 2012; Takahashi et al., 2014).

Tres trabajos seminales en el campo de la reprogramación celular han demostrado que la superación de estas barreras está organizada en dos olas o cascadas de procesos celulares (Buganim et al., 2012; Hansson et al., 2012; Polo et al., 2012). Una primera ola asociada, fundamentalmente, a cambios en el ciclo celular, replicación de DNA y la transición de mesénquima a epitelio, y una segunda ola asociada a la reactivación total del núcleo transcripcional que gobierna la pluripotencia. Estos estudios han revelado que la baja eficiencia del proceso se debe a que numerosas células son refractarias a la reprogramación, quedando atrapadas en intermediarios celulares. Aunque el proceso de cambio epigenético es constante desde las primeras etapas del proceso, silenciando primero los marcadores somáticos y activando después los de pluripotencia, la reconfiguración del patrón de metilación tiene lugar, principalmente, en la segunda fase del proceso (Polo et al., 2012) (Fig. 8).

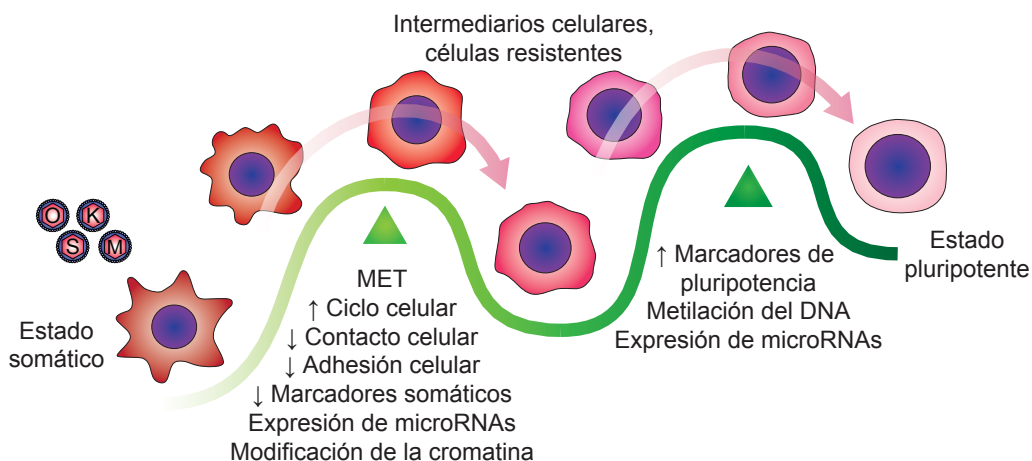


Figura 8. Organización secuencial de los eventos moleculares que dirigen la reprogramación celular. Las barreras que una célula debe salvar para reprogramarse por completo están organizadas en dos olas secuenciales. Una primera ola asociada fundamentalmente a cambios en el ciclo celular, replicación de DNA y la transición de mesénquima a epitelio, y una segunda ola asociada a la reactivación total del núcleo transcripcional que gobierna la pluripotencia. Estos estudios han revelado que la baja eficiencia del proceso se debe a que numerosas células son refractarias a la reprogramación, quedando atrapadas en intermediarios celulares. Adaptado de Sancho-Martínez and Izpisua, 2013.

2.4. Función de los factores transcripcionales durante la reprogramación celular

Con la excepción de Oct4, el resto de factores han sido descritos como sustituibles o innecesarios: sustituibles puesto que, por ejemplo, Sox2 puede ser reemplazado por Sox1 o Sox3 (Nakagawa et al., 2008), Klf4 por Klf2 o Klf5 (Jiang et al., 2008), y c-Myc por cualquier otro miembro de la familia Myc (Nakagawa et al., 2010) o inhibidores de las desacetilasas de histonas (Huangfu et al., 2008a; Huangfu et al., 2008b); e innecesarios porque algunos de ellos se expresan parcialmente en las células de partida. Por ejemplo, las células madre neurales, que presentan una alta expresión de Sox2, se pueden reprogramar sin este factor (Eminli et al., 2008), con la combinación Oct4/Sox2 (Kim et al., 2008), o únicamente con Oct4 (Kim et al., 2009). Otros factores asociados a la pluripotencia, como Nanog, Sall4, Esrrb o Lin28, también han sido incluidos en el cóctel de reprogramación, sustituyendo a alguno de los factores originales (Buganim et al., 2012; Feng et al., 2009a; Haase et al., 2009; Worringer et al., 2014; Yu et al., 2007). También algunos microRNAs han sido descritos como inductores de la pluripotencia (Judson et al., 2009), bien favoreciendo la transición de mesénquima a epitelio (Samavarchi-Tehrani et al., 2010), bien impidiendo el proceso inverso, la transición de epitelio a mesénquima (Liao et al., 2011; Subramanyam et al., 2011). Como punto de referencia, no obstante, es pertinente describir cuál es el mecanismo molecular que subyace a la inducción de la reprogramación celular por el cóctel clásico de Yamanaka, OSKM.

Se han postulado varios modelos para describir el proceso de reprogramación celular (Yamanaka, 2007). Inicialmente, se propuso el denominado modelo de la élite en el que se postulaba que OSKM inducía la reprogramación de una subpoblación de células con propiedades específicas o 'élite' dentro de la población somática original (Fig. 9). Estas células serían progenitores intermediarios que, al tener ciertas características de pluripotencia, podrían ser fácilmente reprogramadas (Yamanaka, 2009). Sin embargo, estudios en los que se obtuvo iPSC a partir de células diferenciadas de forma terminal, como linfocitos T o B (Aoi et al., 2008; Hanna et al., 2008; Stadtfeld et al., 2008a), descartaron esta posibilidad. No obstante, sí se han descrito propiedades particulares dentro de poblaciones celulares completamente diferenciadas que favorecen la reprogramación, como por ejemplo, una tasa de proliferación elevada (Guo et al., 2014; Ruiz et al., 2011; Xu et al., 2013). Descartado el modelo de la élite, se han contrapuesto dos nuevos modelos: uno estocástico y otro determinista. Un modelo exclusivamente estocástico implicaría que los eventos necesarios para que se dé la reprogramación celular pueden ocurrir o no ocurrir, a

tiempos idénticos o diferentes y que la aparición de iPSC puede darse o no. Un modelo exclusivamente determinista implicaría una secuencia de eventos constante y predecible de principio a fin (Fig. 9). En los últimos años, la opción más ampliamente aceptada a día de hoy es la de un modelo parcialmente estocástico, parcialmente determinista (Buganim et al., 2013; Takahashi and Yamanaka, 2016).

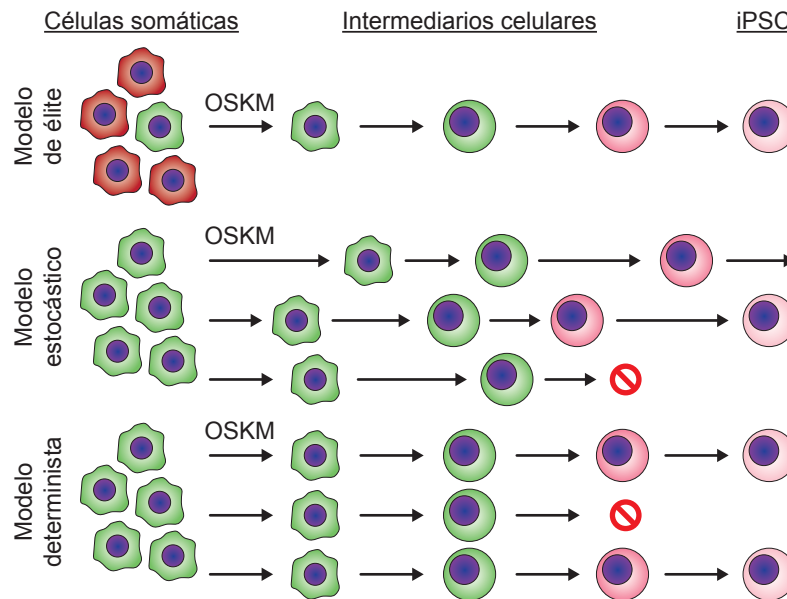


Figura 9. Modelos de élite, estocástico y determinista de reprogramación celular. En el modelo de élite sólo un subconjunto de la población con propiedades específicas o 'élite' puede reprogramarse. En el modelo estocástico los eventos moleculares pueden ocurrir o no ocurrir, a tiempos idénticos o diferentes, y la aparición de iPSC puede darse o no. Un modelo determinista implicaría una secuencia de eventos constante y predecible de principio a fin. En rojo, células refractarias a la reprogramación; en verde, células susceptibles de reprogramación o en curso; en rosas, células total o parcialmente reprogramadas. Adaptado de Takahashi and Yamanaka, 2016.

La fase estocástica es la primera fase del proceso. En ella, los cuatro factores se unen de forma aleatoria sobre los *loci* más accesibles del genoma. Estos *loci* suelen coincidir con marcadores somáticos, dado que al estar expresándose, la apertura de la cromatina y facilidad de unión es mayor. De hecho, estos *loci* no suelen estar ocupados por los factores OSKM en ESC (Soufi et al., 2012). Esta unión suele conllevar la represión de la expresión de estos marcadores somáticos (Soufi et al., 2012; Sridharan et al., 2009). Pese a que, durante esta primera fase, los cuatro factores pueden unirse aleatoriamente sobre marcadores de pluripotencia también (Buganim et al., 2012; Soufi et al., 2012), su reactivación es muy ineficiente dada la marcada hipermetilación de estos genes en el estado somático. Los procesos de

reactivación de genes implican la participación de un gran número de factores, en comparación con los procesos de represión génica, donde la unión de un sólo factor puede ser suficiente (Boyer et al., 2005; Loh et al., 2006; Wang et al., 2006). Esto puede ser una razón por la que los marcadores somáticos se silencian antes de que se activen los correspondientes al estado pluripotente (Stadtfield and Hochedlinger, 2010). Así, inhibidores de las desacetilasas de histonas y las metilasas de DNA ayudan a reactivar genes silenciados y alivian esta barrera molecular (Feng et al., 2009b; Huangfu et al., 2008a; Huangfu et al., 2008b). La fase determinista es la segunda fase del proceso. En esta fase, los eventos discurren de una forma más jerárquica y predecible. Los *loci* de los genes pluripotentes están más accesibles para los cuatro factores y éstos pueden comenzar a activar el programa endógeno de control de la pluripotencia (Brambrink et al., 2008; Buganim et al., 2012; Polo et al., 2012; Stadtfield et al., 2008b) (Fig. 10).

Durante la fase determinista de la reprogramación celular, los factores Oct4, Sox2 y Klf4 parecen actuar cooperativamente en la reactivación del programa endógeno de control de la pluripotencia, sobre todo Oct4 y Sox2 (Sridharan et al., 2009). Así, se ha descrito que, mientras que Oct4, Sox2 y Klf4 son necesarios durante la segunda fase de reprogramación (aunque Klf4 también participa en la primera), el papel de c-Myc es completamente distinto, siendo crucial únicamente durante la primera fase del proceso (Buganim et al., 2012; Mikkelsen et al., 2008; Polo et al., 2012; Sridharan et al., 2009) (Fig. 10).

El factor transcripcional c-Myc es un protooncogén asociado a la pluripotencia de las ESC, regulado por las rutas de señalización Lif/Stat3 y Wnt/Catenina β , que garantiza la autorrenovación de estas células pluripotentes. Concretamente, el gen *c-Myc* es una diana de la ruta Lif/Stat3, mientras que la activación de la ruta Wnt permite la inhibición de Gsk3 β , la cual fosforila a c-Myc (Fig. 2). c-Myc fosforilado por Gsk3 β es rápidamente ubiquitinizado y degradado (Cartwright et al., 2005). En ausencia de c-Myc, las ESC entran en un estado durmiente similar a la diapausa embrionaria de ciertos mamíferos (Scognamiglio et al., 2016). Pese a ello, c-Myc no forma parte del programa transcripcional mínimo que gobierna la pluripotencia celular (Dunn et al., 2014), de hecho, puede ser omitido durante la reprogramación celular (Nakagawa et al., 2008; Wernig et al., 2008b), aunque con un considerable descenso en la rapidez y eficiencia del proceso. Por este motivo, se le han asociado diferentes funciones en el proceso de reprogramación celular (Knoepfler, 2008): 1) como facilitador de la unión de los factores OSK a sus dianas en el DNA, al reclutar complejos desacetilasas de histonas (Adhikary and Eilers, 2005; Knoepfler, 2007; Knoepfler et al., 2006; Soufi et

al., 2012; Yamanaka, 2007); 2) como activador del ciclo celular, para garantizar la autorrenovación de las células (Bretones et al., 2015; Knoepfler et al., 2002) y favorecer la desmetilación pasiva del DNA durante la proliferación celular (Hochedlinger and Plath, 2009); 3) como partícipe del proceso de inmortalización, al reprimir la actividad antiproliferativa de la proteína de tumores de 21 kDa o p21^{Cip1/Waf1} (del inglés, *tumor protein of 21 kDa*, *CDK-interacting protein 1* o *wild-type p53-activated fragment 1*) inducida por Klf4 (Seoane et al., 2002); o 4) como activador del cambio metabólico (Folmes et al., 2013).

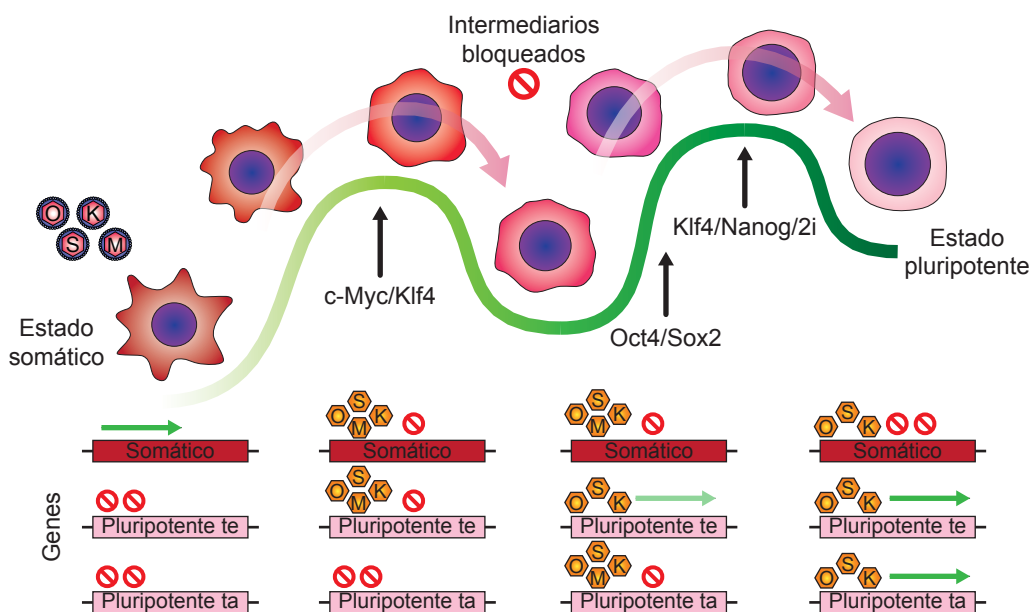


Figura 10. Acción secuencial de los factores OSKM durante la reprogramación en dos fases. Una primera etapa estocástica genera la aparición de intermediarios parcialmente reprogramados, los cuales pueden acceder a la segunda etapa del proceso siguiendo una secuencia de eventos más jerarquizada y predecible. Oct4, Sox2 y Klf4 son necesarios a partir de la primera fase de reprogramación. El factor transcripcional c-Myc ejerce diferentes funciones durante la primera etapa del proceso, entre ellas está la de actuar como facilitador de unión al DNA del resto de factores. Debido al silenciamiento epigenético, los marcadores somáticos se reprimen antes de que se activen los marcadores pluripotentes. La expresión de factores, como Nanog, o condiciones de cultivo, como el 2i, favorecen la conversión total de intermediarios bloqueados en iPSC. Pluripotente te, gen pluripotente de expresión temprana, como *SSEA1*; pluripotente ta, gen pluripotente de expresión tardía, como *Nanog*.

En resumen, la reprogramación celular discurre en dos fases: una primera etapa estocástica, dependiente de la función activadora de c-Myc y represora de Klf4, que genera la aparición de intermediarios parcialmente reprogramados, y una segunda más jerarquizada y predecible, dirigida por Oct4, Sox2 y Klf4, en la que algunos de estos intermediarios activarán el programa endógeno de control de la pluripotencia.

Ciertos intermediarios celulares, no obstante, pueden quedar atrapados durante la transición (Sridharan et al., 2009). La sobreexpresión adicional de *OSKM* (Polo et al., 2012) o *Nanog* (Silva et al., 2009; Theunissen et al., 2011), el cultivo en 2i (Silva et al., 2008), o la inhibición de las metiltransferasas de DNA (Mikkelsen et al., 2008), entre otros, favorecen la reconversión total de algunos de estos intermediarios celulares en iPSC (Fig. 10).

3. Dinámica mitocondrial

3.1. La mitocondria y su dinámica

Las mitocondrias y su movimiento como orgánulos fueron descritos por primera vez hace más de 100 años (Lewis and Lewis, 1914). De acuerdo con la teoría endosimbionte (Sagan, 1967), las mitocondrias retienen algunas características de sus ancestros procariotas: un proteoma similar, un DNA circular en forma de nucleoides (DNA mitocondrial o mtDNA, del inglés, *mitochondrial DNA*), ribosomas procariotas y la capacidad de obtener energía en forma de ATP, mediante un gradiente de protones creado por la membrana mitocondrial interna. De hecho, proporcionar energía a la célula mediante la fosforilación oxidativa u OXPHOS (del inglés, *oxidative phosphorylation*), consumiendo este gradiente, es una de sus principales funciones. En humanos, 13 de los 37 genes que contiene el mtDNA (más 2 RNA ribosómicos y 22 RNA de transferencia) codifican para proteínas que participan en la cadena de transporte electrónico que genera este gradiente (Anderson et al., 1981). Además de la producción de energía mediante OXPHOS, la mitocondria participa en un gran número de funciones celulares: diferentes rutas metabólicas, la homeostasis intracelular del calcio (Jacobson and Duchon, 2004), la señalización celular, el ensamblaje de proteínas hierro-azufre (Stehling et al., 2014), la apoptosis (Tait and Green, 2010) o la inmunidad innata (Cloonan and Choi, 2013).

Las mitocondrias no se producen *de novo*, sino que se dividen por fisión y se unen por fusión (Bereiter-Hahn and Voth, 1994; Johnson et al., 1981; Rizzuto et al., 1996). El balance entre fisión y fusión permite a la mitocondria adoptar diferentes estructuras. Cuando la fisión es mayor que la fusión, las mitocondrias están fragmentadas y aisladas unas de otras. Cuando la fusión es mayor que la fisión, son tubulares, llegando a formar una extensa red de mitocondrias interconectadas. Esta compleja dinámica de fusión y fisión permite mantener una población mitocondrial homogénea y funcional, intercambiando componentes (proteínas o copias de mtDNA) y/o restableciendo el gradiente de protones (Chen et al., 2003; Chen et al., 2010;

Legros et al., 2002). Células deficientes para el mecanismo de fusión presentan una población mitocondrial heterogénea y una reducción de su capacidad energética (Chen et al., 2005; Chen et al., 2007). Así pues, las mitocondrias no deben ser consideradas como autónomas y estáticas, sino más bien como una dinámica red de orgánulos que actúan cooperando entre sí de forma coordinada.

Independientemente de este equilibrio dinámico entre los procesos de fusión y fisión, existen momentos o funciones mitocondriales para los cuales la red mitocondrial ha de adaptarse hacia uno de los dos extremos: red interconectada o mitocondrias fragmentadas. Algunos ejemplos de la necesidad de la fragmentación mitocondrial son: 1) la fase G2/M del ciclo celular, para favorecer el reparto de estos orgánulos entre las dos células hijas tras la división celular (Qian et al., 2012; Smirnova et al., 2001; Taguchi et al., 2007); 2) el transporte de las mitocondrias en neuronas, para proveer energía a dendritas y axones (Hollenbeck and Saxton, 2005); 3) la activación de la apoptosis, para la liberación del citocromo c al citoplasma (Arnoult, 2007; Estaquier and Arnoult, 2007; Frank et al., 2001; Pyakurel et al., 2015); o 4) la mitofagia, para garantizar el reciclado de mitocondrias disfuncionales (Mao et al., 2013; Tanaka et al., 2010; Twig et al., 2008). Por contra, los procesos en los que la fusión mitocondrial es requerida son: 1) la transición G1/S del ciclo celular, para un mayor aporte energético que mantenga la síntesis de DNA (Mittra et al., 2009); 2) la supervivencia celular en momentos de inanición, para maximizar la producción de energía y evitar así la mitofagia (Gomes et al., 2011; Rambold et al., 2011); o 3) el desarrollo embrionario, como la generación del trofoblasto y la placenta (Chen et al., 2003; Chen et al., 2007). El control de la dinámica mitocondrial es, pues, crucial para la correcta implementación de las funciones mitocondriales. Mutaciones en los componentes que guían o regulan los procesos de fusión y fisión generan diversas patologías en humanos, como la atrofia óptica dominante (gen *OPA1*) (Alexander et al., 2000; Delettre et al., 2000), la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (genes *MFN2* y *GDAP1*) (Baxter et al., 2002; Nelis et al., 2002; Zuchner et al., 2004) o incluso letalidad neonatal en ratones (gen *Drp1*) (Ishihara et al., 2009; Wakabayashi et al., 2009).

3.2. La maquinaria de la dinámica mitocondrial

Las principales proteínas que dirigen los procesos de dinámica mitocondrial pertenecen a la superfamilia de las dinaminas. Las dinaminas son una familia de GTPasas que tienden a formar estructuras oligoméricas en forma de anillos o espirales. Estas estructuras, junto al consumo de energía en forma de GTP, ayudan a

aportar la fuerza mecánica necesaria para el acercamiento de membranas lipídicas (Praefcke and McMahon, 2004). La mayoría de estas proteínas fueron descubiertas por primera vez en *Sacharomyces* o en *Drosophila*, e identificadas en mamíferos por estudios de homología génica (van der Bliek et al., 2013).

La fusión mitocondrial necesita un juego de tres proteínas, dos para la fusión de la membrana mitocondrial externa o MME y una para la fusión de la interna o MMI. Las proteínas Mitofusina 1 y Mitofusina 2 o Mfn1/2 son proteínas transmembrana de la MME que forman homo o heterocomplejos para fusionar la membrana de dos mitocondrias adyacentes (Chen et al., 2005; Chen et al., 2003; Koshiba et al., 2004). La proteína 1 de la atrofia óptica u Opa1 (del inglés, *optic atrophy protein 1*) es otra proteína transmembrana de la MMI que, en coordinación con las Mitofusinas, dirige la fusión de la MMI de dos mitocondrias adyacentes (Olichon et al., 2003). En ausencia de Opa1 o del potencial de membrana mitocondrial, ambas MME se fusionan pero no comparten los componentes de la matriz mitocondrial debido a la falta de fusión de la MMI (Cipolat et al., 2004) (Fig. 11).

La proteína 1 relacionada con la dinamina o Drp1 (del inglés, *dynamin-related protein 1*) es la proteína central que ejecuta el proceso de fisión mitocondrial. A diferencia de las tres anteriores, se trata de una proteína citosólica que es reclutada a la MME para llevar a cabo la fragmentación. Drp1 posee 4 dominios proteicos: un dominio N-terminal GTPasa, seguido de los dominios medio y variable, y otro C-terminal efector de la GTPasa o GED (del inglés, *GTPase effector domain*) (Fig. 12). Las células que carecen de Drp1 presentan un fenotipo mitocondrial en forma de red interconectada (Ishihara et al., 2009; Otsuga et al., 1998; Smirnova et al., 1998). El proceso de fisión comienza con el reclutamiento de Drp1 sobre la MME en forma de estructuras focales a través de proteínas de membranas adaptadoras (Mozdy et al., 2000; Tieu and Nunnari, 2000). Drp1 comienza a oligomerizar a través de sus dominios medio y GED C-terminales, formando el anillo contráctil clásico de las dinaminas alrededor de la mitocondria. Una vez la espiral se completa, los dominios GTPasa adyacentes activan la hidrólisis del GTP (van der Bliek and Payne, 2010). Esta reacción causa un cambio conformacional tal que acaba constriñendo el anillo alrededor de la mitocondria hasta escindirlos en dos (Mears et al., 2011) (Fig. 11).

La primera de las proteínas adaptadoras de Drp1 fue identificada en levadura, la proteína 1 de fisión mitocondrial o Fis1 (Mozdy et al., 2000). Existe una proteína homóloga para Fis1 en eucariotas superiores (Lee et al., 2004; Yoon et al., 2003), sin embargo, estudios genéticos han revelado que Fis1 no es necesaria para la fisión en mamíferos (Otera et al., 2010). No obstante, existe una serie de proteínas adaptadoras

alternativas a Fis1, como el factor de fisión mitocondrial o Mff (del inglés, *mitochondrial fission factor*) o las proteínas de dinámica mitocondrial de 49 y 51 kDa o Mid49/51 (del inglés, *mitochondrial dynamics proteins of 49 and 51 kDa*). Mff es suficiente para dirigir el reclutamiento de Drp1 a la mitocondria (Otera et al., 2010), pero también Mid49/51 (Palmer et al., 2013; Palmer et al., 2011; Zhao et al., 2011). Dos estudios más recientes han propuesto la posibilidad de que estos 3 adaptadores actúen de forma conjunta y/o redundante (Loson et al., 2013; Osellame et al., 2016) (Fig. 11).

Además de Drp1 y las proteínas adaptadoras, se ha propuesto un papel activo del retículo endoplásmico o ER (del inglés, *endoplasmic reticulum*) en el proceso de fisión mitocondrial (Friedman et al., 2011; Korobova et al., 2013). Concretamente, proyecciones del ER envolverían la mitocondria en los puntos en los que se va a producir la fragmentación de este orgánulo, favoreciendo la constricción. Estos contactos no dependen de Drp1, sino que más bien favorecen su reclutamiento hacia esos puntos de contacto (Fig. 11).

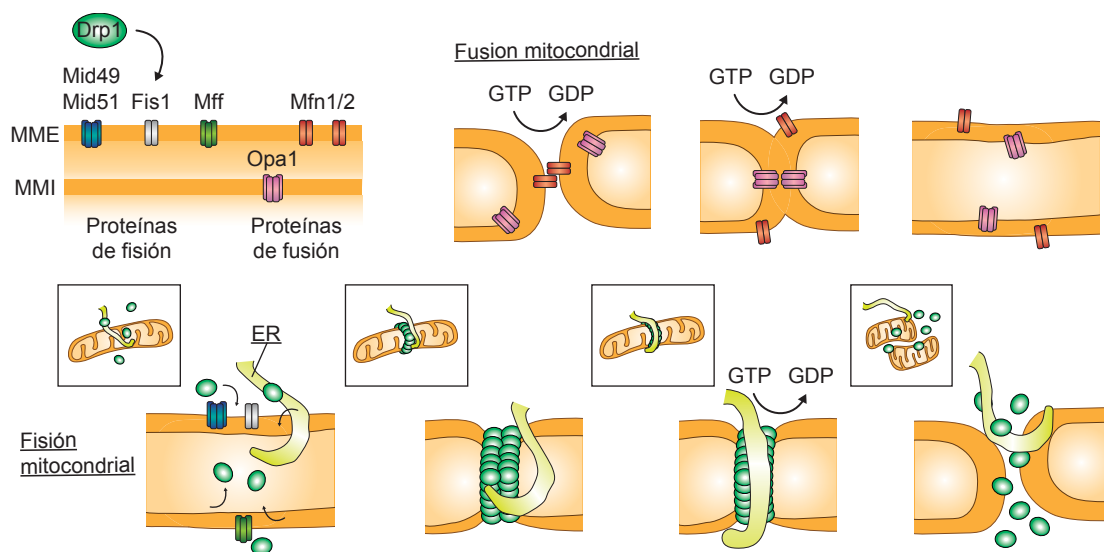


Figura 11. Fusión y fisión mitocondrial. En la fusión mitocondrial las proteínas Mfn1 y Mfn2 dirigen el contacto y la unión de la MME. Opa1 se encarga de fusionar la MMI en cooperación con las dos proteínas anteriores. La fisión mitocondrial está dirigida por 1) el contacto mitocondria-ER, 2) el reclutamiento de Drp1 por las proteínas adaptadoras Fis1, Mff, Mid49 y Mid51, 3) la oligomerización de Drp1 y 4) la contracción del anillo. Ambos procesos están orquestados por proteínas de la familia de las dinaminas (Mfn1, Mfn2, Opa1 y Drp1) y consumen energía en forma de GTP.

Además de las proteínas efectoras (Drp1) y adaptadoras (Fis1, Mff, Mid49 y Mid51), en la fisión mitocondrial existen también proteínas accesorias, como por

ejemplo, la proteína 1 asociada a la diferenciación inducida por gangliósidos o Gdap1 (del inglés, *ganglioside-induced differentiation associated protein 1*), que, si bien su defecto afecta a la fragmentación mitocondrial (Lopez Del Amo et al., 2015; Niemann et al., 2005), parece no ser capaz de reclutar a Drp1 directamente (Niemann et al., 2009). Ha sido descrito que Gdap1 participa en los contactos mitocondria-ER (Pla-Martin et al., 2013), por lo que podría jugar un papel activo en la fisión mitocondrial favoreciendo estas interacciones.

3.3. Regulación de las proteínas de dinámica mitocondrial

La regulación sobre la fusión mitocondrial está controlada básicamente a través de la expresión de *Mfn1* y *Mfn2*. Ambas proteínas, llegado el momento, pueden ser ubiquitinizadas por la proteína ligasa de ubiquitina Parkina y degradadas por el proteasoma, reduciendo así la fusión mitocondrial (Chan et al., 2011; Tanaka et al., 2010). Opa1 está regulada por escisión proteolítica. En condiciones normales pueden existir 6 formas distintas de Opa1 atendiendo al tipo de escisión proteolítica. Se sabe que las variaciones en el patrón de Opa1 implica cambios sobre la dinámica de las mitocondrias, sin embargo, todavía se desconoce el motivo (van der Blik et al., 2013). Recientemente, se ha descrito que la quinasa de proteínas Erk1/2 fosforila a Mfn1, inhibiendo su capacidad para promover la fusión mitocondrial (Pyakurel et al., 2015).

Mff ha sido identificado como diana de la quinasa de proteínas activada por AMP o Ampk (del inglés, *AMP-activated protein kinase*). Este tipo de fosforilación sobre Mff induce la fragmentación de mitocondrias disfuncionales (Toyama et al., 2016); sin embargo, se conoce muy poco sobre la regulación de las proteínas adaptadoras.

Drp1 es la proteína de dinámica mitocondrial que está sometida a una mayor regulación. Drp1 es diana de multitud de modificaciones post-traduccionales que afectan a su función: fosforilación, ubiquitinización, sumoilación (Wasiak et al., 2007) y nitrosilación (Cho et al., 2009). Multitud de diferentes quinasas de proteínas regulan la función de Drp1 a través de la fosforilación de diferentes residuos. Hasta la fecha, sólo tres residuos de Drp1 identificados como diana de quinasas tienen una función aparente: la serina 579 o Ser579 (serina 616 en humanos), la serina 600 o Ser600 (serina 637 en humanos) y la serina 656 o Ser656 (serina 693 en humanos)³. Estos tres residuos se encuentran bien sobre el dominio variable, zona de unión a los adaptadores, bien sobre el dominio GED de la proteína, zona de oligomerización

³ El número de los residuos varía según la especie y la isoforma de Drp1 utilizada. En este trabajo de tesis doctoral se hace referencia siempre a la isoforma 2 de Drp1 de la especie *Mus musculus*.

(Mears et al., 2011). Cualquier modificación sobre ellos afecta, pues, a los contactos proteína-proteína y, por lo tanto, a su reclutamiento mitocondrial. En cuanto a su función, la fosforilación sobre la Ser579 induce fisión mitocondrial, mientras que la fosforilación sobre la Ser656 induce fusión mitocondrial. Existe cierta controversia sobre el residuo Ser600, dado que su fosforilación ha sido descrita como inductor de ambos procesos, fusión y fisión mitocondrial, dependiendo del contexto celular.

La Ser579 es fosforilada por la quinasa de proteínas 1 dependiente de ciclinas o Cdk1 (del inglés, *cyclin-dependent kinase 1*) en la fase G2/M del ciclo celular (Taguchi et al., 2007), para garantizar un correcto reparto de estos orgánulos durante la división celular; la quinasa de proteínas 5 dependiente de ciclinas o CDK5 (del inglés, *cyclin-dependent kinase 5*), durante el proceso de tumorigénesis cerebral (Xie et al., 2015); ERK1/2, para favorecer la proliferación ante estímulos externos (Kashatus et al., 2015; Serasinghe et al., 2015); o la quinasa de proteínas Cδ o Pkcδ (del inglés, *protein kinase C delta*), ante situaciones de estrés oxidativo (Qi et al., 2011). Estas quinasas inducen fisión mitocondrial (Fig. 12).

La Ser656 es fosforilada por GSK3β, en respuesta a estímulos de estrés oxidativo, como mecanismo de supervivencia. Esta quinasa induce fusión mitocondrial (Chou et al., 2012) (Fig. 12).

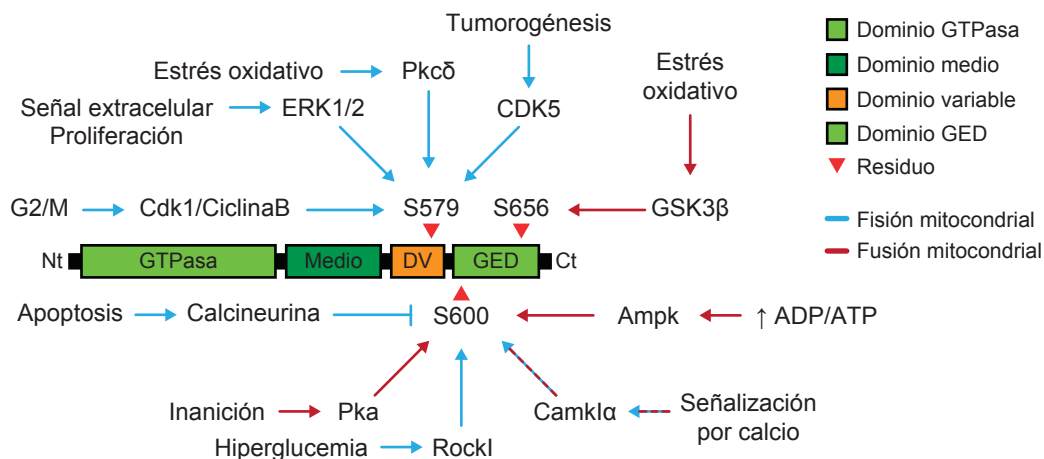


Figura 12. Regulación de Drp1 por fosforilación. La fosforilación de la Ser579 induce fisión mitocondrial y el residuo es fosforilado por Cdk1, CDK5, ERK1/2 y Pkcδ. La fosforilación de la Ser656 induce fusión mitocondrial y el residuo es fosforilado por GSK3β. La fosforilación de la Ser600 por Pka y Ampk induce fusión mitocondrial. Su desfosforilación por la Calcineurina induce fisión mitocondrial. La fosforilación de la Ser600 por Rock1 induce fisión mitocondrial. La Camk1α ha sido descrita como inductora de ambos procesos, fisión y fusión mitocondrial, al fosforilar a la Ser600. Las flechas rojas y azules indican la inducción de fusión o fisión mitocondrial, respectivamente.

La Ser600 se fosforila por la quinasa de proteínas A o Pka (del inglés, *protein kinase A*), ante situaciones de inanición (Chang and Blackstone, 2007; Cribbs and Strack, 2007; Gomes et al., 2011); o Ampk, ante situaciones de demanda energética (Wikstrom et al., 2013). Estas quinasas inducen fisión mitocondrial. La fosfatasa de proteínas Calcineurina suele actuar en sentido opuesto a Pka, desfosforilando a la Ser600 e induciendo fisión mitocondrial (Cereghetti et al., 2008; Cribbs and Strack, 2007). La Ser600 también es fosforilada por la quinasa de proteínas I asociada a Rho o Rock1 (del inglés, *Rho-associated protein kinase I*), ante estados de hiperglucemia, induciendo, en este caso, fisión mitocondrial (Wang et al., 2012). La quinasa de proteínas α dependiente de calcio/Calmodulina o Camk α (del inglés, *calcium/Calmodulin-dependent protein kinase α*) también ha sido descrita como inductora de fisión (Xie et al., 2015) y fisión mitocondrial (Han et al., 2008) mediante la fosforilación de la Ser600 (Fig. 12).

Drp1 es susceptible de ser ubiquitinizada por las ligasas de ubiquitina E3 March5 (Nakamura et al., 2006; Yonashiro et al., 2006) y Parkina (Wang et al., 2011a). Mientras que la ubiquitinización por Parkina etiqueta a Drp1 para ser degradada por el proteasoma, la función de su modificación por March5 todavía es controvertida.

La ausencia de Drp1 es letal durante el desarrollo embrionario (Ishihara et al., 2009). Sin embargo, pese al aparente papel central que juega Drp1 en la fisión mitocondrial, se ha conseguido obtener fibroblastos de ratones *Drp1^{-/-}*. El cultivo *in vitro* de estas células ha puesto de manifiesto que Drp1 no es esencial para la proliferación celular, aunque las células *Drp1^{-/-}* proliferan más lentamente que las homónimas de tipo silvestre y presentan una morfología mitocondrial completamente tubular (Ishihara et al., 2009; Wakabayashi et al., 2009). De hecho, el silenciamiento de *Drp1* puede llegar a causar arresto en la fase G2/M del ciclo celular en líneas humanas transformadas (Qian et al., 2012). Se ha sugerido que el reparto de mitocondrias durante la citocinesis en ausencia de Drp1 pueda llevarse a cabo mediante la participación de alguna fuerza mecánica de escisión desconocida (Ishihara et al., 2009).

3.4. Dinámica mitocondrial en células pluripotentes

Dado que es el oocito el que aporta las mitocondrias al cigoto durante la fecundación, todos estos orgánulos son de herencia materna. Durante la primera fase del desarrollo embrionario su número permanece relativamente constante. La biogénesis mitocondrial y la replicación del mtDNA no se activan durante estos

estadios, de modo que la carga mitocondrial se va repartiendo entre las células hijas en cada división celular (Van Blerkom, 2009). Así, la carga mitocondrial ha de ser suficiente para satisfacer los requerimientos energéticos de los blastómeros durante las sucesivas divisiones celulares. Las células durante estas fases del desarrollo embrionario, y por extensión las ESC, tienden a tener una red mitocondrial simple: morfología fragmentada, crestas internas poco desarrolladas (plegamientos de la MMI) y un bajo número de copias de mtDNA. Contrariamente, la red mitocondrial de células somáticas presenta una estructura más compleja que la de células pluripotentes: una morfología tubular y/o ramificada, crestas internas bien desarrolladas y una densa matriz mitocondrial con alto número de copias de mtDNA (Folmes et al., 2011; Prigione et al., 2010; St John et al., 2005; Suhr et al., 2010; Van Blerkom, 2009). Durante la diferenciación, la masa mitocondrial aumenta, las mitocondrias maduran en tamaño y complejidad interna, y el mtDNA incrementa su replicación (Cho et al., 2006; Facucho-Oliveira et al., 2007; Spikings et al., 2007). Así, por ejemplo, una correcta diferenciación hacia cardiomiocitos (Chung et al., 2007; Hom et al., 2011) o adipocitos (Tormos et al., 2011) es dependiente de la maduración mitocondrial. En este proceso de maduración mitocondrial la fusión mitocondrial juega un importante papel a través de Mfn2 y Opa1 (Kasahara et al., 2013).

La baja tasa de replicación del mtDNA en las ESC parece estar relacionada con el silenciamiento por metilación de los genes que codifican para la subunidad catalítica y de la polimerasa de DNA mitocondrial (Kelly et al., 2012) y el factor transcripcional mitocondrial A (Larsson et al., 1998). Su desmetilación tras la implantación del embrión activa su expresión, y por ende, incrementa la replicación del mtDNA.

A pesar de los profundos cambios que experimenta la red mitocondrial durante la diferenciación celular, poco se sabe acerca de la regulación de la dinámica mitocondrial en ESC. Curiosamente, se ha descrito que la sobreexpresión de Drp1 en ESC puede afectar a la pluripotencia e inducir apoptosis (Todd et al., 2010), sugiriendo que, pese a que las ESC presentan una morfología mitocondrial fragmentada, un adecuado balance de fusión-fisión sigue siendo necesario para el correcto mantenimiento de una población mitocondrial homogénea y funcional. Por ejemplo, en células madre neurales la dinámica mitocondrial está aparentemente desplazada hacia la fusión mitocondrial en lugar de la fisión, donde Mfn2 y Opa1 juegan un papel fundamental en su autorrenovación (Khacho et al., 2016).

Contrariamente al proceso de diferenciación, se ha sugerido que la dinámica mitocondrial durante el proceso de reprogramación celular sigue el proceso inverso: una fragmentación y rejuvenecimiento de las mitocondrias (Prigione and Adjaye, 2010;

Suhr et al., 2010), su inactivación como orgánulo productor de energía (Choi et al., 2015; Folmes et al., 2011) y un descenso de la replicación del mtDNA (Kelly et al., 2013). Dado el importante cambio morfológico de las mitocondrias que tiene lugar durante la reprogramación, de una red mitocondrial tubular a una fragmentada, la fisión mitocondrial a través de Drp1 ha sido sugerida como una barrera para el proceso (Son et al., 2015; Son et al., 2013b; Vazquez-Martin et al., 2012a). Sin embargo, el proceso en sí mismo, su regulación, y su importancia en el estado de ESC todavía no han sido descritos.

Algunos trabajos han asignado un papel importante a la fisión mitocondrial en las células cancerosas (Boland et al., 2013). Al igual que en la reprogramación celular, algunos procesos de transformación celular implican una transición de mesénquima a epitelio (De Craene and Berx, 2013; Pattabiraman et al., 2016) asociada a un cambio en la morfología de las mitocondrias, de tubulares a fragmentadas. La inhibición de la fisión mitocondrial afecta, pues, a esta transformación celular (Rehman et al., 2012; Zhao et al., 2013). En este sentido, la fosforilación y desfosforilación de los residuos Ser579 y Ser600 de Drp1, respectivamente, parece ser un paso clave para el inicio y progresión de algunos procesos tumorogénicos. (Kashatus et al., 2015; Serasinghe et al., 2015; Xie et al., 2015). Estos trabajos previos refuerzan la hipótesis de que la reorganización de la dinámica mitocondrial pueda ser un paso clave durante la reprogramación celular.

4. Pluripotencia celular y metabolismo

4.1. Metabolismo durante el desarrollo embrionario

Durante la primera fase del desarrollo embrionario, desde el cigoto hasta el comienzo de la diferenciación celular tras la implantación del embrión, tiene lugar una profunda reorganización del metabolismo celular. Durante el estado de una célula, la obtención de energía se produce fundamentalmente a través de la oxidación del piruvato, en lugar de la glucosa. De hecho, se han detectado altas cantidades de este sustrato en el fluido del tracto reproductivo (Johnson et al., 2003). Los dos primeros días de desarrollo se caracterizan por una baja actividad metabólica debido a que no se produce un aumento considerable de biomasa; simplemente, se produce un reparto de los componentes originales del cigoto, como ocurría con la masa mitocondrial. A partir de este punto, la captación de glucosa comienza a sustituir a la del piruvato. Paulatinamente, la producción de energía a partir de la glucosa va cambiando, realizándose a través de la fosforilación oxidativa, primero, y a través de la glucólisis

aerobia, después. En paralelo, se produce un aumento sustancial de la actividad de la ruta de las pentosas fosfato. Esta dinámica alcanza su punto álgido en el momento de la implantación, donde la glucólisis es la principal ruta para la obtención de la energía. La expresión de los transportadores de glucosa y enzimas glucolíticos aumenta en este punto, y su mutación es letal para el desarrollo de los blastocistos (Shyh-Chang et al., 2013). La dependencia de la glucólisis en este punto puede ser debida a una concentración de oxígeno insuficiente para garantizar una eficiente cadena de transporte electrónico en el epiblasto durante la implantación. A partir de este punto, y con el comienzo de la diferenciación, la actividad de la fosforilación oxidativa aumenta, siendo ésta la principal fuente de ATP en las células somáticas (Johnson et al., 2003). Hasta el momento de la implantación, la cantidad de ATP es relativamente baja dentro de las células. Esta baja cantidad se corresponde con una reducida masa mitocondrial y un bajo número de copias de mtDNA (St John et al., 2005; Van Blerkom et al., 2000). Una vez comienza la gastrulación, las mitocondrias se fusionan y maduran, el mtDNA aumenta, la OXPHOS se incrementa, y la cantidad de ATP se eleva considerablemente (Lonergan et al., 2006; Mandal et al., 2011; Spikings et al., 2007). Así, por ejemplo, la maduración mitocondrial que tiene lugar durante la diferenciación hacia cardiomiocitos (Chung et al., 2007; Hom et al., 2011) o adipocitos (Tormos et al., 2011) va acompañada de un incremento de la OXPHOS (Fig. 13).

Históricamente, los dramáticos cambios que sufren las mitocondrias en su morfología durante el desarrollo embrionario o la diferenciación *in vitro* se han asociado a un proceso de maduración arquitectónica de estos orgánulos. Esta maduración permitiría implementar una eficiente fosforilación oxidativa en células diferenciadas, garantizando un aporte energético suficiente (Fig. 13). En este sentido, existen numerosos trabajos en los que se describe una correlación entre una morfología mitocondrial madura y tubular con un aumento de la fosforilación oxidativa, y entre una morfología mitocondrial fragmentada e inmadura con un descenso de ésta y un aumento de la glucólisis (Mishra and Chan, 2016). En este sentido, las mitocondrias tubulares garantizarían 1) un mejor mantenimiento del potencial de membrana, 2) una población del mtDNA más homogénea, y 3) una adecuada citoarquitectura que garantice una cadena de transporte electrónico eficiente. Sin embargo, tanto las células de estadios embrionarios tempranos (Johnson et al., 2003; Van Blerkom, 2009) como las ESC (Birket et al., 2011; Zhang et al., 2011; Zhou et al., 2012) presentan mitocondrias fragmentadas con una capacidad oxidativa similar a la de las células somáticas. Así, es posible que una dotación mitocondrial fragmentada pero con una dinámica de fisión-fusión constante pueda mantener una mayor funcionalidad de estos orgánulos en ESC.

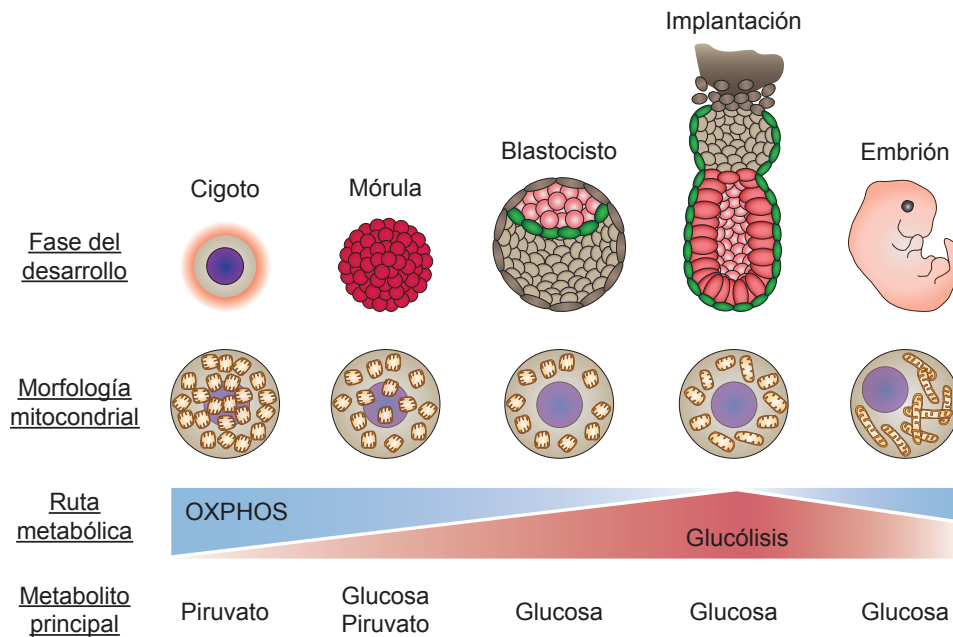


Figura 13. Dinámica mitocondrial y metabolismo durante el desarrollo embrionario murino. Tras la fecundación, el cigoto consume piruvato para producir energía a través de la fosforilación oxidativa. A partir de este punto, la glucosa comienza a sustituir al piruvato, como principal fuente de energía, y la glucólisis aerobia a la OXPHOS, como principal ruta metabólica. Esta dinámica alcanza su punto álgido en el momento de la implantación, donde la glucólisis es la principal ruta para la obtención de la energía. Durante las primeras fases del desarrollo, se produce un reparto del contenido mitocondrial original y su morfología es inmadura y fragmentada. Con el comienzo de la diferenciación, se activa la biogénesis y la maduración mitocondrial, las mitocondrias aumentan sus crestas y adoptan una morfología tubular, y la OXPHOS comienza a activarse para convertirse en la principal ruta metabólica de la mayoría de las células somáticas. Adaptado de Folmes et al., 2012.

4.2. Metabolismo en células proliferativas: ESC y CSC

El metabolismo de las células que proliferan es muy diferente al de las células que no lo hacen. Las células con una alta tasa de proliferación suelen basar su obtención de energía a través de la glucólisis aerobia: conversión de glucosa a lactato en presencia de oxígeno. Las ESC y las células madre del cáncer o CSC (del inglés, *cancer stem cells*) se enmarcan dentro de este tipo particular de células. Este fenotipo metabólico es conocido como efecto Warburg, en honor a su descripción en 1924 por Otto Warburg. Warburg observó que las células cancerosas consumían grandes cantidades de glucosa en comparación a las células somáticas, y que ésta era metabolizada fundamentalmente a través de la glucólisis aerobia en forma de lactato (Warburg, 1956).

Las células necesitan energía, generalmente en forma de ATP, para guiar reacciones no espontáneas y mantener la homeostasis celular: la generación de gradientes iónicos, la dinámica mitocondrial y del citoesqueleto, la reparación del DNA,

la transcripción y traducción basales, el reciclado de proteínas o el tráfico vesicular. Las células proliferativas, además, tienen requerimientos adicionales para el crecimiento y la división celular. Necesitan captar nutrientes, convertirlos en precursores biosintéticos y coordinar la síntesis de las macromoléculas necesarias para la generación de una nueva célula (Lunt and Vander Heiden, 2011). El nutriente por excelencia es la glucosa, que es transformada hasta piruvato por la glucólisis, produciendo durante este proceso 2 moléculas de ATP. El piruvato puede entrar en el ciclo de Krebs mitocondrial para producir una mayor cantidad de ATP a través de la cadena de transporte de electrones (34 moléculas adicionales) o convertirse en lactato en el citosol.

Respecto a su producción neta de ATP, la glucólisis es una ruta menos eficiente que la OXPHOS, sin embargo, en condiciones de alto contenido en glucosa, puede producir ATP más rápidamente (Guppy et al., 1993). Históricamente, se pensaba que el efecto Warburg se producía debido a la situación de hipoxia en la que se encuentran las células cancerosas o a defectos en la respiración mitocondrial de estas células. Sin embargo, esto parece no ser así. Se ha descrito que las mitocondrias de células que presentan efecto Warburg como ESC (Birket et al., 2011; Zhang et al., 2011; Zhou et al., 2012), CSC (Zu and Guppy, 2004) o linfocitos primarios (DeBerardinis et al., 2008) son perfectamente funcionales. De hecho, la contribución de la glucólisis a la producción de ATP en líneas tumorales oscila entre un 0,34% y un 64% (Zu and Guppy, 2004). No obstante, la producción de ATP parece no ser limitante en células proliferativas. Algunas estimaciones sugieren que los procesos biosintéticos para producir una nueva célula no consumen grandes cantidades de ATP (Lunt and Vander Heiden, 2011). Células como las ESC o las CSC sólo consumen energía para proliferar, mientras que las células somáticas deben realizar una función concreta en el organismo. Estas funciones celulares especializadas, como la síntesis de hormonas o la transmisión del impulso nervioso, pueden resultar más complejas por lo que sí que podrían requerir grandes cantidades de energía (Lunt and Vander Heiden, 2011).

La mayor producción de lactato no se debería, pues, a una inactivación del ciclo de Krebs o la OXPHOS, sino a una hiperactivación de la glucólisis. La alta tasa de producción del piruvato a través de esta ruta sería inasumible por parte del ciclo de Krebs: el piruvato es transportado a la mitocondria y convertido en acetil-CoA mediante la deshidrogenasa del piruvato o Pdh (del inglés, *pyruvate dehydrogenase*). Pdh es una compleja enzima multimérica cuya actividad es susceptible de regulación por fosforilación, acetil-CoA libre y la ratio NAD^+/NADH . En estas circunstancias, el flujo a través de la glucólisis y, por tanto, la cantidad de piruvato producido, pueden exceder

la capacidad de Pdh (Curi et al., 1988). La conversión de este exceso de piruvato en lactato garantiza la hiperactivación de la glucólisis (Fig. 14). Esta conversión favorece también la renovación del NAD⁺, el cual es necesario para el funcionamiento de la glucólisis y el ciclo de Krebs (Lunt and Vander Heiden, 2011). En este sentido, dado que algunas enzimas clave de la glucólisis, como la fosfofructoquinasa, son inhibidas por ATP, se ha llegado a describir procesos centrados únicamente en consumir ATP para mantener, así, una glucólisis hiperactiva (Fang et al., 2010) (Fig. 14).

La idea es, pues, que las células proliferativas deben mantener una alta actividad glucolítica, y no exclusivamente por razones energéticas. El motivo radica en el hecho de que la glucólisis es crucial para proporcionar intermediarios de rutas biosintéticas o anabólicas (DeBerardinis et al., 2008). Algunos metabolitos de la glucólisis que son intermediarios de este tipo de rutas son: 1) la glucosa-6-fosfato, que entra en la ruta de las pentosas fosfato para garantizar la biosíntesis de los nucleótidos necesarios para la replicación del DNA y aportar poder reductor en forma de NADPH para las rutas biosintéticas; 2) la fructosa-6-fosfato y el gliceraldehído-3-fosfato, que también pueden entrar y salir de la ruta de las pentosas fosfato; 3) la dihidroxiacetona fosfato, que es crucial en la biosíntesis de fosfolípidos y triacilgliceroles, los mayores componentes de las membranas celulares; 4) el 3-fosfoglicerato, que participa en la síntesis de aminoácidos como la glicina, la cisteína o la serina, o de fosfolípidos a través de la propia serina; o 5) el piruvato, que puede ser convertido a alanina o entrar en la biosíntesis de ácidos grasos a través de su conversión en citrato en la mitocondria (Fig. 14).

En condiciones de una alta proliferación celular, el ciclo de Krebs no sólo posee función energética, proveyendo poder reductor a la cadena de transporte electrónico, sino que también aporta intermediarios a otras rutas anabólicas. Se conoce como cataplerosis el continuo flujo de estos metabolitos desde el ciclo de Krebs hacia otras rutas biosintéticas (DeBerardinis et al., 2008). Una de las rutas biosintéticas más importantes para las células proliferativas es la biosíntesis de ácidos grasos. Los ácidos grasos son necesarios para la biosíntesis de las membranas celulares. La síntesis de ácidos grasos se produce a partir de acetil-CoA. El acetil-CoA se transporta de la mitocondria al citoplasma en forma de citrato, allí es convertido de nuevo en acetil-CoA mediante la liasa de ATP-citrato o Acl_y (del inglés, *ATP citrate lyase*). Si bien la glucólisis no participa directamente en la producción de este intermediario, tanto las ESC (Knobloch et al., 2013; Vazquez-Martin et al., 2013) como las CSC (Menendez and Lupu, 2007) presentan una expresión elevada de los genes que codifican para las enzimas carboxilasa del acetil-CoA o Acc (del inglés, *acetyl-CoA carboxylase*) y la

sintasa de ácidos grasos o Fasn (del inglés, *fatty acid synthase*), cruciales en esta ruta biosintética. La inhibición química o mediante RNA de interferencia de Acly, Acc o Fasn reduce drásticamente la proliferación y supervivencia de células tumorales *in vitro* (Menendez and Lupu, 2007) (Fig. 14).

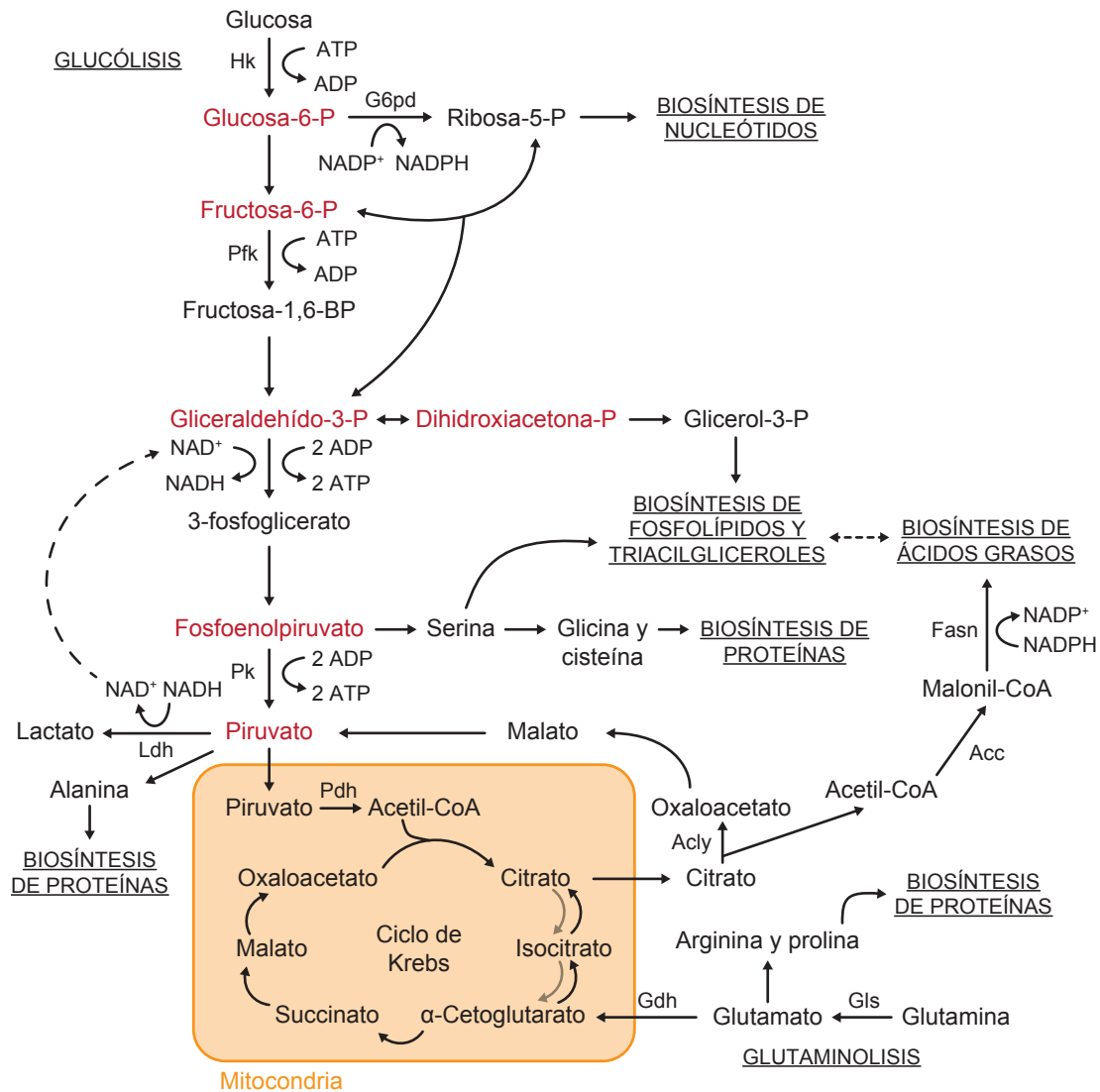


Figura 14. Relación de rutas metabólicas en células proliferativas. Las células proliferativas mantienen una alta tasa glucolítica, y no exclusivamente por razones energéticas: la glucólisis es crucial para proporcionar intermediarios de algunas rutas anabólicas para favorecer la biosíntesis de nucleótidos, membranas y proteínas. Los sustratos marcados en rojo corresponden a aquellos metabolitos de la glucólisis que actúan como intermediarios de otras rutas biosintéticas. Se muestran algunos de los enzimas clave para el cambio metabólico que sufren estas células: Acc, carboxilasa del acetil-CoA; Acly, liasa de ATP-citrato; G6pd, deshidrogenasa de la glucosa-6-fosfato; Glud, deshidrogenasa del glutamato; Gls, glutaminasa; Fasn, sintasa de ácidos grasos; Hk, hexoquinasa; Ldh, deshidrogenasa del lactato; Pdh, deshidrogenasa del piruvato; Pfk, fosfofructoquinasa; Pk, quinasa del piruvato.

La depleción de acetil-CoA del ciclo de Krebs para la biosíntesis de ácidos grasos hace que rutas como la glutaminólisis jueguen un papel crucial en el metabolismo de este tipo de células. La glutaminólisis es una ruta anapletórica que garantiza el correcto funcionamiento del ciclo de Krebs en ausencia de algunos intermediarios del ciclo. El funcionamiento del ciclo de Krebs en células proliferativas es importante dado que diversos metabolitos de éste participan como intermediarios en otras rutas biosintéticas (Lunt and Vander Heiden, 2011) (Fig. 14).

En general, este tipo de células poseen un programa transcripcional tal que asegura una alta expresión de las enzimas y/o transportadores que participan en la glucólisis para favorecer la acumulación de los intermediarios que entran en las rutas anabólicas. Esta acumulación de intermediarios garantiza una alta tasa de producción de estas rutas biosintéticas. La acumulación de lactato es, pues, la consecuencia de esta premisa metabólica (Lunt and Vander Heiden, 2011) (Fig. 14).

Las ESC, además de otros tipos de células madre, encajan, pues, en esta descripción, presentando un metabolismo fundamentalmente glucolítico (Shyh-Chang et al., 2013). La glucólisis y su relación con el resto de rutas anabólicas juegan un papel tan importante que su regulación afecta al grado de pluripotencia de estas células. Así, se ha descrito que la estimulación de la glucólisis en células pluripotentes mediante condiciones de hipoxia (Ezashi et al., 2005; Mohyeldin et al., 2010), la inhibición de la OXPHOS (Varum et al., 2009) o la adición de insulina (Chen et al., 2011a) favorecen su autorrenovación. De hecho, el núcleo de control de la pluripotencia Oct4, Sox2 y Nanog, comparte multitud de *loci* de unión con Stat3, regulador central del cambio metabólico, de OXPHOS a glucólisis (Folmes et al., 2012).

La regulación de las rutas biosintéticas también es importante en ESC. Las ESC deficientes en la deshidrogenasa de la glucosa-6-fosfato o G6pd (del inglés, *glucose-6-phosphate dehydrogenase*), enzima clave de la ruta de las pentosas fosfato, poseen cierta tendencia a diferenciarse hacia endodermo (Manganelli et al., 2012). También ha sido descrito que la inhibición química de esta ruta favorece la diferenciación miogénica (Bracha et al., 2010). La activación de la Fasn en células madre neurales es crucial para garantizar su proliferación y, por tanto, su autorrenovación (Knobloch et al., 2013). Su silenciamiento junto al de la Acc en ESC favorece la pérdida de la pluripotencia y su diferenciación (Vazquez-Martin et al., 2013). La alta tasa de producción de acetil-CoA en ESC parece ser importante también en el mantenimiento del patrón de acetilación de histonas (Moussaieff et al., 2015). Así, la inhibición de la Acly reduce los niveles de acetil-CoA y la acetilación, induciendo diferenciación

miogénica de las ESC (Bracha et al., 2010). Esta depleción del acetil-CoA de la mitocondria genera una dependencia de la glutaminólisis, como ruta anapletórica, en ESC para su supervivencia y mantenimiento de la pluripotencia (Carey et al., 2015; Tohyama et al., 2016).

Curiosamente, existe un estado metabólico dual dentro de la pluripotencia celular. A diferencia de las ESC en el estado condicionado, que son fundamentalmente glucolíticas, las ESC en el estado naíf presentan una cierta actividad OXPHOS (Zhou et al., 2012). Este hecho remarca la funcionalidad de las mitocondrias de estas células y recuerda al desarrollo embrionario: el punto álgido de la glucólisis se alcanza durante la implantación, no en la ICM. Este cambio metabólico está dirigido por el factor 1 inducible por hipoxia o Hif1 (del inglés, *hypoxia inducible factor 1*) que durante la transición celular reduce la expresión de los complejos de la cadena de transporte electrónico y activa la expresión de la deshidrogenasa del lactato o *Ldh* (del inglés, *lactate dehydrogenase*) o la quinasa de la deshidrogenasa del piruvato o *Pdk* (del inglés, *pyruvate dehydrogenase kinase*) (Zhou et al., 2012). Los factores inducibles por hipoxia son unos de los principales factores de transcripción que favorecen la conversión del metabolismo oxidativo al glucolítico, tanto en cáncer (Semenza, 2012) como en el estado pluripotente (Ito and Suda, 2014). Uno de los pasos clave en esta conversión metabólica es la reducción de la actividad de Pdh, la enzima que cataliza la reacción de piruvato a acetil-CoA, favoreciendo su entrada en el ciclo de Krebs. Hif1 activa a Pdk, la cual fosforila a Pdh, reduciendo su actividad (Kim et al., 2006). Se ha descrito una relación de interdependencia entre la expresión de los factores inducibles por hipoxia y el núcleo transcripcional de la pluripotencia: Oct4, Sox2 y Nanog (Teslaa and Teitell, 2015). Además, las ESC humanas en el estado condicionado presentan una alta expresión de la proteína desacoplante 2 o *UCP2* (del inglés, *uncoupling protein 2*), que favorece el transporte retrogrado del piruvato desde la mitocondria al citoplasma, reduciendo la fosforilación oxidativa (Vozza et al., 2014). Esta proteína tiende a silenciarse durante la diferenciación para favorecer la conversión metabólica hacia el estado oxidativo en ESC humanas (Zhang et al., 2011).

El motivo de este cambio metabólico entre el estado naíf-oxidativo y el estado condicionado-glucolítico de las ESC todavía no está claro. La activación de los factores inducibles por hipoxia puede indicar que la concentración de oxígeno no es suficiente como para mantener activa la cadena de transporte electrónico durante la implantación. La baja actividad de la OXPHOS en las ESC reduce los niveles de especies reactivas del oxígeno o ROS (del inglés, *reactive oxygen species*), que aumentan durante la diferenciación (Cho et al., 2006). Una baja cantidad de ROS en

ESC favorecería su estabilidad genómica. Otra posibilidad es que las mitocondrias de las ESC en el estado condicionado estén hiperpolarizadas, dado que el potencial de membrana mitocondrial no es consumido por la ATP sintasa mitocondrial (Armstrong et al., 2010; Chung et al., 2007; Folmes et al., 2011). Esta hiperpolarización actuaría como reservorio de energía para producir grandes cantidades de ATP una vez comienza la diferenciación hacia las tres capas germinales tras la implantación. En este sentido, las ESC con un elevado potencial de membrana mitocondrial poseen una mayor capacidad de formación de teratomas (Schieke et al., 2008).

4.3. Reprogramación metabólica: de la OXPHOS a la glucólisis

Durante el desarrollo embrionario o la diferenciación *in vitro* de las ESC, se produce un cambio metabólico de glucólisis a OXPHOS. Las iPSC, al igual que sus análogas, las ESC, poseen un metabolismo fundamentalmente glucolítico (Folmes et al., 2013; Folmes et al., 2011; Varum et al., 2011). La reprogramación celular, pues, implica el proceso inverso a la diferenciación: una reconversión metabólica desde un estado somático-oxidativo hasta el estado pluripotente-glucolítico. Esta conversión acompaña al cambio en la morfología mitocondrial descrito anteriormente (Folmes et al., 2011; Panopoulos et al., 2012) (Fig. 15).

Durante la reprogramación celular, se han descrito cambios a nivel transcripcional y epigenético para reconfigurar el metabolismo de la glucosa. Esto incluye la activación de la expresión en iPSC de genes que participan en diferentes etapas de la glucólisis o la ruta de las pentosas fosfato (Prigione et al., 2011; Varum et al., 2011). La activación de la glucólisis junto a la inhibición de la OXPHOS va acompañada de una hiperpolarización de las mitocondrias en las células, como ocurre en las ESC en el estado condicionado (Folmes et al., 2011). Así, células que presentan una mayor capacidad glucolítica y menor capacidad oxidativa son más propensas a la reprogramación celular (Panopoulos et al., 2012). En ese sentido, la inducción de la glucólisis mediante compuestos químicos (Zhu et al., 2010), condiciones de hipoxia (Yoshida et al., 2009), la inhibición de p53 (Krizhanovsky and Lowe, 2009) o la adición de intermediarios de la glucólisis (Folmes et al., 2012) aumentan la reprogramación celular, mientras que su inhibición o la activación de la OXPHOS la reducen (Folmes et al., 2011; Son et al., 2013a; Zhu et al., 2010). Al igual que en el mantenimiento de la pluripotencia, los factores inducibles por hipoxia son cruciales en el cambio metabólico de la OXPHOS a la glucólisis durante la primera fase de la reprogramación celular,

activando la expresión de *Pdk* y la quinasa del piruvato o *Pk* (del inglés, *pyruvate kinase*) (Mathieu et al., 2014; Prigione et al., 2014).

Análisis transcriptómicos (Buganim et al., 2012; Polo et al., 2012) y proteómicos (Hansson et al., 2012) han detectado cambios en la expresión de proteínas implicadas en esta transición metabólica durante la fase estocástica de la reprogramación, no obstante, muy poco se conoce acerca de los mecanismo celulares y/o moleculares que subyacen a esta transición.

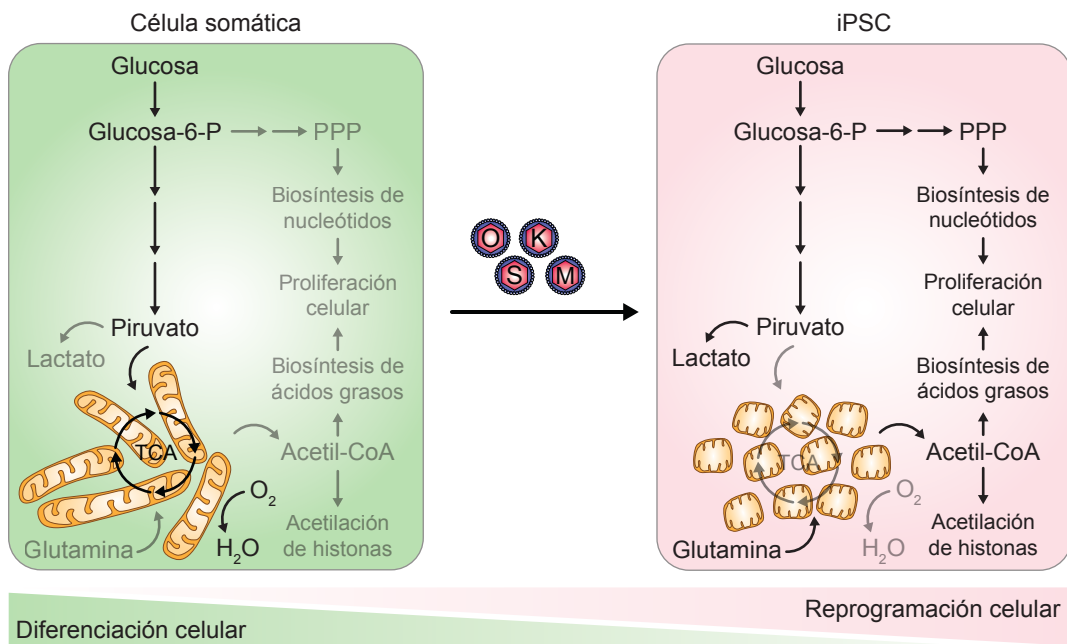


Figura 15. Reversión metabólica y mitocondrial durante la reprogramación celular. La reprogramación celular implica un proceso inverso a la diferenciación: una reversión metabólica desde la OXPHOS hacia la glucólisis. El incremento de la proliferación de las células en reprogramación hace que la activación de la glucólisis y la inhibición de la OXPHOS sea un paso crucial en la acumulación de intermediarios para la rutas biosintéticas. Esta conversión acompaña al cambio en la morfología mitocondrial.

Objetivos

La reprogramación celular es un proceso ineficiente. Durante esta conversión celular, desde el estado somático al estado pluripotente, se produce una profunda transformación del fenotipo celular. Las numerosas barreras celulares y moleculares que deben sortear las células hacen que muchas no alcancen el estado de iPSC. Algunas de las diferencias entre ambos estados son la dinámica mitocondrial y el metabolismo celular: la célula somática tiene que modificar su red mitocondrial, desde una morfología tubular a otra fragmentada, y reconvertir su metabolismo, desde un estado oxidativo a otro glucolítico. Este cambio mitocondrial y metabólico puede ser una barrera más hacia la pluripotencia celular. Su estudio y comprensión no sólo permitirá conocer y controlar mejor el proceso, sino también facilitar y mejorar esta potente técnica para su uso en terapia celular.

Por este motivo, el objetivo general de esta tesis doctoral es el estudio de los mecanismos celulares y moleculares que subyacen al cambio en la dinámica mitocondrial y el metabolismo celular que sufren las células durante la reprogramación celular. Para lograr este propósito, se pretende conseguir los siguientes objetivos particulares:

1. Monitorizar el cambio en la dinámica mitocondrial y el metabolismo en los intermediarios celulares durante las fases estocástica y determinista de la reprogramación celular.
2. Caracterizar los mecanismos moleculares que subyacen a la reconversión mitocondrial y metabólica.
3. Identificar qué proteínas participan en estos mecanismos y su regulación.
4. Analizar el papel de los factores de Yamanaka durante esta reconversión.
5. Determinar la importancia de estos procesos durante la progresión de la reprogramación celular.

Material y métodos

1. Cultivo celular

Todas las líneas celulares, cultivos primarios y ensayos con cultivo celular se cultivaron en un incubador bajo condiciones de esterilidad, a una temperatura de 37 °C y 5% de CO₂. Se trabajó con ellas en una cabina de flujo de bioseguridad de tipo II (Bio II Advance, Teslar).

1.1. Cultivo primario de fibroblastos embrionarios de ratón

Los ratones (*Mus musculus*) utilizados para los cultivos primarios fueron estabulados por géneros y camadas, en ciclos de luz/oscuridad de 12 horas, a una temperatura constante de 20-22 °C, y con una dieta de acceso libre a *pellets* estándar y agua (*ad libitum*). El manejo de los animales y todos los procedimientos experimentales fueron llevados a cabo de acuerdo con la normativa vigente (86/609/EEC y RD1201/2005), siguiendo los protocolos aprobados por el Comité Ético de la Universidad de Valencia y bajo la supervisión de la veterinaria jefe del Servicio de Producción Animal del Campus de Burjassot de la Universidad de Valencia. La cepa de ratones utilizada en todos los ensayos fue C57BL/6J.

Para el cultivo primario de fibroblastos embrionarios de ratón o MEF (del inglés, *mouse embryonic fibroblasts*), hembras gestantes a día 13,5 de gestación fueron sacrificadas por desnucación. Con la ayuda de pinzas, bisturí y tijeras quirúrgicas, se puso al descubierto el abdomen de las ratonas mediante un corte longitudinal desde la zona posteroventral. El útero con los embriones fue extraído cortando el peritoneo con la ayuda de unas tijeras. Se extrajeron los embriones uno a uno. La cabeza, el corazón y las vísceras de los mismos fueron desechados, y el resto del cuerpo sometido a disgregación mecánica mediante el uso de cuchillas. El homogeneizado obtenido se sometió a disgregación enzimática mediante un tratamiento con tripsina/EDTA (Biowest, L0930) a 37 °C durante 10-15 minutos. Tras la incubación, y con la ayuda de una micropipeta, se acabó de disgregar el homogeneizado mecánicamente. Todos los embriones de cada hembra utilizada se disgregaron, mezclaron y cultivaron con medio fresco para evitar la variación entre individuos o sexos. Transcurridos 3-4 días, los cultivos primarios de MEF fueron utilizados o criopreservados (como pase 0). Los MEF utilizados en los ensayos nunca estuvieron por encima de pase 3 y, previamente a su uso, se filtraron a través de un filtro de 30 µm para descartar agregados. El medio de cultivo para el mantenimiento de los MEF fue DMEM (Biowest, L0104) suplementado con FBS 10% (v/v) inactivado por temperatura (55 °C durante 1 hora), L-glutamina 2 mM (Biowest, X0550) y penicilina/estreptomicina 1X (Biowest, L0022).

1.2. Líneas celulares

La línea de células madre embrionarias E14Tg2a (Hooper et al., 1987) fue un obsequio del Dr. Austin Smith (Wellcome Trust-Medical Research Council Cambridge Stem Cell Institute, University of Cambridge, Cambridge, UK) y utilizada en todo momento como control de pluripotencia en los experimentos así indicados (ESC). El medio de cultivo para el mantenimiento de las células E14Tg2a fue DMEM (Biowest, L0104) suplementado con FBS 10% (v/v) testado para pluripotencia, L-glutamina 2 mM (Biowest, X0550), penicilina/estreptomicina 1X (Biowest, L0022), aminoácidos no esenciales 1X (Biowest, X0557), piruvato sódico 1 mM (Biowest, L0642), β -mercaptoetanol 0,1 mM, y hLIF para el cultivo en el estado condicionado; o una mezcla 1:1 de DMEM-F12 (Biowest, L0090) y Neurobasal (Thermo Fisher Scientific, 21103049) suplementada con L-glutamina 2 mM (Biowest, X0550), penicilina/estreptomicina 1X (Biowest, L0022), aminoácidos no esenciales 1X (Biowest, X0557), piruvato sódico 1 mM (Biowest, L0642), bicarbonato sódico 0,1% (v/v) (Biowest, L0680), suplemento B27 0,5X (Thermo Fisher Scientific, 12587010), solución de hormonas 0,5X, β -mercaptoetanol 0,1 mM, hLIF, inhibidor de Mek1/2 PD0325901 1 μ M (Stemgent, 04-0006) e inhibidor de Gsk3 CHIR99021 3 μ M (Stemgent, 04-0004) para el cultivo en el estado naíf (Ying et al., 2008). La solución de hormonas 10X consiste en DMEM-F12 (Biowest, X0550) suplementado con D(+)-glucosa 6 mg/ml, bicarbonato sódico 1 mg/ml (Biowest, L0680), tampón HEPES 5 mM (Biowest, L0180), insulina 50 μ g/ml (Sigma-Aldrich, I1882), apo-transferrina 1 mg/ml (Sigma-Aldrich, T1147), progesterona 60 ng/ml (Sigma-Aldrich, P8783), putrescina 160 μ g/ml (Sigma-Aldrich, P5780), selenito de sodio 0,3 μ M (Sigma-Aldrich, S5261) y albúmina de suero bovino o BSA (del inglés, *bovine serum albumin*) 0,5 mg/ml (Thermo Fisher Scientific, 15260037).

La línea de células madre embrionarias CCE1.19 fue un obsequio del Dr. Max Gassmann (University of Zurich, Zurich, Switzerland) (Gassmann et al., 1995) y utilizada para la expresión y mantenimiento de la construcción pPYCAG-IP-Flag-*Drp1* en el análisis de las modificaciones post-traduccionales de Drp1. La línea celular CCE1.19 contiene el gen del antígeno T grande del virus SV40, permitiendo el mantenimiento de vectores exógenos que contengan orígenes de replicación del virus SV40 como episomas. El medio de cultivo para el mantenimiento de las células CCE1.19 fue el mismo que para la línea E14Tg2a en el estado condicionado con neomicina 200 μ g/ml (Sigma-Aldrich, N1142).

Las líneas de células madre pluripotentes inducidas fueron obtenidas en el laboratorio siguiendo el protocolo estándar de Yamanaka (Takahashi et al., 2007a) a

partir de MEF con fondo genético C57BL/6J. Las líneas fueron establecidas a partir del aislamiento de las colonias generadas a día 25-30 del proceso y caracterizadas molecular y funcionalmente. Las líneas que pasaron los test de calidad (ver más adelante) fueron utilizadas como control de pluripotencia en los experimentos así indicados (iPSC). Los medios de cultivo utilizados fueron los mismos que para la línea E14Tg2a previamente descritos.

La línea celular SNL fue obtenida de Cell Biolabs (CBA-316) y utilizada como capa de soporte trófico para las iPSC durante los ensayos de reprogramación celular. Las células SNL fueron derivadas a partir de la línea celular STO al introducir el gen de resistencia a neomicina y el gen que codifica para hLIF (McMahon and Bradley, 1990). El medio de cultivo para el mantenimiento de las células SNL fue DMEM (Biowest, L0104) suplementado con FBS 10% (v/v) inactivado por temperatura (55 °C durante 1 hora), L-glutamina 2 mM (Biowest, X0550) y penicilina/estreptomicina 1X (Biowest, L0022).

La línea celular Platinum-E o Plat-E fue obtenida de Cell Biolabs (RV-101) y utilizada para la generación de retrovirus ecotrópicos. Las células Plat-E contienen los genes *gag*, *pol* y *env* que codifican para las estructuras proteicas retrovirales (Morita et al., 2000). El medio de cultivo para el mantenimiento de las células Plat-E fue DMEM (Biowest, L0104) suplementado con FBS 10% (v/v) inactivado por temperatura (55 °C durante 1 hora), L-glutamina 2 mM (Biowest, X0550), penicilina/estreptomicina 1X (Biowest, L0022), puromicina 1 µg/ml (Sigma-Aldrich, P8833) y blasticidina-S 10 µg/ml (Sigma-Aldrich, 15205).

2. Plásmidos y esiRNA

Las construcciones retrovirales pMXs-*Oct4* (#13366), pMXs-*Sox2* (#13367), pMXs-*Klf4* (#13370) y pMXs-*c-Myc* (#13375), codificando para las formas murinas de los cuatro factores de Yamanaka utilizados para la reprogramación, fueron obtenidas del banco de plásmidos Addgene. La construcción pcDNA-*Drp1^{WT}* (Addgene, #34706) fue un obsequio del Dr. David Chan (California Institute of Technology, Pasadena, USA). La construcción retroviral pMXs-IP-*Gfp-Lc3b* (Hara et al., 2008) (#38195) también fue obtenida del banco de plásmidos Addgene. El cDNA codificante para la versión de rata de *Dusp6* fue un obsequio del Dr. Rafael Pulido (BioCruces, Hospital Universitario Cruces, Barakaldo, España).

Drp1^{WT} y *Dusp6* fueron subclonados en el vector retroviral pMXiE por PCR convencional (*Phusion High-Fidelity DNA Polymerase*; Thermo Fisher Scientific, F530S). *Drp1^{WT}* etiquetado con el epítipo Flag fue subclonado en pPYCAG-IP mediante el mismo sistema para su expresión en ESC. Los vectores pMXiE y pPYCAG-IP fueron un obsequio de la Dra. Helena Mira (Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España) y el Dr. Austin Smith (Wellcome Trust-Medical Research Council Cambridge Stem Cell Institute, University of Cambridge, Cambridge, UK), respectivamente. pMXiE contiene una secuencia IRES seguida del cDNA de Gfp (del inglés, *green fluorescent protein*), y pPYCAG-IP una secuencia IRES seguida del cDNA del gen de resistencia a la puromicina.

Los vectores retrovirales pMXiE-*Drp1^{K38A}* y pMXiE-*Drp1^{S579D}* fueron obtenidos por mutagénesis dirigida usando el kit *In-Fusion HD EcoDry* (Clontech, PT5165-1) a partir de pMXiE-*Drp1^{WT}*.

Los siRNA preparados por endoribonucleasas o esiRNA (del inglés, *endoribonuclease-prepared siRNAs*) contra *Gfp* (EHUEGFP), como control, *Drp1* (EMU084221) o *Atpif1* (EMU046561) fueron obtenidos de Sigma-Aldrich.

3. Ensayos *in vitro*

3.1. Transducción con retrovirus

Células Plat-E (Morita et al., 2000) fueron sembradas sobre placas a una densidad de $1,5 \times 10^5$ células/cm² en medio sin puromicina ni blasticidina-S. Al día siguiente, se cambió el medio y las células fueron transfectadas. Para una placa de 100 mm: sobre 1 ml de medio Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific, 31985070) se añadieron 20 µg del DNA retroviral de interés y 60 µL de una disolución estéril de PEI 1 mg/ml (polietilenimina; Polysciences, 23966) para formar los complejos DNA-PEI (relación 1:3). Tras 25 minutos, los complejos se añadieron sobre las células Plat-E gota a gota. Después de 16 horas de incubación, se cambió el medio del cultivo. Al día siguiente, el medio de cultivo que contenía los retrovirus fue recogido, filtrado por un filtro estéril de 0,45 µm, mezclado con polibreno (bromuro de hexadimetrina; Sigma-Aldrich, H9268) a una concentración final de 4 µg/ml, y diluido con medio fresco (de 1:3 a 1:5) antes de añadirlo a las células a transducir. Las células receptoras (MEF) fueron sembradas el día anterior a su transducción a una densidad de $1,5 \times 10^4$ células/cm² en medio para MEF.

3.2. Ensayos de reprogramación celular

Células Plat-E fueron sembradas y transfectadas con los factores retrovirales pMXs-*Oct4*, pMXs-*Sox2*, pMXs-*Klf4* o pMXs-*c-Myc*. El día anterior a la transducción, los MEF fueron sembrados a una densidad de $1,5 \times 10^4$ células/cm² sobre placas gelatinizadas⁴ en medio para MEF. Los retrovirus fueron recogidos, filtrados, mezclados con polibreno y mezclados entre sí a una relación 1:1:1:1 antes de ser añadidos sobre las células. Al día siguiente (día 1), el medio con retrovirus fue sustituido por medio fresco. A partir del día 3-4 de reprogramación, las células fueron cultivadas en medio DMEM (Biowest, L0104) suplementado con FBS 15% (v/v) testado para pluripotencia, L-glutamina 2 mM (Biowest, X0550), penicilina/estreptomicina 1X (Biowest, L0022), aminoácidos no esenciales 1X (Biowest, X0557), piruvato sódico 1 mM (Biowest, L0642), β-mercaptoetanol 0,1 mM y hLIF (Takahashi et al., 2007a). Los ensayos de reprogramación en presencia de un quinto factor (Lc3b, Drp1, Dusp6, etc.) fueron realizados 48 horas después de la transducción del factor indicado.

A los días indicados, las células transducidas fueron sometidas a diferentes tratamientos o ensayos: inmunofluorescencia, análisis de proteínas, transfección con esiRNA, análisis y/o separación por citometría de flujo, microscopía electrónica, análisis por qPCR o análisis de metabolitos (ver más adelante).

Cuando se indique, las condiciones OSK o c-Myc se utilizaron en los diferentes ensayos o procedimientos, pero nunca para reprogramar. La transducción con OSK se realizó a una relación 1:1:1 de los 3 factores. c-Myc se diluyó a una proporción 1:3 con medio fresco.

A los días indicados, las células transducidas fueron tratadas con los diferentes inhibidores: inhibidor de Drp1 Mdivi-1, 50 μM (Merck Millipore, 475856); inhibidor de Mek1/2 PD0325901, 1 μM (Stemgent, 04-0006); inhibidor de Cdk1 RO-3306, 10 μM (Tocris, 4181); inhibidor de Fasn C75, 200 μM (Tocris, 2489); inhibidor de G6pd dehidroepiandrosterona o DHEA, 100 μM (SelleckChem, S2604); o activador de Ampk metformina, 10 mM (Merck Millipore, 317240).

Cuando los ensayos de reprogramación se llevaron a término, las células transducidas con OSKM fueron disgregadas con tripsina/EDTA (Biowest, L0930), resuspendidas y sembradas a una densidad de $2,4 \times 10^3$ células/cm² sobre células SNL ($4,5 \times 10^4$ células/cm²) inactivadas con mitomicina C 4 μg/ml (Sigma-Aldrich,

⁴ Placas tratadas con una disolución estéril de gelatina 0,1% (v/v) (Sigma-Aldrich, G1890) a 37 °C durante 30 minutos como mínimo.

M4287) durante 2-3 horas. Tras 20-25 días de reprogramación, los cultivos fueron sometidos a una tinción de fosfatasa alcalina para determinar la eficiencia de reprogramación o utilizados para aislar colonias de forma individual para su posterior análisis (ver más adelante). El aislamiento de clones de iPSC fue realizado mediante selección *de visu*, atendiendo a la morfología de las colonias. Con la ayuda de una lupa binocular y una aguja hipodérmica, las colonias fueron recogidas de los cultivos e incubadas en 50 µL de tripsina/EDTA (Biowest, L0930) a 37 °C durante 10-15 minutos. Tras la incubación, las células fueron disgregadas con la micropipeta y sembradas sobre placas multipocillo recubiertas de células SNL inactivadas con mitomicina C 4 µg/ml (Sigma-Aldrich, M4287). Los clones supervivientes fueron cultivados con los medios de ESC para el estado condicionado y/o naif, y sometidos a su caracterización molecular y funcional (Fig. 51). Las líneas que pasaron los test de calidad fueron utilizadas como control de pluripotencia en los experimentos así indicados (iPSC).

3.3. Transfección con esiRNA

MEF transducidos con *OSKM* fueron transfectados a día 1 y 3 del proceso. A día 1, el medio con retrovirus fue remplazado por medio fresco y las células fueron transfectadas con Lipofectamina RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific, 13778075), siguiendo las recomendaciones del proveedor. Al día siguiente, el medio fue remplazado por medio fresco. A día tres, los MEF transducidos fueron transfectados de forma reversa: las células fueron disgregadas con tripsina/EDTA (Biowest, L0930), resuspendidas y sembradas al mismo tiempo que se repetía el proceso de transfección con Lipofectamina RNAiMAX. A los días indicados, las células fueron utilizadas para los diferentes ensayos: inmunofluorescencia, análisis de mRNA o proteínas, o ensayos de reprogramación celular (ver más adelante).

3.4. Transfección de ESC

Para la expresión constitutiva de Drp1 (pPYCAG-IP-Flag-*Drp1*) en ESC, se realizó una transfección reversa sobre células CCE1.19: las células fueron disgregadas con tripsina/EDTA (Biowest, L0930), resuspendidas y sembradas sobre placas gelatinizadas⁵ a una densidad de 1×10^5 células/cm². Sobre el cultivo se añadió el DNA ($1 \mu\text{g}/10^6$ células) mezclado con Lipofectamina 2000 (Thermo Fisher Scientific,

⁵ Placas tratadas con una disolución estéril de gelatina 0,1% (v/v) (Sigma-Aldrich, G1890) a 37 °C durante 30 minutos como mínimo.

11668027) a una ratio 1:3 en Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific, 31985070). Al día siguiente, se renovó el medio con medio fresco y, 48 horas tras la transfección, se añadió puromicina a una concentración final de 2 µg/ml para seleccionar la población de células que contenían el vector. Cuando el cultivo llegó a la semiconfluencia, se sometió a las células a lisis celular. Los lisados celulares fueron utilizados para llevar a cabo un fraccionamiento subcelular, una inmunoprecipitación y el análisis proteómico de las modificaciones post-traduccionales de Drp1 (ver más adelante).

3.5. Ensayo de diferenciación hacia las tres capas germinales por “gota colgante”

Células ES o iPS fueron disgregadas con tripsina/EDTA (Biowest, L0930) y resuspendidas a una concentración de 3×10^4 células/ml en medio de diferenciación. La solución de células fue dispuesta en forma de gota (20-50 µL) sobre placas de baja adherencia recubiertas con poli-HEMA (poli-2-hidroxietil metacrilato; Sigma-Aldrich, P3932). Las placas fueron invertidas e incubadas durante 3 días para formar los cuerpos embrioides o EB (del inglés, *embryoid bodies*). Al día 3 del ensayo, la posición de las placas se restableció, se añadió medio fresco y se cultivaron los EB en suspensión. A día 7 del ensayo, algunos EB fueron utilizados para obtener RNA y analizarlo por qPCR (ver más adelante), y otros fueron sembrados sobre placas de alta adherencia. Tres días tras la siembra (día 10 del ensayo), el cultivo fue fijado y analizado por inmunofluorescencia (ver más adelante).

El medio de diferenciación utilizado fue DMEM (Biowest, L0104) con FBS 20% (v/v) inactivado por temperatura (55 °C durante 1 hora), L-glutamina 2 mM (Biowest, X0550), penicilina/estreptomicina 1X (Biowest, L0022), aminoácidos no esenciales 1X (Biowest, X0557), piruvato sódico 1 mM (Biowest, L0642) y β-mercaptoetanol 0,1 mM.

3.6. Ensayo de actividad deshidrogenasa de la glucosa-6-fosfato

La actividad deshidrogenasa de la glucosa-6-fosfato se cuantificó mediante espectrofotometría, midiendo el incremento de absorbancia a 340 nm debido a la reducción de NADP⁺ en presencia de glucosa-6-fosfato. Las células, tratadas como se indique en el texto, fueron despegadas de la placa y resuspendidas en una disolución fría de Igepal 630 0,3% (v/v) e inhibidores de proteasas 1X (Roche, 11636145001) en PBS. La suspensión de células fue sonicada 3 veces durante 30 segundos a 4 °C con intervalos de 1 minuto en un sonicador Diagenode Bioruptor. Los lisados fueron

purificados por centrifugación a 10.000 x g durante 10 minutos a 4 °C. La concentración de proteínas en los sobrenadantes se cuantificó mediante un ensayo colorimétrico con el kit Pierce BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific, 23228), siguiendo las instrucciones del proveedor. El tampón de reacción consistió en una disolución de Tris-HCl 30 mM, pH 7,5, MgCl₂ 6 mM, NADP⁺ 0,5 mM, glucosa-6-fosfato 1 mM, y diferentes cantidades de extracto enzimático en un volumen final de 1 ml. La reacción enzimática comenzó con la adición del extracto enzimático y se cuantificó a temperatura ambiente, midiendo la absorbancia a 340 nm durante 5 minutos en un espectrofotómetro Shimadzu UV 1800. La actividad deshidrogenasa de la glucosa-6-fosfato fue calculada a partir de las pendientes obtenidas y expresada en nanomoles de NADPH producidos por minuto y por miligramo de proteína.

4. Análisis celular por microscopía

4.1. Inmunofluorescencia

A los días indicados, las células fueron sembradas sobre cubreobjetos gelatinizados⁶ en placas multipocillo, tratadas como se indique en el texto, y fijadas durante 20 minutos a temperatura ambiente con una disolución de PBS con paraformaldehído 4% (p/v). Seguidamente, las células fueron permeabilizadas durante 10 minutos con una disolución de PBS con Triton X-100 0,5% (v/v), bloqueadas durante 1 hora con tampón de bloqueo, una disolución de PBS con BSA 3% (p/v), e incubadas durante toda la noche a 4 °C con los respectivos anticuerpos primarios en tampón de bloqueo. Al día siguiente, las células fueron lavadas con PBS (4 lavados, 15 minutos cada uno) e incubadas con el anticuerpo secundario correspondiente en tampón de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Después de lavar el anticuerpo secundario, las células fueron incubadas con DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol; Thermo Fisher Scientific, D1306) durante 5 minutos, lavadas con PBS, enjuagadas con agua, montadas con medio de montaje FluorSave (Merck Millipore, 345789) y analizadas por microscopía confocal (ver más adelante). La información sobre los anticuerpos utilizados se indica en las tablas 1 y 2.

Para la detección de los filamentos de Actina F, las células fueron incubadas con faloidina conjugada a Alexa Fluor-488 o -555 (Thermo Fisher Scientific, A12379 o A22283, respectivamente) a una dilución 1:50 en tampón de bloqueo.

⁶ Cubreobjetos tratados con una disolución estéril de gelatina 0,1% (v/v) (Sigma-Aldrich, G1890) a 37 °C durante 30 minutos como mínimo.

Para el análisis de la autofagia y/o mitofagia, previamente al desarrollo de la inmunofluorescencia, las células fueron incubadas en cloroquina 50 μ M (Sigma-Aldrich, C6628) en medio de cultivo durante 4 horas a 37 °C.

Para el análisis de proliferación celular, las células indicadas fueron incubadas con 5-bromo-2'-desoxiuridina 2-5 μ M (BrdU) en el medio de cultivo a 37 °C durante 10 minutos. Inmediatamente, las células fueron lavadas con PBS, fijadas con una disolución de PBS con paraformaldehído 4% (v/v) durante 20 minutos a temperatura ambiente, y lavadas con PBS. Después, las células fueron incubadas con una disolución de ácido clorhídrico 2 N durante 10-15 minutos a 37 °C y lavadas en una disolución de borato sódico 0,1 M, pH 8,5 durante 10-15 minutos a 37 °C. Las células se incubaron en PBS durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, se procedió a seguir el protocolo de inmunofluorescencia previamente descrito a partir de la fijación. Las células fueron analizadas mediante el sistema de alto rendimiento IN Cell Analyzer 2000 (ver más adelante). La información sobre los anticuerpos utilizados se indica en las tablas 1 y 2.

4.2. Tinción de fosfatasa alcalina

Cuando los ensayos de reprogramación celular llegaron a su fin, día 20-25 del proceso, se retiró el medio de cultivo, se lavaron las placas con PBS y se fijaron las células con metanol durante 2 minutos a temperatura ambiente. Inmediatamente después, se lavaron las placas con una disolución de Tris-HCl 0,1 M, pH 8,5-8,7 (3 veces, 10 minutos cada lavado). Tras los lavados, se incubaron las placas con el reactivo, una disolución de Tris-HCl 0,1 M pH 8,5, fosfato de naftol 0,1 mg/ml, N,N-dimetilformamida 0,5% (v/v), cloruro de magnesio 2 mM y sal *fast red* 0,6 mg/ml, en oscuridad hasta la aparición del precipitado rojo. Tras su aparición, las placas fueron lavadas con PBS y fotografiadas. El número de colonias se cuantificó con la ayuda de una lupa binocular.

4.3. Análisis por microscopía confocal

Las imágenes de microscopía confocal mostradas fueron adquiridas usando un microscopio confocal Fluoview FV10iW equipado con los láseres de 405 nm, 488 nm y 633 nm (Olympus). Las imágenes, las reconstrucciones en 3 dimensiones y las representaciones por colores fueron tratadas y generadas usando los programas ImageJ (National Institutes of Health) y FV10-ASW 2.1 Viewer (Olympus). Todas las

imágenes fueron compiladas usando el programa Adobe Illustrator CC (Adobe Systems, Inc.).

La colocalización de Tom20 y Gfp-Lc3b o Tom20 y Drp1 fueron evaluadas calculando el coeficiente de correlación de Pearson o PCC (del inglés, *Pearson's Correlation Coefficient*) usando la aplicación de acceso libre JACoP (<http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/track/jacop.html>) para ImageJ (Bolte and Cordelieres, 2006).

4.4. Análisis por microscopía electrónica de transmisión

Las células, tratadas como se indique en el texto, fueron fijadas durante 30 minutos a 4 °C con una disolución de tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4 con glutaraldehído 2% (p/v). Seguidamente, se realizó una segunda fijación con una mezcla de osmio 1% (p/v) y ferrocianuro potásico 1% (p/v) en agua durante 30 minutos. Las muestras fueron deshidratadas con etanol y óxido de propileno, y embebidas en resina TAAB (TAAB Laboratories, T002). Los bloques de resina fueron seccionados en cortes de 2 micras y teñidos con azul de toluidina para identificar las células mesenquimales y las colonias epiteliales en las muestras. Las secciones de interés fueron re-embebidas en resina TAAB y seccionadas en cortes ultra-finos de 80-90 nm. Las secciones ultra-finos fueron teñidas con citrato de plomo y analizadas en un microscopio electrónico JEOL JEM-1010 (JEOL USA, Inc.). Todas las imágenes fueron analizadas, procesadas y compiladas con los programas Adobe Photoshop CS6 (Adobe Systems, Inc.), ImageJ (National Institutes of Health) y Adobe Illustrator CC (Adobe Systems, Inc.), respectivamente.

4.5. Análisis de alto rendimiento por microscopía IN Cell Analyzer

Para el análisis de alto rendimiento se utilizaron placas multipocillo Nunc (Thermo Fisher Scientific, 146485). Las imágenes fueron capturadas mediante un microscopio IN Cell Analyzer 2000 (GE Healthcare, Inc.) con un objetivo 40X. Las imágenes fueron segmentadas y analizadas con el programa IN Cell Investigator (GE Healthcare, Inc.). Para el análisis, las células y los núcleos fueron definidos mediante la marca nuclear (DAPI). Se realizó una segmentación nuclear tipo "*top-hat*", con una área nuclear mínima de 50 μm^2 . Para definir la segmentación celular, fue utilizada una segmentación rutinaria en collar. Para el análisis del marcaje de BrdU, se analizó la intensidad media de los píxeles dentro de la región definida como núcleo. Una vez cada célula tenía asociado un valor de intensidad media para su región nuclear, se

prefijó un umbral de intensidad para clasificarlas en poblaciones positivas o negativas. El programa asignó un valor positivo o negativo a cada célula en función de una señal por encima o por debajo del umbral, respectivamente.

5. Análisis celular por citometría de flujo

5.1. Análisis de masa mitocondrial

Las células, tratadas como se indique en el texto, fueron disgregadas con tripsina/EDTA (Biowest, L0930), filtradas con un filtro de 30 μm , resuspendidas en solución de citometría, una disolución de PBS con FBS 2% (v/v), incubadas con el marcador mitocondrial independiente de potencial de membrana Mitotracker Green FM (Thermo Fisher Scientific, M7514) a una concentración final de 100 nM y analizadas por citometría de flujo. Justo antes del análisis, se añadió una disolución de yoduro de propidio (Thermo Fisher Scientific, P3566) a una concentración final de 2 $\mu\text{g/ml}$ para excluir del análisis las células muertas. Las medidas se tomaron con los citómetros BD FACSCanto II o BD FACSVerse (BD Biosciencias) y los resultados se analizaron con el programa FlowJo (Tree Star, Inc.). Se tomaron al menos 10.000 eventos celulares de cada muestra.

5.2. Análisis de gotas lipídicas

Las células, tratadas como se indique en el texto, fueron disgregadas con tripsina/EDTA (Biowest, L0930), filtradas con un filtro de 30 μm , resuspendidas en solución de citometría, una disolución de PBS con FBS 2% (v/v), incubadas con el marcador de gotas lipídicas de ácidos grasos no polares Bodipy 493/503 (4,4-difluoro-1,3,5,7,8-pentametil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno; Thermo Fisher Scientific, D3922) a una concentración final de 10 $\mu\text{g/ml}$ y analizadas por citometría de flujo. Justo antes del análisis, se añadió una disolución de yoduro de propidio (Thermo Fisher Scientific, P3566) a una concentración final de 2 $\mu\text{g/ml}$ para excluir del análisis las células muertas. Las medidas se tomaron con los citómetros BD FACSCanto II o BD FACSVerse (BD Biosciencias) y los resultados se analizaron con el programa FlowJo (Tree Star, Inc.). Se tomaron al menos 10.000 eventos celulares de cada muestra.

5.3. Separación de células basada en la expresión de Thy1

Las células, tratadas como se indique en el texto, fueron disgregadas con tripsina/EDTA (Biowest, L0930), filtradas con un filtro de 30 μm , contadas y resuspendidas en solución de citometría, una disolución de PBS con FBS 2% (v/v), a una concentración de $10\text{-}20 \times 10^6$ células/ml. Se depositaron 100 μL de la suspensión de células ($1\text{-}2 \times 10^6$ células) en tubos de citometría de fondo redondo y se incubaron durante 15 minutos en hielo. Posteriormente, se añadieron 100 μL de solución de citometría con el anticuerpo primario 2X y se incubaron durante 45 minutos en hielo. Los tubos se rellenaron con solución de citometría fría, se invirtieron y se centrifugaron a $300 \times g$ durante 3 minutos para eliminar el sobrenadante con el anticuerpo primario. El precipitado de células se resuspendió en 200 μL solución de citometría con el anticuerpo secundario correspondiente y se incubó durante 30 minutos en hielo. Las células se recuperaron como en el paso previo y se resuspendieron en 300 μL de solución de citometría. Antes del análisis, se añadió una disolución de yoduro de propidio (Thermo Fisher Scientific, P3566) a una concentración final de 2 $\mu\text{g/ml}$ para excluir de la separación las células muertas. La separación de células activada por fluorescencia o FACS (del inglés, *fluorescent-activated cell sorting*) se realizó mediante un separador de células BD FACSAria (BD Biosciences) equipado con los láseres de 407 nm, 488 nm y 633 nm. Los resultados se analizaron con el programa FlowJo (Tree Star, Inc.). Las células separadas fueron cultivadas como se indica en el texto. La información sobre los anticuerpos utilizados se indica en las tablas 1 y 2.

6. Análisis de proteínas

6.1. Lisis celular

Las células, tratadas como se indique en el texto, fueron lavadas con PBS frío y lisadas con tampón RIPA, una disolución de Tris 50 mM pH 7,5, cloruro sódico 150 mM, dodecilsulfato sódico 0,1% (p/v), Triton X-100 1% (v/v), desoxicolato sódico 0,5% (p/v), fluoruro sódico 100 mM, ortovanadato sódico 2 mM, pirofosfato sódico tetrabásico 20 mM e inhibidores de proteasas 1X (Roche, 11636145001), con la ayuda de un rascador de células. Los lisados celulares se incubaron en hielo durante 15 minutos con ciclos de vórtex cada 3 minutos. Los restos celulares fueron eliminados mediante la centrifugación de los lisados a 14.000 rpm a 4 °C durante 15 minutos.

La concentración de proteínas se cuantificó mediante un ensayo colorimétrico con el kit Pierce BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific, 23228). Brevemente: 10

µL de lisado se incubaron con 200 µL de la solución de reacción durante 30 minutos a 37 °C. Tras la incubación, se cuantificó la absorbancia a 562 nm. Soluciones de BSA de concentración conocida fueron utilizadas para obtener una recta patrón donde interpolar las concentraciones de las muestras.

Los lisados celulares fueron mezclados con tampón de Laemmli 5X [disolución de Tris-HCl 250 mM pH 6,8, dodecilsulfato sódico 10% (p/v), azul de bromofenol 0,5% (p/v), glicerol 50% (v/v) y ditiotritol 2,5 M] y hervidos durante 5 minutos para desnaturalizar por completo las proteínas.

6.2. Fraccionamiento subcelular

Las células, tratadas como se indique en el texto, fueron lavados con PBS frío, disgregadas con un rascador de células y resuspendidas en tampón hipotónico, una disolución de Tris-HCl 10 mM pH 7,4, sacarosa 0,3 M, EDTA 1 mM, ditiotritol 5 mM e inhibidores de proteasas 1X (Roche, 11636145001) y fosfatasas (ortovanadato sódico, 2 mM y pirofosfato sódico tetrabásico, 20 mM). El ditiotritol fue añadido *a posteriori* o con el tampón de Laemmli 5X tras la cuantificación colorimétrica de las fracciones subcelulares (Pierce BCA Protein Assay; Thermo Fisher Scientific, 23228). Las muestras fueron homogeneizadas con un homogeneizador de vidrio esmerilado de 2 ml en hielo, en 3 ciclos de 30 veces. Los homogeneizados fueron centrifugados 2-3 veces, dependiendo del volumen de células, a 1.000 x g durante 10 minutos a 4 °C para eliminar núcleos y restos celulares. Los sobrenadantes fueron recuperados y centrifugados a 13.000 x g durante 15 minutos a 4 °C para precipitar la fracción mitocondrial. Los sobrenadantes se recuperaron como la fracción citosólica. Los precipitados o fracción mitocondrial fueron lavados con tampón hipotónico frío y centrifugados a 13.000 x g durante 15 minutos a 4 °C dos veces para eliminar trazas del citosol. Seguidamente, fueron resuspendidos en tampón RIPA para lisar las mitocondrias. Las fracciones mitocondrial y citosólica fueron sometidas a inmunodetección o inmunoprecipitación de proteínas (ver más adelante).

6.3. Electroforesis SDS-PAGE y transferencia de proteínas

Las muestras fueron cargadas (30-50 µg) en geles de SDS-poliacrilamida al 7,5%-12%, según conviniera, y separadas mediante electroforesis a amperaje constante (30 mA/gel), usando el sistema SE640 de Hoefer. Como marcador de pesos moleculares se utilizó el PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, de 10-250 kDa

(Thermo Fisher Scientific, 26619). El tampón de electroforesis consistió en una disolución de glicina 192 mM, base Trizma 25 mM y dodecilsulfato sódico 0,1% (p/v).

Las proteínas de los geles fueron transferidas a membranas de polifluoruro de vinilideno (Amersham, GE10600023), previamente activadas con metanol, a voltaje constante (15 V) durante 2 horas usando un sistema TE77X de Hoefer. El tampón de transferencia consistió en una disolución de glicina 39 mM, base Trizma 48 mM, dodecilsulfato sódico 0,37% (p/v) y metanol 20% (v/v). La eficacia de la transferencia se comprobó tiñendo las membranas con una solución de tinción de proteínas, una disolución de ácido acético glacial 1% (v/v), rojo Ponceau S 0,2% (p/v). La solución Ponceau se eliminó con varios lavados de TBST, una disolución de base Trizma 20 mM, cloruro sódico 150 mM, EDTA 1 mM y Tween-20 0,1% (v/v). Las membranas se incubaron con solución de bloqueo, una disolución de TBST con leche desnatada o BSA 5% (p/v), durante 2 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C.

6.4. Inmunodetección de proteínas

Las membranas bloqueadas fueron incubadas con los anticuerpos primarios indicados en tampón de bloqueo a 4 °C en agitación durante toda la noche. Al día siguiente, y tras 3 lavados con TBST (15 minutos cada lavado), las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes conjugados con la peroxidasa de rábano en tampón de bloqueo. Tras 3 lavados de TBST (15 minutos cada lavado), las membranas se incubaron con la solución de reacción para el revelado por quimioluminiscencia (ECL Prime; Amersham, RPN 2232). Las imágenes fueron adquiridas con el sistema ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare, Inc.), y procesadas y analizadas por densitometría con los programas Adobe Photoshop CS6 (Adobe Systems, Inc.) e ImageJ (National Institutes of Health), respectivamente. Los datos se presentan como ratios entre la proteína de interés y la proteína utilizada como control de carga, o entre la fracción fosforilada y la fracción total de la proteína. Las imágenes fueron compiladas con el programa Adobe Illustrator CC (Adobe Systems, Inc.). La información sobre los anticuerpos utilizados se indica en las tablas 1 y 2.

En algunos casos, las membranas fueron utilizadas para la detección de diferentes proteínas. Cuando así fue requerido, los anticuerpos primarios y secundarios fueron eliminados de las membranas mediante la técnica de *stripping*: dos lavados de 5-10 minutos cada uno con una disolución de hidróxido sódico 0,2 N y dodecilsulfato sódico 1% (p/v). Tras el *stripping*, las membranas fueron lavadas con agua e incubadas con solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente.

6.5. Inmunoprecipitación

Las fracciones citosólica y mitocondrial de células CCE1.19 expresando pPYCAG-IP-Flag-Drp1 fueron incubadas con una solución de anticuerpo anti-Flag unido covalentemente a perlas magnéticas (Sigma-Aldrich, M8823) durante 4 horas a 4 °C en rotación. Después, y con la ayuda de un imán, las perlas fueron recuperadas y lavadas 4 veces con tampón RIPA frío, resuspendidas en tampón de Laemmli 1X, y hervidas durante 5 minutos para disociar los anticuerpos y las proteínas de las perlas. Las muestras fueron sometidas a electroforesis SDS-PAGE.

6.6. Cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem o LC-MS/MS

Las fracciones citosólica y mitocondrial de Drp1 fueron cargadas por completo en geles SDS-PAGE al 10% y sometidas a electroforesis (amperaje constante, 30 mA). Los geles fueron fijados con una disolución de etanol 60% (v/v), ácido acético 30% (v/v) y teñidos con Coomassie coloidal QC (Bio-Rad Laboratories, Inc., 1610803). Las bandas de Flag-Drp1 fueron identificadas de acuerdo a su peso molecular y por comparación con sus controles cargados en paralelo, cortadas, sometidas a digestión con tripsina, y analizadas por espectrometría de masas.

El análisis proteómico por cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem o LC-MS/MS (del inglés, *liquid chromatography-tandem mass spectrometry*) fue realizado por el Servicio de Proteómica del Servicio Central de Apoyo a la Investigación Experimental de la Universidad de Valencia. Para el análisis por LC-MS/MS, 5 µL de cada muestra fueron cargados sobre columnas trampa (NanoLC Column, 3 µm, ChromXP C18CL, 350 µm x 0,5 mm; Eksigent, 5016752) y desaladas con una disolución de ácido trifluoroacético 0,1% (v/v) a 3 µL/min durante 5 minutos. Los péptidos fueron cargados sobre columnas analíticas (LC Column, 3 µm, C18-CL, 75 µm x 12 cm; Nikkyo Technos), equilibradas con una disolución de acetonitrilo 5% (v/v) y ácido fórmico 0,1% (v/v). Las fases móviles fueron una disolución de ácido fórmico 0,1% (v/v) (A) y una disolución de acetonitrilo 5% (v/v), ácido fórmico 0,1% (v/v) (B). La elución de péptidos se realizó en un gradiente lineal del 5% al 35% de B en A durante 30 minutos a un flujo de 300 nL/min. Los péptidos fueron analizados en un espectrómetro de masas nanoESI-QTOF (TripleTOF 6600; AB Sciex Pte.). El sistema fue manejado en modo de adquisición independiente de información, realizando un rastreo 0,26-s TOF MS desde 350-1600 m/z, seguido de rastreos de productos iónicos 0,05-s desde 100-1600 m/z de entre los 50 iones cargados más intensos. La

información MS/MS fue enviada a Mascot v2.3.02 o a Paragon v4.5 (AB Sciex Pte.). La sensibilidad del sistema fue controlada con 2 fmol de 6 proteínas (LC Packings).

6.7. Buscador ProteinPilot v5.0 (ABSciex)

Los parámetros por defecto del buscador ProteinPilot v5.0 fueron utilizados para generar una lista de picos directamente a partir de los archivos wiff obtenidos del sistema TripleTOF 6600. El algoritmo de PARAGON del buscador ProteinPilot v5.0 fue utilizado para buscar en la base de datos de proteínas Expsy (616203 secuencias, 181334896 residuos) con los siguientes parámetros: especificada para tripsina, alquilación en *cis*, sin restricción por taxonomía y el esfuerzo de búsqueda centrado en “*through*”. Se ajustó el factor especial: fosforilación proteica, y se buscaron las modificaciones biológicas. Para evitar usar la misma evidencia del espectro en más de una proteína, las proteínas identificadas fueron agrupadas en base a su espectro MS/MS a través del algoritmo ProteinPilot Progroup. Así, las proteínas que compartían espectro MS/MS fueron agrupadas independientemente de la secuencia peptídica asignada. La proteína dentro de cada grupo que explicaba mejor la información del espectro con confianza fue asignada como la proteína primaria del grupo. Sólo las proteínas del grupo para las cuales había evidencia individual (péptidos únicos con suficiente confianza) fueron incluidas hacia el final de la lista de proteínas.

6.8. Impresión y procesamiento de chips de proteína en fase reversa

El análisis por chips de proteínas en fase reversa se realizó en colaboración con el grupo de investigación del Dr. José M. Cuezva (Departamento de Biología Celular e Inmunología, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, España).

Las células, tratadas como se indique en el texto, fueron lavadas con PBS frío y lisadas con tampón RIPA. La concentración de proteína de las muestras fue determinada mediante un ensayo colorimétrico con el reactivo Bradford (Bio-Rad Laboratories, Inc., 5000001), usando BSA como patrón estándar. Antes de la impresión, las muestras fueron diluidas en PBS a una concentración final de 0,5 µg/µl. Se prepararon diluciones seriadas de extractos proteicos (0-1 µg/µL) derivados de las líneas celulares de cáncer colorrectal (HCT116) y de pecho (BT549) como control de calidad y linealidad del reconocimiento de los anticuerpos utilizados. Una curva estándar de BSA (0-1 µg/µL) y otra de anticuerpos de ratón (0-0,6 ng/µL) se utilizaron

como control interno negativo y positivo, respectivamente. Se dispensó 1 nL de cada muestra por duplicado sobre portaobjetos de vidrio recubiertos de nitrocelulosa con 16 almohadillas (FAST Slides, Scheleicher & Schuell BioScience, Inc.) usando el sistema de impresión BioOdyssey Calligrapher MiniArrayer (Bio-Rad Laboratories, Inc.), equipado con un inyector sólido (MCP310S) a una humedad relativa de 45% y una temperatura de 10 °C para la placa y 16 °C para la cámara.

Tras la impresión, los chips fueron desecados y bloqueados con tampón de bloqueo. Después, cada almohadilla fue incubada con los anticuerpos primarios altamente específicos indicados en tampón de bloqueo. Para cuantificar la cantidad de proteína total en cada punto, cada muestra impresa en una de las almohadillas fue fijada con tampón XFCF, ácidos acético 10% (v/v) y etanol 30% (v/v), durante 1 hora, y teñida con una disolución de colorante sintético Fast Green FCF 0,0001% (p/v) (Sigma-Aldrich, F7252) en tampón XFCF durante 5 minutos y lavadas 5 veces con tampón XFCF. Tras la incubación de los anticuerpos primarios, las otras almohadillas fueron lavadas con TBST e incubadas con los anticuerpos secundarios correspondientes conjugados a CF647 (anti-ratón) o Alexa Fluor-647 (anti-conejo). Los chips fueron analizados con el escáner Typhoon 9410 (GE Healthcare, Inc.). La intensidad media de la fluorescencia fue cuantificada usando el programa GenePix Pro 7 y convertida a unidades arbitrarias de “proteína de interés/proteína total de la muestra”, usando la expresión obtenida en la curva patrón de la línea celular HCT116. El valor se normalizó con la cantidad de proteína total obtenida con la tinción Fast Green FCF. La varianza técnica representativa del chip de la Actina β , calculadas como el coeficiente de variación al cuadrado, fue $4,8 \pm 0,7$. La información sobre los anticuerpos utilizados se indica en las tablas 1 y 2.

7. Análisis de expresión génica

7.1. Extracción de RNA

El RNA total de las células, tratadas como se indique en el texto, fue aislado utilizando el reactivo TRI (Sigma-Aldrich, T9424) siguiendo las recomendaciones del proveedor. Brevemente: se retiró el medio de cultivo, se lavaron las células con PBS y se incubaron con 1 ml de reactivo TRI hasta su disolución. Se añadieron 100 μ L de 1-bromo-3-cloropropano y se agitó vigorosamente la mezcla durante 15 segundos para homogeneizar. Se dejó reposar el homogeneizado durante 3 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12.000 x g a 4 °C durante 15 minutos. Tras la centrifugación, se recuperó la fase acuosa superior del sobrenadante, se mezcló 1:1

con 2-propanol y se homogeneizó suavemente. La mezcla se dejó reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12.000 x g a 4 °C durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante, el precipitado se lavó con 1 ml de disolución de etanol 75% (v/v) y se centrifugó de nuevo a 12.000 x g a 4 °C durante 5 minutos. Se dejó secar el precipitado y se resuspendió en agua libre de RNasas, calentándolo a 55 °C durante 5-10 minutos. Con la ayuda de un Nanodrop (Thermo Fisher Scientific) se cuantificó la concentración de RNA. Las muestras se almacenaron a -80 °C hasta su utilización para la síntesis de cDNA (ver más adelante).

7.2. Síntesis de cDNA

Para la síntesis de cDNA a partir del RNA total se utilizó el sistema Superscript III First-Strand Synthesis SuperMIX for qRT-PCR (Invitrogen, 11752) siguiendo las recomendaciones del proveedor y utilizando 0,5 µg de RNA total como sustrato en todas las reacciones. El producto obtenido en un volumen final de 20 µL se diluyó 1:5 con agua libre de RNasas antes de utilizarse en ensayos de qPCR (ver más adelante).

7.3. Análisis por qPCR

El cDNA obtenido fue amplificado con el kit Taqman Fast Advanced Master Mix Product Insert (Applied Biosystems, 4444602), para ensayos Taqman (1 µL de cDNA), o con el kit SYBR Premix Ex Taq (Takara, RR420A), para ensayos SYBR green (2-3 µL de cDNA), en el sistema StepOnePlus Real-Time PCR (Applied Biosystems). Los datos se analizaron utilizando el programa StepOnePlus (Applied Biosystems). La información sobre las sondas para ensayos tipo Taqman (Applied Biosystems) o los cebadores para ensayos tipo SYBR green utilizados se indica en las tablas 3 y 4, respectivamente. Cada ensayo de qPCR fue realizado por duplicado.

8. Análisis metabólicos

8.1. Respirimetría

Los ensayos de respirimetría se realizaron en colaboración con el grupo de investigación de la Dra. Jennifer Lippincott-Schwartz (Cell Biology and Metabolism Department, National Institute of Child Health and Human Development, Bethesda USA).

El día anterior al análisis, las células, tratadas como se indique en el texto, fueron sembradas ($2,0-3,0 \times 10^4$ células/pocillo) en placas multipocillo XF^e96 (Seahorse Bioscience, Inc.). Al día siguiente, las células se incubaron con medio XF Cell Mito Stress Test (Seahorse Bioscience, Inc.) pH 7,4, suplementado con glucosa 25 mM, piruvato sódico 1 mM y glutamina 2 mM. Durante la medición se utilizaron los siguientes inhibidores: oligomicina 1 μ M, FCCP 1 μ M y antimicina A/rotenona 0,5 μ M. La tasa de consumo de oxígeno u OCR (del inglés, *oxygen consumption rate*) basal y desacoplada fue medida utilizando el sistema Seahorse XF^e96 Analyzer (Seahorse Bioscience, Inc.) y el kit comercial Seahorse XF Cell Mito Stress Test (Seahorse Bioscience, Inc.). Las medidas fueron tomadas cada 5 minutos y los resultados normalizados con la cantidad de proteína total determinada mediante un ensayo colorimétrico con el kit Pierce BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific, 23228). Cada condición experimental se llevó a cabo por triplicado.

8.2. Análisis metabolómico por resonancia magnética nuclear o RMN

El análisis metabolómico por RMN se realizó en colaboración con el grupo de investigación del Dr. Antonio Pineda-Lucena (Unidad de Metabolómica, Centro de Investigación Príncipe Felipe-La Fe, Valencia, España).

Muestras de los medios de cultivo de las células, tratadas como se indique en el texto, fueron recogidas tras 10, 24, 48 o 72 horas de la incubación inicial. Para el análisis, 60 μ L de una disolución de D₂O (Eurisotop) con 3-(trimetilsilil)propionato de sodio-D4 o TSP 5 mM (Eurisotop), como referencia de desplazamiento químico, y formato 92,50 mM (Sigma-Aldrich), como pico de cuantificación de referencia, fueron añadidos a 540 μ L de medio. La cuantificación de la concentración del formato fue previamente calibrada con un experimento de RMN 1D, aplicando la Señal Eretic (Bruker Biopsin). Las muestras fueron centrifugadas a 10.000 x g durante 5 minutos y los sobrenadantes transferidos a tubos de RMN de 5 mm (DeuteroGmB). Un análisis de RMN ¹H fue realizado en un espectrómetro Bruker Ultrashield Plus 500 MHz con una prueba TBI. Se aplicó un tiempo de mezcla “*noesy*” de 0,01 segundos para favorecer la línea basal y se eliminó la señal del agua por presaturación. El espectro fue adquirido en una anchura de 30 ppm con 96 k de puntos de datos durante un tiempo de adquisición de 2,7 segundos. 64 tomografías fueron acumuladas para cada espectro y el retraso de relajación fue ajustado a 4 segundos.

Los espectros fueron procesados con una ampliación exponencial de la línea de 0,5 Hz y un rellenado en cero de 128 k. La línea basal fue corregida manualmente y el

espectro referenciado al pico de TSP (0,00 ppm) usando el programa MestReNova 8.1 (MestRelab Research). La asignación de metabolitos fue realizada con la ayuda de la base de datos Human Metabolome y la literatura. La concentración de los metabolitos en el medio inicial fue sustraída de las concentraciones de los metabolitos a 10-72 horas del medio condicionado para el cálculo de flujos netos. Los valores resultantes fueron normalizados con el contenido de proteínas de las muestras mediante un ensayo colorimétrico con el kit Pierce BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific, 23228).

El análisis de componentes principales fue realizado sobre datos con medias centradas y escalados por Pareto usando SIMCA-p+ 12.0 (Umetrics). La calidad del modelo fue comprobada por R2 (bondad de ajuste) y Q2 (bondad de predicción).

8.3. Análisis lipídómico por cromatografía líquida-espectrometría de masas o LC-MS

El análisis metabolómico por cromatografía líquida-espectrometría de masas o LC-MS (del inglés, *liquid chromatography-mass spectrometry*) se realizó en colaboración con el grupo de investigación del Dr. Agustín Lahoz (Grupo de Biomarcadores y Metabolómica, Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, Valencia, España).

Para el análisis de lípidos, las células, tratadas como se indique en el texto, fueron sometidas a lisis celular, precipitación de proteínas y extracción de la fracción no polar. Sobre 100 μL de una suspensión celular en PBS se añadieron 300 μL de 2-propanol frío. Se añadieron 10 μL de las soluciones ácido mirístico D27, carnitina (16:0) D3, lisofosfatidilcolina (17:0), fosfatidilcolina (17:0/17:0), fosfatidiletanolamina (17:0/17:0), fosfatidilglicerol (17:0/17:0), ceramida (d18:1/17:0), monoglicerol (17:0), diglicerol (17:0/17:0), triglicerol (17:0/17:0/17:0) y éster de colesterol (17:0) 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en 2-propanol como controles internos a cada tubo. Las muestras se homogeneizaron durante 1 minuto con vórtex. Tras una incubación de 30 minutos a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, las muestras fueron centrifugadas a 16.000 x g durante 15 minutos. Los sobrenadantes fueron recuperados y desecados con centrifuga de vacío. Las muestras fueron reconstituidas con 100 μL de una disolución 2-propanol:acetonitrilo:agua (2:1:1; v/v/v) para el análisis por LC-MS. Los lípidos fueron separados en columnas Acquity UPLC CSH C18 (100 x 2,1 mm; 1,7 μm) (Waters). Para el análisis tipo ESI(+), las fases móviles fueron formato amónico 10 mM en una disolución acetonitrilo:agua (60:40; v/v) (A) y formato amónico 10 mM en una disolución de 2-propanol:acetonitrilo (90:10; v/v) (B). La separación se

realizó bajo las siguientes condiciones de gradiente con un flujo de 0,4 ml/min: 0 minutos 20% (B); 0-2 minutos 40% (B); 2-4 minutos 43% (B); 4-4,1 minutos 50% (B); 4,1-14 minutos 54% (B); 14-14,1 minutos 70% (B); 14,1-20 minutos 99% (B); 20-24 minutos 99% (B); 24-24,5 minutos 20% (B); 24,5-27 minutos 20% (B). Las muestras y las columnas se mantuvieron a una temperatura de 4 °C y 65 °C, respectivamente. El volumen de inyección fue 2 µL. Para el análisis tipo ESI(-), las fases móviles fueron acetato amónico 10 mM en una disolución acetonitrilo:agua (60:40; v/v) (A) y acetato amónico 10 mM en una disolución de 2-propanol:acetonitrilo (90:10; v/v) (B). La separación se realizó bajo las siguientes condiciones de gradiente con un flujo de 0,6 ml/min: 0 minutos 15% (B); 0-2 minutos 30% (B); 2-2,5 minutos 48% (B); 2,5-11 minutos 82% (B); 11-11,5 minutos 99% (B); 11,5-14 minutos 99% (B); 14,5-15 minutos 15% (B); 15-18 minutos 15% (B). Las muestras y las columnas se mantuvieron a una temperatura de 4 °C y 65 °C, respectivamente. El volumen de inyección fue 5 µL.

Para el análisis de ácidos grasos de la fracción lipídica, las células, tratadas como se indique en el texto, fueron sometidas a lisis celular. Sobre 100 µL de una suspensión celular en PBS se añadieron 100 µL de HCl 0,1M en metanol frío. Se añadieron 10 µL de las soluciones ácido mirístico D27 y fosfatidilcolina (17:0/17:0) 50 µg/ml en metanol como controles internos a cada tubo, y 400 µL de cloroformo frío. Las muestras fueron homogeneizadas durante 1 minuto con vórtex y centrifugadas a 16.000 x g durante 5 minutos. La capa de cloroformo fue recuperada en dos tandas de centrifugación sucesivas. Las muestras fueron desecadas con flujo de nitrógeno. Las muestras fueron reconstituidas con 100 µL de una disolución de KOH 0,3M en metanol:agua (9:1; v/v/v) saponificada durante una hora en un baño a 80 °C. Tras la saponificación, las muestras fueron acidificadas con 100 µL de ácido fórmico, recuperadas con 1 ml de hexano 2X, desecadas con flujo de nitrógeno y resuspendidas en 100 µL de 2-propanol:acetonitrilo:agua (2:1:1; v/v/v) para el análisis por LC-MS. Los ácidos grasos fueron separados en columnas Acquity UPLC CSH C18 (100 x 2,1 mm; 1,7 µm) (Waters). Para el análisis tipo ESI(-), las fases móviles fueron acetato amónico 10 mM en una disolución acetonitrilo:agua (60:40; v/v) (A) y acetato amónico 10 mM en una disolución de 2-propanol:acetonitrilo (90:10; v/v) (B). La separación se realizó bajo las siguientes condiciones de gradiente con un flujo de 0,6 ml/min: 0 minutos 10% (B); 0-3 minutos 25% (B); 3-7 minutos 75% (B); 7-8 minutos 99% (B); 8-8,5 minutos 99% (B); 8,5-9 minutos 10% (B); 9-12 minutos 10% (B). Las muestras y las columnas se mantuvieron a una temperatura de 4 °C y 65 °C, respectivamente. El volumen de inyección fue 5 µL.

Los estándares lisofosfatidilcolina (17:0), fosfatidiletanolamina (17:0/17:0), fosfatidilglicerol (17:0/17:0) y ceramida (d18:1/17:0) se obtuvieron de Avanti Polar Lipids; la carnitina (16:0) D3 de Cambridge Isotope Laboratories; los lípidos fosfatidilcolina (17:0/17:0), monoglicerol (17:0), diglicerol (17:0/17:0), triglicerol (17:0/17:0/17:0) y éster de colesterol (17:0) de Larodan; y el ácido mirístico D27 de Sigma-Aldrich.

La separación por cromatografía líquida se realizó usando un sistema Agilent 1290 Infinity LC (Agilent Technologies) con una bomba (G4220A), un horno en columna (G1316C) y cargador de muestras automático (G4226A). La detección por espectrometría de masas se realizó con un sistema Agilent 6530 QTOFMS (Agilent) equipado con una fuente de ESI. Para cada polaridad, ESI(+) o ESI (-), se configuraron 3 funciones distintas. La primera función recogió la información sin energía de colisión, mientras que la segunda y la tercera función adquirieron la información con una energía de colisión de 25 y 40 eV, respectivamente. La tasa de adquisición fue de 8 espectros por segundo. Otros parámetros fueron: rango de masas MS1, 50-1.700 m/z; rango de masas MS2, 50-1.700 m/z; voltaje de capilaridad, +3 kV/-3 kV; voltaje del inyector, +1 kV/-1 kV; temperatura del gas, 325 °C; gas desecador (nitrógeno), 8 L/min; gas nebulizador (nitrógeno), 35 psi; temperatura de la vaina del gas, 350 °C; flujo de la vaina del gas (nitrógeno), 11 L/min. El instrumento fue calibrado usando un calibrador de Agilent (poder de resolución de masas de 25.000 FWHM). Se utilizó una solución de referencia para corregir pequeños desvíos durante la adquisición: 121,0509 m/z, 922,0098 m/z para ESI(+) y 119,0360 m/z, 980,0164 m/z para ESI(-).

9. Análisis estadístico de los datos

La prueba t de Student fue utilizada para estimar la significatividad estadística entre las dos categorías. Los valores relativos (porcentajes) fueron normalizados usando la transformación arcoseno antes de realizar la comparación estadística. Los datos se presentan como la media \pm error estándar de la media o SEM (del inglés, *standard error of the mean*). Al menos 3 experimentos independientes (n) fueron llevados a cabo para la comparación estadística.

Antígeno	Especie ^a	Proveedor ^b	Dilución ^c
Acc	Rb	CST, #3676	1:1000 (WB)
p-Acc (Ser79)	Rb	CST, #11818	1:1000 (WB)
Actina β	Ms	SA, A1978	1:500 (PMA)
Afp	Rb	Abcam, ab46799	1:100 (IF)
Ampka	Rb	CST, #5831	1:1000 (WB)
p-Ampka (Thr172)	Rb	CST, #2535	1:1000 (WB)
Atp5b	Ms	Dr. José M. Cuezva ¹	1:150 (PMA)
Atpif1	Rb	SCBT, sc-134962	1:500 (WB)
BrdU	Rt	ID, OBT0030	1:500 (IF)
Ciclina B1	Ms	SCBT, sc-245	1:100 (WB)
Cox4	Ms	Abcam, ab14744	1:100 (PMA)
Drp1	Rb	CST, #8570	1:1000 (WB); 1:50 (IF)
p-Drp1 (Ser616)	Rb	CST, #3455	1:1000 (WB)
Dusp6	Rb	Dr. Rafael Púlido ¹	1:1000 (WB)
Eno1	Rb	Abgent, AM2192b-ev	1:200 (PMA)
Erk1/2	Rb	CST, #9102	1:1000 (WB)
p-Erk1/2 (Thr202/Tyr204)	Ms	CST, #9106	1:2000 (WB)
Fasn	Rb	CST, #3180	1:1000 (WB)
G6pd	Rb	CST, #12263	1:1000 (WB)
Gapdh	Rb	CST, #5174	1:1000 (WB)
Gapdh	Ms	Dr. José M. Cuezva ¹	1:250 (PMA)
Hadha	Rb	Abcam, ab54477	1:1000 (PMA)
Hk1	Rb	CST, #2024	1:1000 (WB)
Hk2	Rb	CST, #2867	1:1000 (WB)
Lc3b	Rb	CST, #2775	1:1000 (WB)
Ldha	Rb	CST, #3582	1:1000 (WB)
Mfn2	Rb	SA, AV42420	1:1000 (WB)
Nanog	Rb	Reprocell, RCAB0001P	1:100 (IF); 1:1000 (WB)

Tabla 1. Anticuerpos primarios utilizados. (a) Especie en el que fue generado el anticuerpo: Ms (ratón), Rt (rata) o Rb (conejo). (b) Compañía proveedora del anticuerpo: CST, Cell Signaling Technology; ID, Immunological Direct; SA, Sigma-Aldrich; SCBT, Santa Cruz Biotechnology; TFS, Thermo Fisher Scientific; 1, obsequio. (c) Dilución usada y ensayo en el que se utilizó el anticuerpo: FC, citometría de flujo; IF, inmunofluorescencia; PMA, chip de proteínas; WB, inmunodetección de proteínas.

Antígeno	Especie ^a	Proveedor ^b	Dilución ^c
Ndufs3	Ms	SCBT, sc-374282	1:200 (IF)
Oct4	Ms	SCBT, sc-5279	1:50 (IF)
Opa1	Ms	BD, #612606	1:1000 (WB)
Pdh	Rb	CST, #3205	1:1000 (WB)
Pdhe1α	Ms	TFS, 459400	1:200 (PMA)
Pkm1/2	Rb	CST, #3190	1:1000 (WB)
Pkm2	Ms	Dr. José M. Cuezva ¹	1:150 (PMA)
Sdha	Rb	SCBT, sc-11998	1:300 (WB)
Sma	Ms	Abcam, ab7817	1:100 (IF)
SSEA1	Ms	SCBT, sc-21702	1:10 (IF)
Thy1	Rt	eBioscience, 14-0903-81	1:400 (IF, FC)
Tom20	Rb	SCBT, sc-11415	1:50 (IF); 1:500 (WB)
Tom20	Ms	SA, WH0009804M1	1:500 (IF)
Tom40	Ms	SCBT, sc-365467	1:500 (WB)
Tubulina-α	Ms	SCBT, sc-32293	1:5000 (WB)
Tubulina-βIII (Tuj1)	Rb	Covance, MRB-435P	1:1000 (IF)
Uqcrc2	Ms	Mitosciencias, MS304	1:500 (PMA)
IgG2b K isotipo control	Rat	eBioscience, 16-4031-81	1:400 (FC)

Tabla 1 (continuación). Anticuerpos primarios utilizados. (a) Especie en el que fue generado el anticuerpo: Ms (ratón), Rt (rata) o Rb (conejo). (b) Compañía proveedora del anticuerpo: CST, Cell Signaling Technology; ID, Immunological Direct; SA, Sigma-Aldrich; SCBT, Santa Cruz Biotechnology; TFS, Thermo Fisher Scientific; 1, obsequio. (c) Dilución usada y ensayo en el que se utilizó el anticuerpo: FC, citometría de flujo; IF, inmunofluorescencia; PMA, chip de proteínas; WB, inmunodetección de proteínas.

Antígeno	Especie ^a	Conjugado ^b	Proveedor ^c	Dilución ^d
IgG de ratón	Dk	AF-488	TFS, A-21202	1:1000 (IF)
IgG de ratón	Dk	AF-555	TFS, A-31570	1:1000 (IF)
IgG de ratón	Dk	AF-647	TFS, A-31571	1:1000 (IF)
IgM de ratón	Dk	AF-555	TFS, A-21426	1:1000 (IF)
IgG de conejo	Dk	AF-488	TFS, A-21206	1:1000 (IF)
IgG de conejo	Dk	AF-555	TFS, A-31572	1:1000 (IF)
IgG de conejo	Dk	AF-647	TFS, A-31573	1:1000 (IF)
IgG de rata	Dk	AF-488	TFS, A-11006	1:1000 (IF, FC)
IgG de ratón	Gt	Peroxidasa	TFS, 31432	1:5000 (WB)
IgG de conejo	Gt	Peroxidasa	TFS, 31460	1:5000 (WB)
IgG de ratón	Gt	CF647	SA, SAB4600183	1:500 (PMA)
IgG de conejo	Dk	AF-647	TFS, A-31573	1:500 (PMA)

Tabla 2. Anticuerpos secundarios utilizados. (a) Especie en el que fue generado el anticuerpo: Dk (burro), Gt (cabra). (b) Fluoróforo o enzima conjugado: AF, Alexa Fluor. (c) Compañía proveedora del anticuerpo: SA, Sigma-Aldrich; TFS, Thermo Fisher Scientific. (d) Dilución usada y ensayo en el que se utilizó el anticuerpo: FC, citometría de flujo; IF, inmunofluorescencia; PMA, chip de proteínas; WB, inmunodetección de proteínas.

Gen	Número de serie/secuencia	Ensayo
<i>Afp</i>	Mm00431715_m1	Ensayo expresión Taqman
<i>Cer1</i>	Mm03024044_m1	Ensayo expresión Taqman
<i>Foxa1</i>	Mm00839704_mH	Ensayo expresión Taqman
<i>Gapdh</i>	Mm99999915_g1	Ensayo expresión Taqman
<i>Kdr</i>	Mm01222421_m1	Ensayo expresión Taqman
<i>Meox1</i>	Mm00440285_m1	Ensayo expresión Taqman
<i>Nanog</i>	Mm02384862_g1	Ensayo expresión Taqman
<i>Oct4</i>	Mm00658129_gH	Ensayo expresión Taqman
<i>Sox1</i>	Mm00486299_s1	Ensayo expresión Taqman
<i>Sox2</i>	Mm03053810_S1	Ensayo expresión Taqman
<i>Zic1</i>	Mm00656094_m1	Ensayo expresión Taqman
tOct4-F	TGGTACGGGAAATCACAAGTTTGTA	Ensayo de expresión Taqman personalizado para expresión retroviral ^a
tOct4-R	GGTGAGAAGGCGAAGTCTGAAG	
tOct4-sonda	FAM-CACCTTCCCATGGCTG-MGB	
tSox2-F	TGGTACGGGAAATCACAAGTTTGTA	Ensayo de expresión Taqman personalizado para expresión retroviral ^a
tSox2-R	GCCCGGCGGCTTCA	
tSox2-sonda	FAM-CTCCGTCTCCATCATGTTAT-MGB	
tKlf4-F	TGGTACGGGAAATCACAAGTTTGTA	Ensayo de expresión Taqman personalizado para expresión retroviral ^a
tKlf4-R	GAGCAGAGCGTCGCTGA	
tKlf4-sonda	FAM-CCCCTTCACCATGGCTG-MGB	
tc-Myc-F	TGGTACGGGAAATCACAAGTTTGTA	Ensayo de expresión Taqman personalizado para expresión retroviral ^a
tc-Myc-R	GGTCATAGTTCTGTTGGTGAAGTT	
tc-Myc-sonda	FAM-CCCTTCACCATGCCCC-MGB	

Tabla 3. Sondas Taqman utilizadas. F, cebador directo; R, cebador reverso; sonda, sonda fluorogénica marcada con FAM diseñada para cada transgén (a).

Gen	Cebadores directos (5' hacia 3')	Cebadores reversos (5' hacia 3')
<i>Acc</i>	CACAGGATCTGTATGAGAAAG	AAGAGGTTAGGGAAGTCATC
<i>Atpif1</i>	ACCATTCTGAAGGAGATAGAG	ATTCAAAGCCATGTGTCTAC
<i>Ciclina B1</i>	ACATGACTGTCAAGAACAAG	CAGATGTAGCAGTCTATTGG
<i>Ciclina B2</i>	GCCAAGGAAAATGGAATTTG	TACGGTTGTCATTGACTTTC
<i>Crtc3</i>	TGACTCACCTGGGGATAAGAAC	GTGGCACTTGAGGGACGAG
<i>Drp1</i>	CAGGAATTGTTACGGTTCCTAA	CCTGAATTAECTTGTCCCCTGA
<i>Dusp6</i>	ATGATGAGGTCTTCAGTCTC	CAAATACCCCTTGAGACAC
<i>Erra</i>	TTCGGCGACTGCAAGCTC	CACAGCCTCAGCATCTTCAATG
<i>Fasn</i>	TATGAAGCAATTGTGGATGG	GAAGTCGAAGAAGAAAGAGAG
<i>Fis1</i>	TGTCCAAGAGCACGCAATTTG	CCTCGCACATACTTTAGAGCCTT
<i>Gapdh</i>	GCACAGTCAAGGCCGAGAAT	GCCTTCTCCATGGTGGTGAA
<i>Gdap1</i>	TCCTTCAGCTCTCAAAGGTGC	GCGCATAAACCAAGGCTCATT
<i>Mff</i>	ATGCCAGTGTGATAATGCAAGT	CTCGGCTCTCTTCGCTTTG
<i>Mid49</i>	AGCCCACGCCCATTCATTC	TGGAGCCCGTCGTAGAGAG
<i>Mid51</i>	GGTGAGCGCAAAGGGAAGA	AATGCCCAACATAGCTGCTCC
<i>Mfn1</i>	ATGGCAGAAACGGTATCTCCA	CTCGGATGCTATTCGATCAAGTT
<i>Mfn2</i>	TGACCTGAATTGTGACAAGCTG	AGACTGACTGCCGTATCTGGT
<i>Nrf1</i>	CCACATTACAGGGCGGTGAA	AGTGGCTCCCTGTTGCATCT
<i>Opa1</i>	ACAGCAAATTCAAGAGCACGA	TTGCGCTTCTGTTGGGCAT
<i>Pgc1a</i>	CGGAAATCATATCCAACCAG	TGAGGACCGCTAGCAAGTTTG

Tabla 4. Secuencias de los cebadores utilizados en ensayos SYBR Green.

Resultados

Capítulo 1

La fisión mitocondrial es una
barrera temprana de la reprogramación
celular

1.1. La reprogramación celular induce fisión mitocondrial

Se trató de investigar el papel de la dinámica mitocondrial y su regulación durante la reprogramación celular. La morfología mitocondrial fue evaluada en MEF antes y después de la transducción con *OSKM* a los días indicados mediante inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-Tom20. Se clasificó a las células en tres poblaciones diferentes de acuerdo a su morfología mitocondrial: tubular, mixta o fragmentada (Fig. 16).

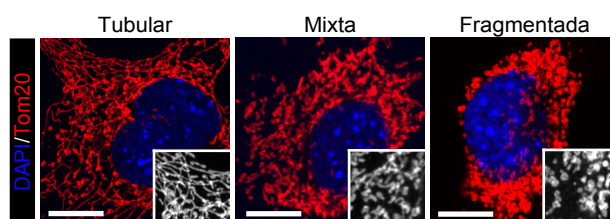


Figura 16. Las células fueron clasificadas en 3 categorías atendiendo a su morfología mitocondrial. Imágenes representativas de microscopía confocal de MEF teñidos con anticuerpo anti-Tom20 (rojo) ilustrando las diferentes morfologías mitocondriales observadas en los cultivos: tubular, mixta o fragmentada. Los recuadros inferiores muestran una magnificación en blanco y negro de las respectivas imágenes. DAPI (azul) fue utilizado como contratinción nuclear. Barras de escala, 12 μm .

Antes de la expresión de los 4 factores, alrededor del 75% de las células mostraban una morfología fundamentalmente tubular (Fig. 17, gráfica y paneles de la derecha). Curiosamente, se observó que la fisión mitocondrial comenzaba cuando las células fueron transducidas con los retrovirus *OSKM*, alcanzando su máximo a día 3,5 del proceso, con un 55% de las células presentando una morfología fragmentada. De manera inversa, el porcentaje de células que presentaban una morfología tubular antes de la expresión de *OSKM* se redujo continuamente hasta un 15% a día 3,5. Desde aquí en adelante, la fragmentación mitocondrial se redujo de manera continua hasta un 15% de la población a día 8 del proceso, y las células volvieron a mostrar una morfología mitocondrial fundamentalmente tubular. Esta dinámica alcanzó una meseta a día 7, con el 50% de las células presentando una red mitocondrial interconectada. En conjunto, estos resultados indican que la expresión de *OSKM* induce fisión mitocondrial durante la fase inicial de la reprogramación celular.

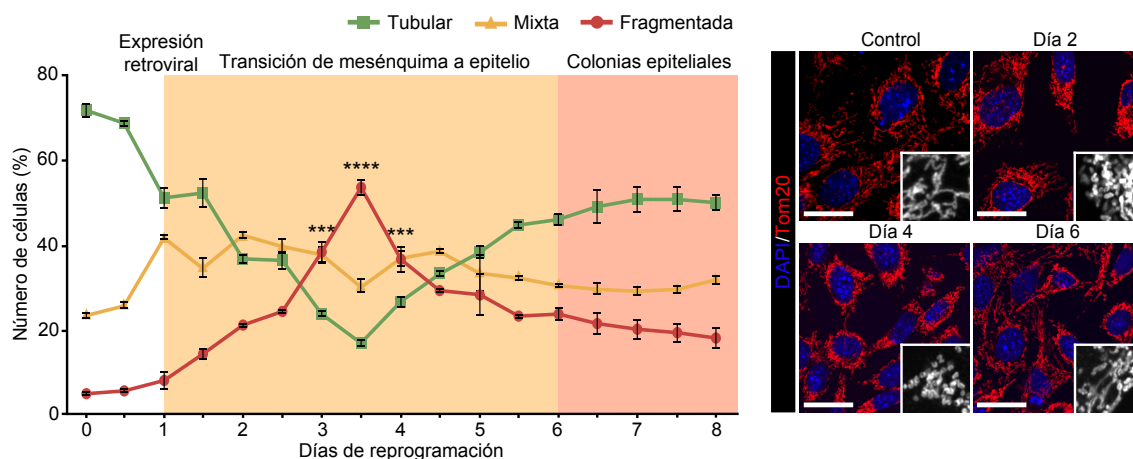


Figura 17. La reprogramación celular induce fisión mitocondrial. MEF fueron transducidos con *OSKM*. A los días indicados, las células fueron fijadas y la morfología mitocondrial fue evaluada por inmunofluorescencia como en la Fig. 16. Paneles de la derecha, imágenes representativas de microscopía confocal de MEF teñidos con anticuerpo anti-Tom20 (rojo) antes (control) o a los días indicados tras la transducción con *OSKM*. Los recuadros inferiores muestran una magnificación en blanco y negro de las respectivas imágenes. DAPI (azul) fue utilizado como contratinción nuclear. Barras de escala, 24 μm . Gráfica de la izquierda, cuantificación de las diferentes morfologías observadas en MEF antes (día 0) o a los días indicados tras la transducción con *OSKM* ($n = 3$). Las áreas sombreadas indican el transcurso de la transición de mesénquima a epitelio (naranja) y la aparición de las colonias epiteliales (rosa). Los datos están representados como la media \pm SEM (** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$). La prueba t-Student de una cola fue utilizada para comparar los conjuntos de datos.

Durante la reprogramación celular, las células sufren una transición de mesénquima a epitelio (Li et al., 2010; Samavarchi-Tehrani et al., 2010). Seis días después de la transducción con *OSKM*, tinciones del cultivo con faloidina conjugada a Alexa Fluor-488 mostraron células dispersas que presentaban gruesos haces de filamentos de Actina F dispuestos en paralelo, característicos de las células mesenquimales (Fig. 18a, paneles de la izquierda), y colonias epiteliales aisladas que presentaban haces corticales de filamentos de Actina F (Fig. 18a, paneles centrales y de la derecha). Las células mesenquimales presentaron una distribución de la morfología mitocondrial similar a la encontrada a día 0 (Fig. 18a, gráfica, barra de la izquierda, Mes), mientras que alrededor del 80% de las células de las colonias epiteliales presentaron una morfología fragmentada (Fig. 18a, gráfica, barra de la derecha, Epi). Un análisis de la ultra-estructura de los cultivos a diferentes días del proceso mediante microscopía electrónica de transmisión reveló una reducción gradual en el tamaño mitocondrial, yendo desde 1 micrómetro a día cero a 0,5 micrómetros en las células que conformaban las colonias epiteliales a día 8 de la reprogramación (Fig. 18b, gráfica). Más allá del tamaño, no se observó otros cambios estructurales en las mitocondrias durante los estadios iniciales del proceso (Fig. 18b, paneles).

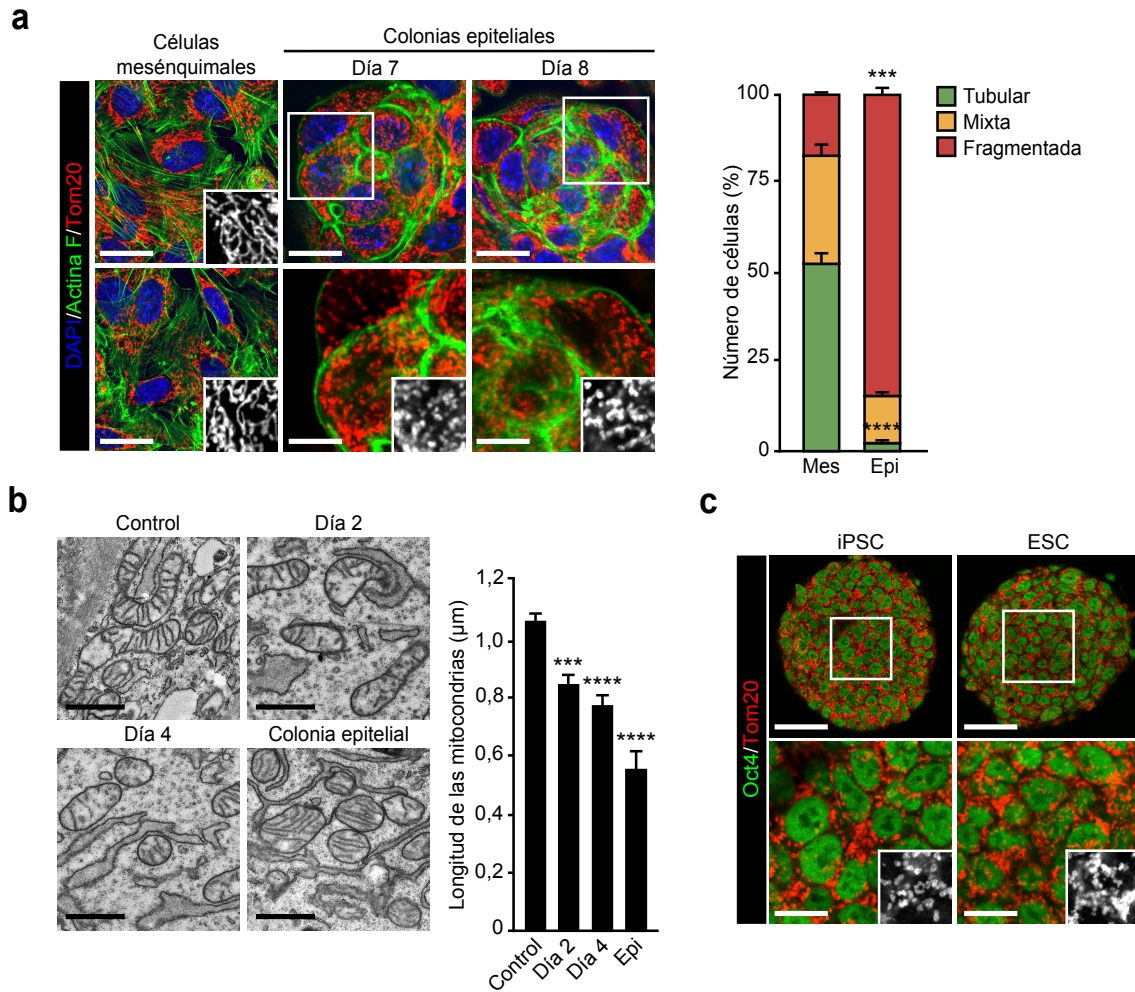


Figura 18. Las colonias epiteliales presentan una morfología mitocondrial similar a iPSC y ESC. (a) Imágenes representativas de microscopía confocal de células mesenquimales (paneles de la izquierda; Barras de escala, 24 μm) o colonias epiteliales (paneles superiores central y de la derecha; Barras de escala, 16 μm) encontradas en el cultivo a los días de reprogramación indicados mostrando la tinción de Actina F (verde) y Tom20 (rojo). Los paneles inferiores central y de la derecha muestran una magnificación del área indicada en las imágenes superiores. Barras de escala, 8 μm . Los recuadros inferiores muestran una magnificación en blanco y negro de las respectivas imágenes. DAPI (azul) fue utilizado como contratinción nuclear. Gráfica de la derecha, cuantificación de las diferentes morfologías observadas en células mesenquimales (Mes) o en colonias epiteliales (Epi) a día 8 de reprogramación ($n = 3$). (b) Imágenes representativas de TEM de MEF antes (control) o a los días indicados tras la transducción con *OSKM*, o colonias epiteliales a día 8 de reprogramación, mostrándose la ultraestructura característica de sus mitocondrias. Barras de escala, 800 nm. Gráfica de la derecha, cuantificación de la longitud de las mitocondrias observada a los días indicados tras la transducción con *OSKM* ($n \geq 800$). (c) Imágenes representativas de microscopía confocal de células pluripotentes teñidas con anticuerpos anti-Oct4 (verde) y anti-Tom20 (rojo). Los recuadros inferiores muestran una magnificación en blanco y negro de las respectivas imágenes. Barras de escala de los paneles superiores e inferiores, 40 μm y 16 μm , respectivamente. Los datos están representados como la media \pm SEM (***) $P < 0,001$; ****) $P < 0,0001$). La prueba t-Student de una cola fue utilizada para comparar los conjuntos de datos.

Curiosamente, las colonias epiteliales presentaban una morfología mitocondrial muy similar a la encontrada en células pluripotentes, donde todas las células mostraron mitocondrias fragmentadas (Fig. 18c), indicando que la morfología mitocondrial característica del estado pluripotente se establece durante la fase estocástica de la reprogramación celular, antes o justo después de alcanzar la morfología epitelial. Estos resultados también sugieren que la fisión mitocondrial durante la fase estocástica del proceso es crucial para iniciar la transición hacia la pluripotencia.

1.2. Los intermediarios de la reprogramación celular contienen mitocondrias fragmentadas

Ha sido descrito que las células somáticas en tránsito durante la reprogramación celular reducen la expresión del marcador de superficie *Thy1* (Fig. 19) durante los primeros días del proceso (Polo et al., 2012; Stadtfeld et al., 2008b). Se trató de dilucidar si estos intermediarios de la reprogramación celular experimentaban fragmentación mitocondrial. Para ello, se analizó la morfología mitocondrial de células positivas y negativas para *Thy1* durante los primeros días del proceso mediante inmunofluorescencia. La expresión de *OSKM* en MEF causó pequeños cambios en la proporción de células positivas para *Thy1* que presentaban mitocondrias fragmentadas durante los primeros días del proceso. Sin embargo, el porcentaje de células negativas para *Thy1* con una morfología mitocondrial fragmentada se incrementó de una forma considerable durante los cuatro primeros días del proceso (Fig. 20a). Estos resultados sugieren que la fragmentación mitocondrial está asociada a las células que tienden a avanzar en el proceso de reprogramación celular.

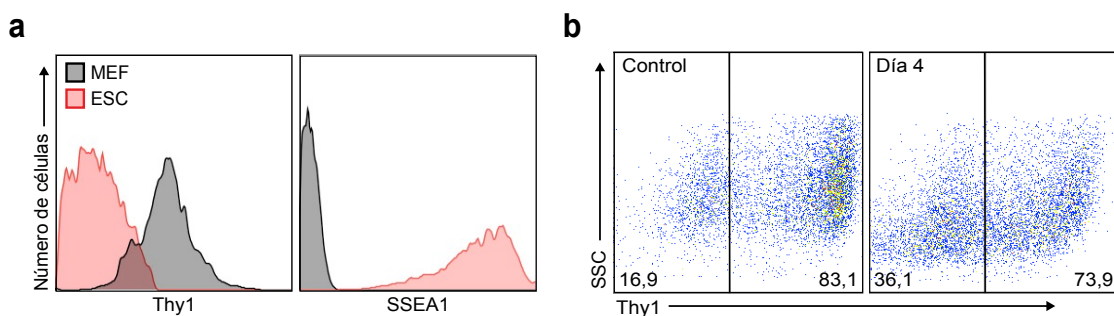


Figura 19. El marcador somático *Thy1* se silencia conforme avanza la reprogramación celular. (a) Histograma mostrando la expresión de los marcadores indicados en MEF (gris) o ESC (rojo) evaluados por citometría de flujo. **(b)** Gráficos de puntos mostrando la expresión de *Thy1* en MEF antes (control) o 4 días después de la expresión de *OSKM* evaluada por citometría de flujo. Los porcentajes de las poblaciones negativas y positivas para *Thy1* se muestran en la parte inferior de los gráficos (n = 3).

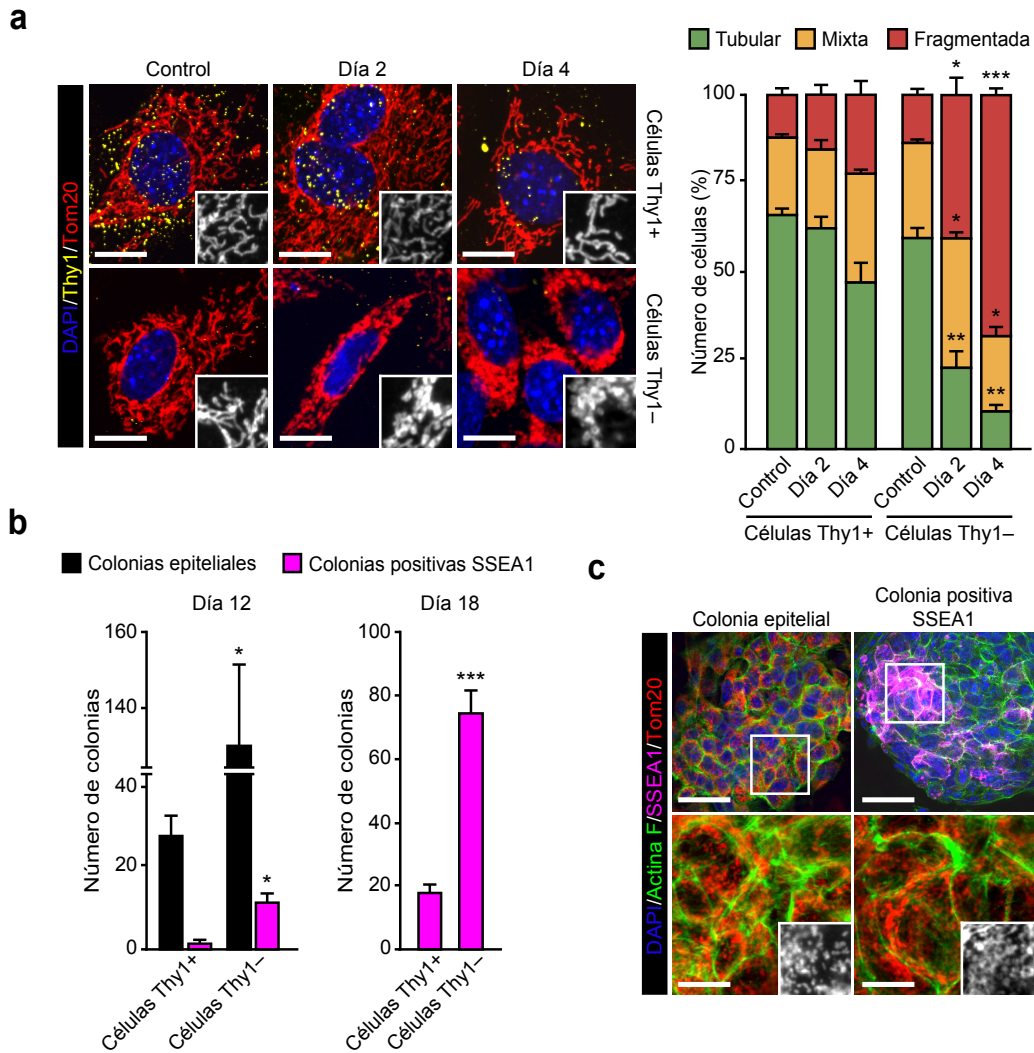


Figura 20. La fisión mitocondrial se asocia a los intermediarios de la reprogramación celular. (a) MEF fueron transducidos con *OSKM*. A los días indicados, las células fueron fijadas y la expresión de Thy1 fue evaluada por inmunofluorescencia. Paneles de la izquierda, imágenes representativas de microscopía confocal de MEF teñidos con los anticuerpos anti-Thy1 (amarillo) y anti-Tom20 (rojo) antes (control) o a los días indicados tras la transducción con *OSKM*. Los recuadros inferiores muestran una magnificación en blanco y negro de las respectivas imágenes. DAPI (azul) fue utilizado como contratincción nuclear. Barras de escala, 16 μ m. Gráfica de la derecha, cuantificación de las diferentes morfologías mitocondriales observadas en MEF antes (control) o tras la expresión de *OSKM* en las poblaciones negativas (Thy1-) y positivas (Thy1+) para Thy1 (n = 3). (b) MEF antes (control) o 4 días tras la transducción con *OSKM* fueron separados en dos poblaciones: positivas o negativas para Thy1. Ambas poblaciones fueron cultivadas por separado durante 8 ó 14 días, y las colonias epiteliales o positivas para SSEA1 fueron identificadas por inmunofluorescencia usando faloidina conjugada a Alexa Fluor-488 o el anticuerpo anti-SSEA1, respectivamente. Gráfica de la izquierda, cuantificación del número de colonias epiteliales o positivas para SSEA1 encontradas a los días indicados tras la transducción con *OSKM* (n = 3). (c) Imágenes representativas de microscopía confocal de colonias epiteliales a día 12 (paneles de la izquierda) o positivas para SSEA1 a día 18 (paneles de la derecha) teñidas con faloidina conjugada a Alexa Fluor-488 (verde) y los anticuerpos anti-Tom20 (rojo) o anti-SSEA1 (magenta). Los paneles inferiores muestran una magnificación del área indicada en las imágenes superiores. Los recuadros inferiores muestran una magnificación en blanco y negro de las respectivas imágenes. DAPI (azul) fue utilizado como contratincción nuclear. Barras de escala de las imágenes superiores e inferiores, 24 μ m y 8 μ m, respectivamente. Los datos están representados como la media \pm SEM (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$). La prueba t-Student de una cola fue utilizada para comparar los conjuntos de datos.

Para corroborar estos datos, las células fueron separadas mediante FACS en base a la expresión en superficie del marcador *Thy1* cuatro días después de la expresión de *OSKM*, y se monitorizó el proceso de reprogramación de las poblaciones positivas y negativas para *Thy1* por separado. Curiosamente y en contraste con la población positiva, se observó que la población de células negativas para *Thy1* generaban 4 veces más colonias epiteliales y/o positivas para *SSEA1* a los días 12 y 18 del proceso, respectivamente (Fig. 20b). Las células que conformaban las colonias epiteliales y/o positivas para *SSEA1* presentaban una morfología mitocondrial fragmentada (Fig. 20c). En conjunto, estos datos apoyan la hipótesis de que la fisión mitocondrial está íntimamente ligada a una reprogramación celular exitosa hacia la pluripotencia.

1.3. La reducción mitocondrial inducida por OSKM no está asociada a mitofagia dependiente de Lc3b

Una dinámica mitocondrial fluida (ciclos constantes de fusión-fisión) es importante para mantener una población mitocondrial homogénea y funcional, uniendo mitocondrias funcionales con disfuncionales para repartir componentes y recuperar su potencial de membrana (Twig et al., 2008). Ocasionalmente, un alto grado de disfuncionalidad o un cambio fisiológico de la célula inducen la degradación y/o regulación del número de mitocondrias mediante mitofagia (Kim et al., 2007a; Rodriguez-Enriquez et al., 2004). La fisión mitocondrial es un proceso necesario para la mitofagia (Kanki et al., 2010; Poole et al., 2010; Tanaka et al., 2010; Twig et al., 2008; Ziviani et al., 2010), mientras que la fusión mitocondrial actúa como un impedimento para este proceso (Gomes et al., 2011; Rambold et al., 2011; Twig and Shirihai, 2011). Dado que se ha descrito que durante la reprogramación celular se produce una reducción de la masa mitocondrial (Folmes et al., 2011; Prigione and Adjaye, 2010; Prigione et al., 2010; Wang et al., 2013; Zhou et al., 2012), la posibilidad de que la fisión mitocondrial sea un prerrequisito para la mitofagia ha sido propuesta en varios trabajos (Pan et al., 2013; Vessoni et al., 2012; Wang et al., 2013). Para evaluar esta hipótesis se utilizó como proteína reportera de autofagia la cadena ligera 3b de la proteína asociada a microtúbulos o Lc3b (del inglés, *microtubule associated protein light chain 3b*) fusionada a Gfp (Gfp-Lc3b). Lc3b participa en la formación, elongación y cierre de los autofagosomas que dirigen la autofagia. Su forma inactiva (Lc3b-I) se activa por escisión proteolítica y modificación covalentemente con fosfatidil etanolamina (Lc3b-II), uniéndose a los autofagosomas en formación (Ashrafi and Schwarz, 2013).

Curiosamente, se detectó un descenso de la autofagia mediada por Lc3b durante los primeros días del proceso, medido por inmunofluorescencia, en forma de número de células positivas para Gfp-Lc3b (Fig. 21a), y por inmunodetección de proteínas, en forma de procesamiento proteolítico de Lc3b endógena (Fig. 21b). A día 8 de la reprogramación, las colonias epiteliales fueron negativas para este marcador de autofagia (Fig. 21c).

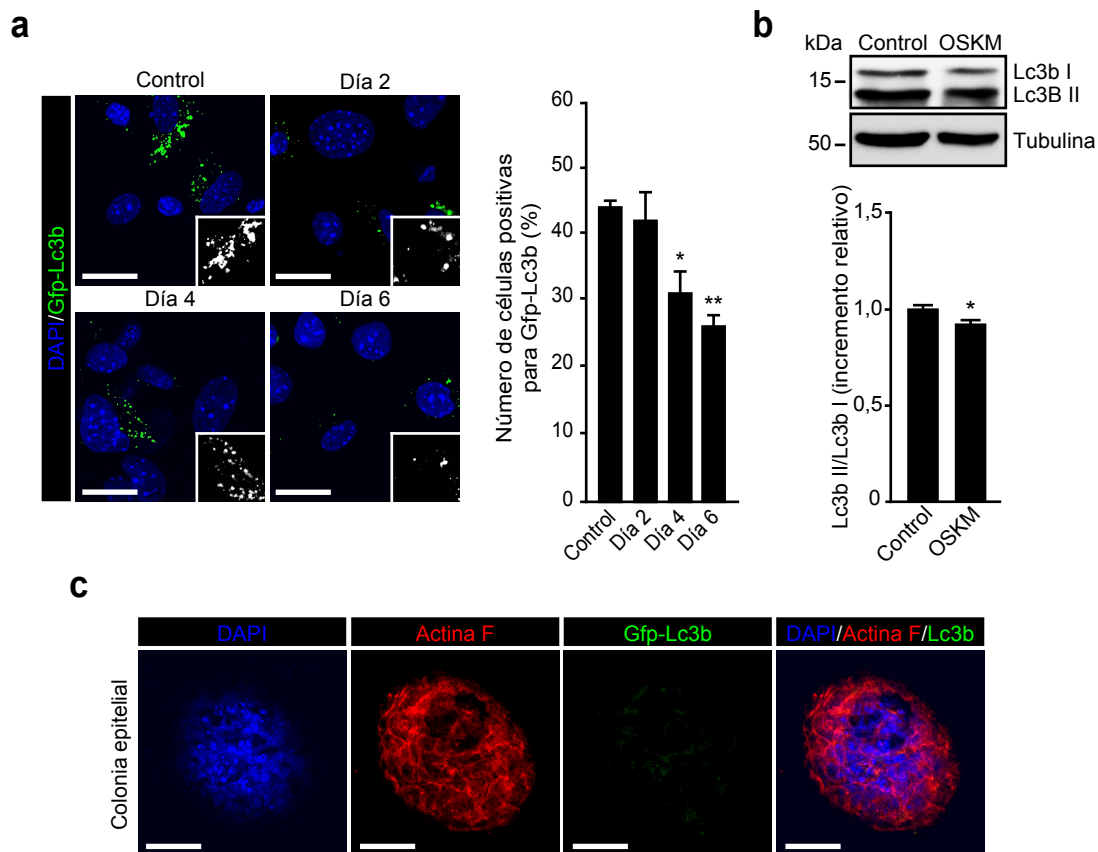


Figura 21. La autofagia a través de Lc3b disminuye durante la reprogramación celular. (a) MEF expresando *Gfp-Lc3b* fueron transducidos con *OSKM*. A los días indicados, las células fueron tratadas con cloroquina 50 μ M durante 4 horas, fijadas y analizadas por inmunofluorescencia. Paneles de la izquierda, imágenes representativas de microscopía confocal de células positivas para Gfp-Lc3b (verde) a los días indicados tras la transducción con *OSKM*. Los recuadros inferiores muestran una magnificación en blanco y negro de las respectivas imágenes. DAPI (azul) fue utilizado como contratiñencia nuclear. Barras de escala, 24 μ m. Gráfica de la derecha, cuantificación de las células positivas para Gfp-Lc3b antes (control) o tras de la expresión de *OSKM* (n = 3). (b) Paneles superiores, lisados celulares de MEF antes (control) o tras la transducción con *OSKM* durante 4 días fueron analizados por inmunodetección usando los anticuerpos indicados. Gráfica inferior, cuantificación de la ratio Lc3b II/Lc3b I (n = 3). (c) MEF expresando *Gfp-Lc3b* fueron transducidos con *OSKM* durante 8 días. Las células fueron tratadas con cloroquina 50 μ M durante 4 horas, fijadas y analizadas por inmunofluorescencia. Imágenes representativas de microscopía confocal de colonias epiteliales negativas para Gfp-Lc3b (verde) teñidas con faloidina conjugada a Alexa Fluor-555 (rojo). DAPI (azul) fue utilizado como contratiñencia nuclear. Barras de escala, 40 μ m. Los datos están representados como la media \pm SEM (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$). La prueba t-Student de una cola fue utilizada para comparar los conjuntos de datos.

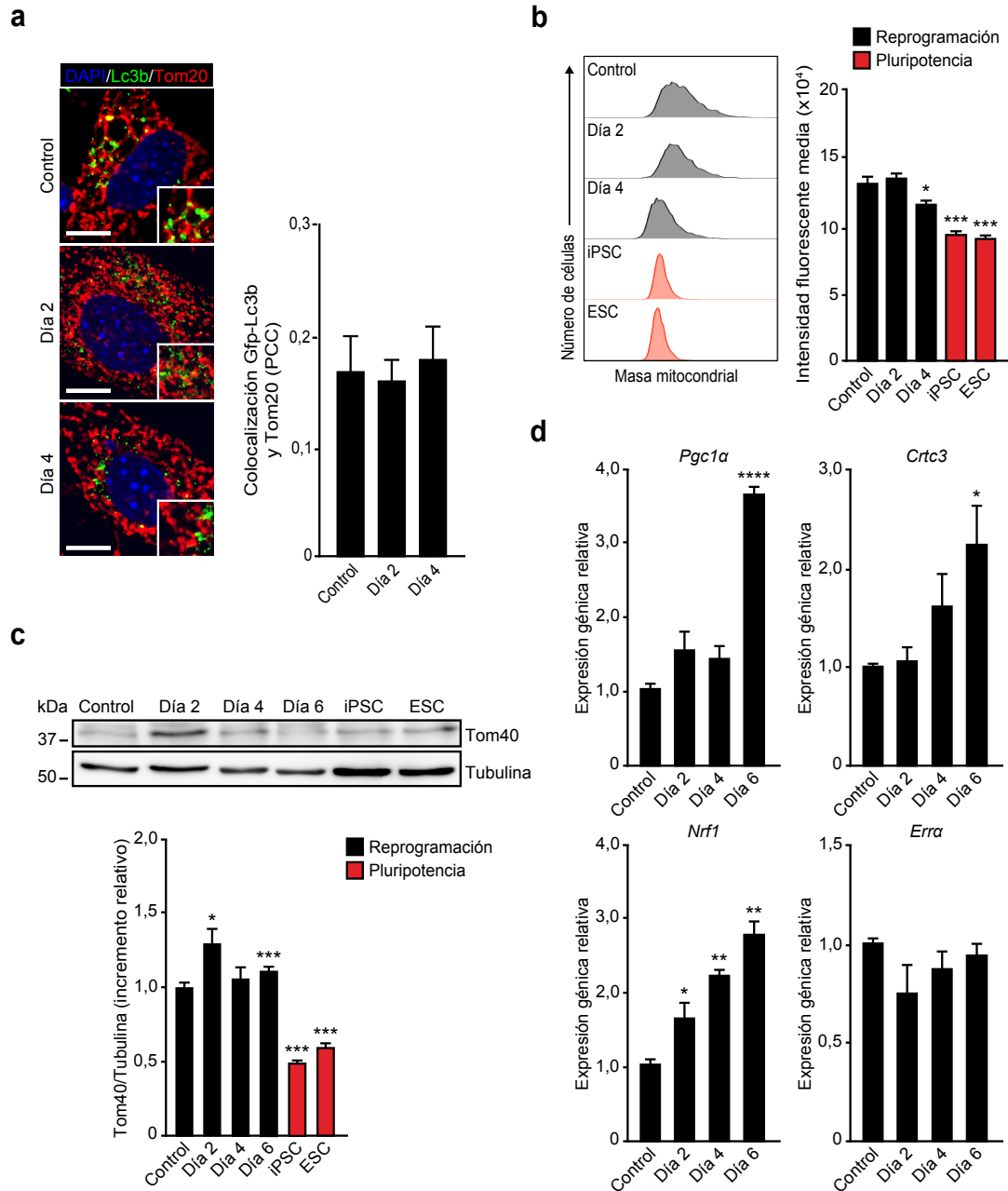


Figura 22. La fisión mitocondrial no está asociada a mitofagia durante la reprogramación celular.

(a) Paneles de la izquierda, imágenes representativas de microscopía confocal de MEF transducidos y tratados como en la Fig. 21a que fueron analizados por inmunofluorescencia con anticuerpo anti-Tom20 (rojo). Los recuadros inferiores muestran una magnificación de las respectivas imágenes. DAPI (azul) fue utilizado como contraintención nuclear. Barras de escala, 12 μm. Gráfica de la derecha, cuantificación de la colocalización entre Gfp-Lc3b y Tom20 evaluado por el coeficiente de correlación de Pearson (PCC) de ambas tinciones en MEF antes (control) o a los días indicados tras la transducción con OSKM (n = 3). (b) Histograma de la izquierda, análisis por citometría de flujo de la masa mitocondrial de MEF antes (control) o a los días indicados tras la transducción con OSKM, o de las células pluripotentes mostradas incubados con Mitotracker Green FM. Gráfica de la derecha, cuantificación de la intensidad fluorescente media de los histogramas de la izquierda (n = 3). (c) Paneles superiores, lisados celulares de MEF antes (control) o a los días indicados tras la transducción con OSKM, o de las células pluripotentes mostradas fueron analizados por inmunodetección usando los anticuerpos indicados para evaluar la masa mitocondrial. Gráfica inferior, cuantificación de la ratio Tom40/Tubulina (n = 3). (d) El RNA de MEF antes (control) o a los días indicados tras la transducción con OSKM fue aislado, y la expresión de genes marcadores de

biogénesis mitocondrial fue evaluada por qPCR y representada como expresión génica relativa a MEF control (n = 3). Los datos están representados como la media \pm SEM (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$). La prueba t-Student de una cola fue utilizada para comparar los conjuntos de datos.

La mitofagia fue medida en forma de colocalización entre Gfp-Lc3b y Tom20, la cual no varió durante los primeros días de la reprogramación (Fig. 22a). Sin embargo, sí se detectó una suave reducción mitocondrial por citometría de flujo, aunque fue menos evidente por inmunodetección de proteínas (Fig. 22b, c). La expresión de genes implicados en biogénesis mitocondrial mostró un incremento a días más tardíos del proceso de reprogramación celular (Fig. 22d). En conjunto, estos resultados sugieren que la reducción mitocondrial inducida por la transducción con *OSKM* no está asociada a mitofagia mediada por Lc3b.

1.4. La fisión mitocondrial inducida por *OSKM* es dependiente de *Drp1*

Para entender mejor la red génica que controla la dinámica mitocondrial durante la reprogramación celular, se examinó la expresión de los factores implicados en la regulación de este proceso (Otera et al., 2013) en MEF antes o después de la transducción con *OSKM*, y en células pluripotentes. Relativa a su expresión a día cero en MEF, la expresión de los factores de fisión *Gdap1*, *Fis1*, *Mff*, *Mid49* y *Mid51* fue menor en células pluripotentes, a diferencia de *Drp1* que incrementó tres veces su expresión (Fig. 23). En el caso de los factores de fusión, se observó que, respecto a día cero, la expresión de *Opa1* no cambió en células pluripotentes, mientras que la expresión de *Mfn1* y *Mfn2* fue comparable a la de MEF (*Mfn1*) o se redujo más de un 75% (*Mfn2*) (Fig. 23 y siguientes). Curiosamente, la expresión de la mayoría de los factores implicados en la dinámica mitocondrial incrementó su expresión génica durante los primeros días de la reprogramación, reflejando una adaptación temprana de la morfología y función mitocondrial tras la expresión de *OSKM*.

Dado que *Drp1* fue el único factor de fisión que mostró un incremento durante los primeros días del proceso y en células pluripotentes, se especuló que la fisión mitocondrial inducida por *OSKM* siguiera una vía dependiente de esta proteína. Para dilucidar la importancia de esta proteína en el proceso, se llevaron a cabo ensayos de reprogramación celular en los que se inhibió la función de *Drp1* mediante tres aproximaciones experimentales diferentes: RNA de interferencia (Fig. 24), sobreexpresión de *Drp1* con la mutación dominante negativa K38A (Fig. 25a, b) e inhibición química de la actividad enzimática GTPasa de *Drp1* (Fig. 25c, d).

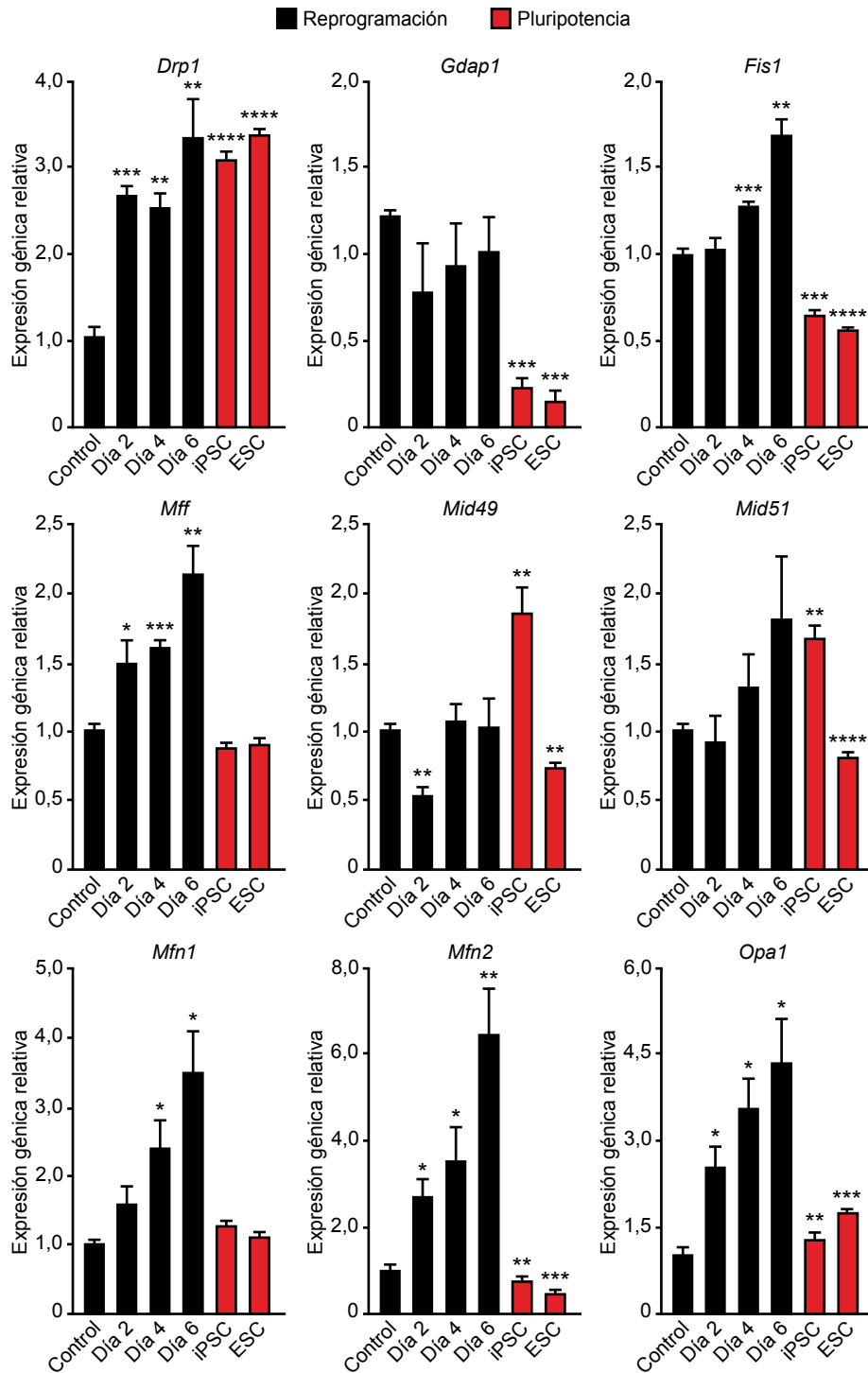


Figura 23. La expresión de *Drp1* se incrementa durante la reprogramación celular y en el estado pluripotente. (a) El RNA de MEF antes (control) o a los días indicados tras la transducción con OSKM (barras negras), o de las células pluripotentes mostradas (barras rojas) fue aislado y la expresión de genes implicados en la dinámica mitocondrial fue evaluada por qPCR y representada como expresión génica relativa a MEF control (n = 3). Los datos están representados como la media \pm SEM (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$). La prueba t-Student de una cola fue utilizada para comparar los conjuntos de datos.

Se evaluó la eficiencia de reprogramación mediante el recuento de colonias positivas para fosfatasa alcalina o AP (del inglés, *alkaline phosphatase*) a día 25 tras la transducción con *OSKM*. La inhibición de la función de Drp1 mediante cualquiera de las 3 aproximaciones: el silenciamiento de la expresión por esiRNA (Fig. 24a), la sobreexpresión del *Drp1* con la mutación K38A o el tratamiento con el inhibidor de Drp1 Mdivi-1 redujo la aparición de colonias positivas para AP en un 35% (Fig. 24b), un 50% (Fig. 25a), y un 100% (Fig. 25c), respectivamente. Además, cada una de estas aproximaciones redujo la fisión mitocondrial inducida por *OSKM* (Fig. 24c, 25b, 25d). En conjunto, estos resultados indican que la fisión mitocondrial inducida durante la fase estocástica de la reprogramación celular es dependiente de Drp1 (Fig. 26).

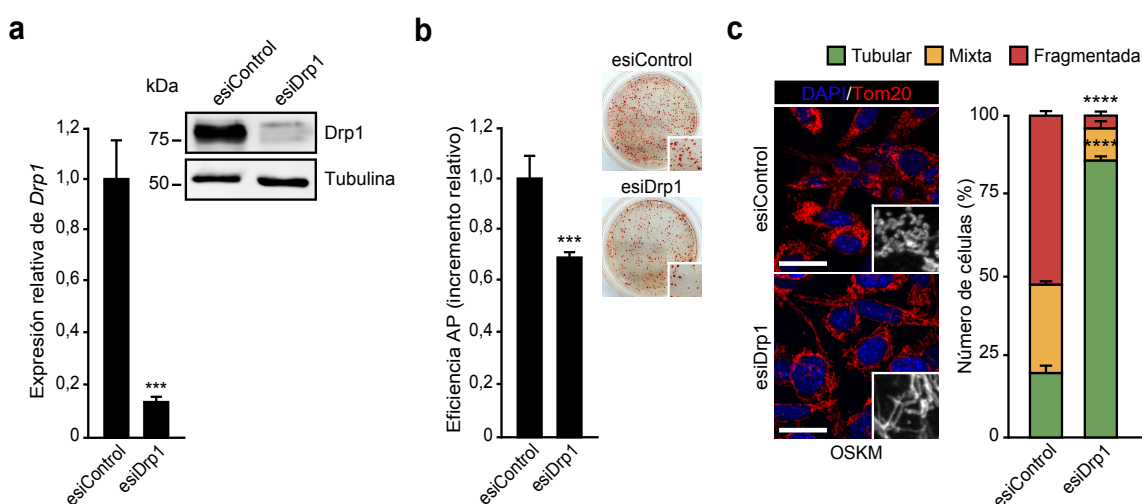


Figura 24. La fisión mitocondrial inducida por la reprogramación celular es dependiente de Drp1. (a) El RNA de MEF transducidos con *OSKM* durante 4 días en presencia de esiRNA control (esiControl) o esiRNA contra *Drp1* (esiDrp1) fue aislado y la expresión de *Drp1* fue analizada por qPCR y representada como expresión génica relativa a esiControl. Paneles de la derecha, lisados celulares de MEF tratados como antes fueron analizados por inmunodetección usando los anticuerpos indicados para evaluar el silenciamiento de *Drp1*. (b) MEF fueron sometidos a un ensayo de reprogramación celular con *OSKM* en presencia de esiControl o esiDrp1. Gráfica de la izquierda, cuantificación de la eficiencia de reprogramación mediante el recuento del número de colonias positivas para AP tras 25 días de la expresión de *OSKM* en presencia de esiControl o esiDrp1 (n = 6). Paneles de la derecha, imágenes representativas de campo claro de las placas de cultivo tras la tinción de AP. Los recuadros inferiores muestran una magnificación de las respectivas imágenes. (c) Células tratadas como en (a) fueron analizadas por inmunofluorescencia 4 días tras la transducción con *OSKM*. Paneles de la izquierda, imágenes representativas de microscopía confocal de células teñidas con anticuerpo anti-Tom20 (rojo). Los recuadros inferiores muestran una magnificación en blanco y negro de las respectivas imágenes. DAPI (azul) fue utilizado como contratinción nuclear. Barras de escala, 24 μ m. Gráfica de la derecha, cuantificación de las diferentes morfologías encontradas en presencia de esiControl o esiDrp1 (n = 3). Los datos están representados como la media \pm SEM (***) $P < 0,001$; ****) $P < 0,0001$). La prueba t-Student de una cola fue utilizada para comparar los conjuntos de datos.

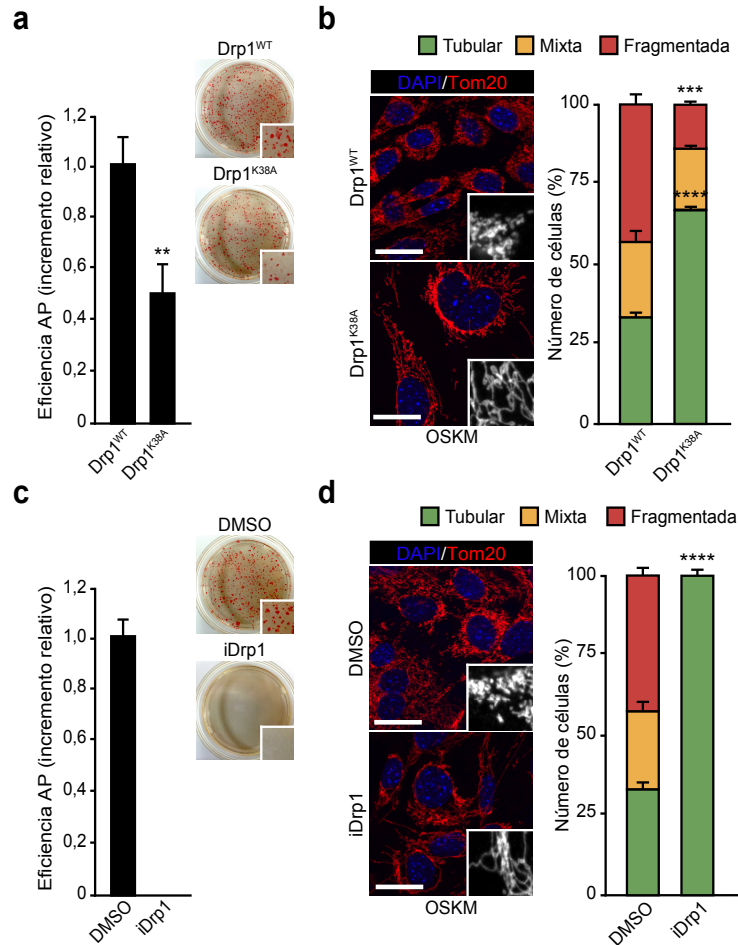


Figura 25. La fisión mitocondrial inducida por la reprogramación celular es dependiente de Drp1. (a) MEF transducidos con *Drp1* tipo silvestre (*Drp1*^{WT}) o con la mutación K38A (*Drp1*^{K38A}) fueron sometidos a un ensayo de reprogramación celular con OSKM. Gráfica de la izquierda, cuantificación de la eficiencia de reprogramación mediante el recuento del número de colonias positivas para AP tras 25 días de la expresión de OSKM en presencia de *Drp1*^{WT} o *Drp1*^{K38A} (n = 3). Paneles de la derecha, imágenes representativas de campo claro de las placas de cultivo tras la tinción de AP. Los recuadros inferiores muestran una magnificación de las respectivas imágenes. (b) Células tratadas como en (a) fueron analizadas por inmunofluorescencia 4 días tras la transducción con OSKM. Paneles de la izquierda, imágenes representativas de microscopía confocal de células teñidas con anticuerpo anti-Tom20 (rojo). Los recuadros inferiores muestran una magnificación en blanco y negro de las respectivas imágenes. DAPI (azul) fue utilizado como contratinción nuclear. Barras de escala, 24 μ m. Gráfica de la derecha, cuantificación de las diferentes morfologías encontradas en presencia de *Drp1*^{WT} o *Drp1*^{K38A} (n = 3). (c) MEF sometidos a reprogramación celular con OSKM fueron tratados con DMSO, como vehículo control, o el inhibidor de Drp1 Mdivi-1 (50 μ M) (iDrp1). Gráfica de la izquierda, cuantificación de la eficiencia de reprogramación mediante el recuento del número de colonias positivas para AP tras 25 días de la expresión de OSKM en presencia de DMSO o Mdivi-1 (n = 3). Paneles de la derecha, imágenes representativas de campo claro de las placas de cultivo tras la tinción de AP. Los recuadros inferiores muestran una magnificación de las respectivas imágenes. (d) Células tratadas como en (c) fueron analizadas por inmunofluorescencia 4 días tras la transducción con OSKM. Paneles de la izquierda, imágenes representativas de microscopía confocal de células teñidas con anticuerpo anti-Tom20 (rojo). Los recuadros inferiores muestran una magnificación en blanco y negro de las respectivas imágenes. DAPI (azul) fue utilizado como contratinción nuclear. Barras de escala, 24 μ m. Gráfica de la derecha, cuantificación de las diferentes morfologías encontradas en presencia de DMSO o Mdivi-1 (n = 3). Los datos están representados como la media \pm SEM (** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$). La prueba t-Student de una cola fue utilizada para comparar los conjuntos de datos.

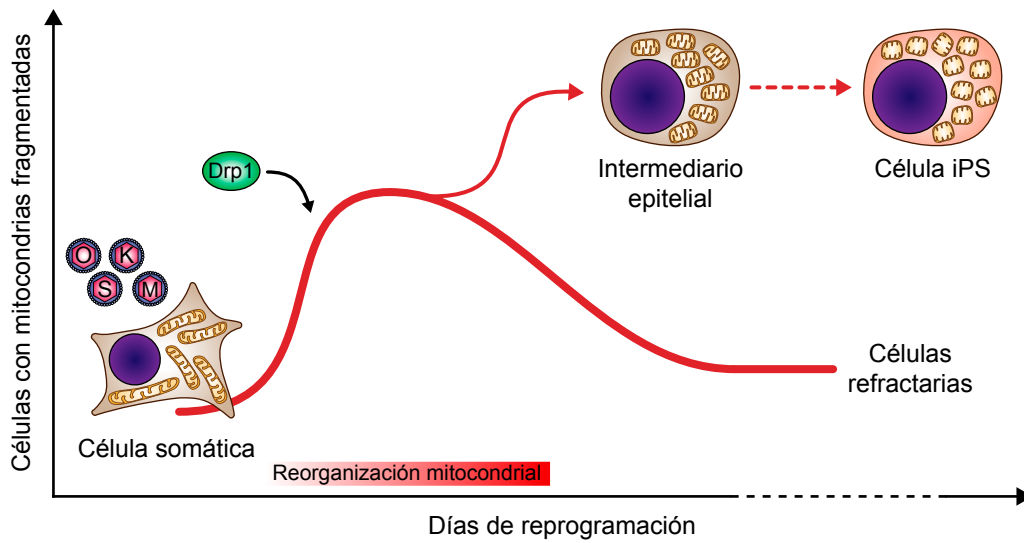


Figura 26. Modelo del papel de la reorganización mitocondrial dependiente de Drp1 durante la fase estocástica de la reprogramación celular. La ilustración representa la reorganización mitocondrial asociada a la reprogramación celular durante la fase estocástica, desde un estado somático con mitocondrias tubulares hasta otro pluripotente con mitocondrias fragmentadas. La línea roja representa la evolución de la población celular con mitocondrias fragmentadas, alcanzando un máximo durante los primeros días de la reprogramación celular y disminuyendo después paulatinamente. Algunas de las células de esta población seguirán su camino hacia la reconversión, pasando por intermediarios epiteliales que presentan una morfología mitocondrial similar a la de células pluripotentes. Este proceso es dependiente de la proteína de fisión mitocondrial Drp1 y no está asociado a la reducción mitocondrial por mitofagia.

Capítulo 2

El eje Dusp6-Erk1/2-Drp1 controla la
fisión mitocondrial durante la fase
estocástica de la reprogramación celular

2.1. La expresión de *OSKM* induce la fosforilación en la Ser579 de Drp1

Se realizó un análisis por cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem o LC-MS/MS de la fracción citosólica y mitocondrial de Drp1 etiquetada con el epítipo Flag en ESC para identificar los residuos fosforilados de esta proteína. Estos experimentos revelaron que la serina 579 era el único residuo fosforilado de Drp1 en la fracción mitocondrial, mientras que Drp1 mostró una amplia variedad de residuos fosforilados en la fracción citosólica (Fig. 27). De hecho, la mayoría de los residuos fosforilados encontrados en la fracción citosólica no han sido descritos previamente, lo que incita a realizar una investigación más exhaustiva de su papel regulador y especificidad celular.

Con estos datos se abordó la posibilidad de que la fosforilación de la serina 579 de Drp1 (Drp1-S579), conocida por favorecer el reclutamiento de la proteína sobre la mitocondria en respuesta a señales de proliferación (Taguchi et al., 2007), jugara un papel en la fragmentación mitocondrial inducida durante la reprogramación celular. Los análisis por inmunodetección de proteínas revelaron que la fosforilación de Drp1-S579, en comparación con MEF, se incrementó notablemente durante la reprogramación celular y en células pluripotentes, mientras que la cantidad de Mfn2 aumentó durante la reprogramación y disminuyó drásticamente en células pluripotentes (Fig. 28a). Estos datos sugieren que durante la fisión mitocondrial inducida por los factores de reprogramación se utiliza un conjunto de proteínas similar al encontrado en células somáticas, y que la dinámica de estos orgánulos en células pluripotentes podría depender de la expresión de *Drp1* y el silenciamiento de *Mfn2*.

De forma notable, los análisis por inmunofluorescencia (Fig. 28b) y fraccionamiento subcelular (Fig. 28c, d) revelaron que la colocalización entre Drp1 y el marcador mitocondrial Tom20 se incrementó durante la reprogramación celular, en comparación con MEF control. Curiosamente, Drp1 mostró una fuerte colocalización con el marcador Tom20 en ESC (Fig. 28b, gráfica de la derecha). En conjunto, estos resultados sugieren que la expresión de *OSKM* estimula el reclutamiento de Drp1 a la mitocondria durante la reprogramación celular a través de la inducción de la fosforilación de Drp1-S579.

a

Identificación proteica					
Fracción	Proteína identificada	Unused	%Cob	%Cob (95%)	Nº Péptidos (95%)
Citosólica	<i>Dynamin-1-like protein</i> (DNM1L)	405,6	97,8299975	86,8200	823
Mitocondrial	<i>Dynamin-1-like protein</i> (DNM1L)	105,39	81,129998	72,1000	115

Modificaciones peptídicas				
Fracción	Residuo modificado	Secuencia	Confianza	Diferencia
Mitocondrial	pSer579	SKPIIMPAS P QK	99,00	0,00369
Citosólica	pSer330, pThr338	DDK S ATLLQLIT K FATEYCN T IEGTAK	97,94	0,00737
Citosólica	pSer647	DTLQ S ELVGQLYK S SLDDLLTESEDMAQR	90,21	0,05967
Citosólica	pSer175	F S NPNSIILAVTAANTDMATSEALK	99,00	0,03330
Citosólica	pSer136	GVSPEPIHLK F SPNVNLTLDLPGMTK	99,00	0,03157
Citosólica	pSer450	IIQH C SNYSTQELLR	99,00	0,02359
Citosólica	pThr479	LPV T NEMVHNLVAIELAYINTK	99,00	0,03727
Citosólica	pSer71, pThr78	QLVH V SQEDK R TTGEENGVEAE E WGK	99,00	-0,01278
Citosólica	pSer175	RF S NPNSIILAVTAANTDMATSEALK	99,00	0,03811
Citosólica	pSer71	RPLILQLVH V SQEDK	99,00	0,00315
Citosólica	pSer579	SKPIIMPAS P QKGHAVNLLDVPV P VAR	99,00	0,00072
Citosólica	pSer579	SKPIIMPAS P QK	99,00	0,00696
Citosólica	pSer136	SPEPIHLK F SPNVNLTLDLPGMTK	99,00	0,05696
Citosólica	pSer656	S SLDDLLTESEDMAQR	99,00	0,03261
Citosólica	pSer616	S YFLIVR	99,00	0,01953
Citosólica	pSer656, pSer657	VGQLYK S SLDDLLTESEDMAQR	97,38	0,07306

b

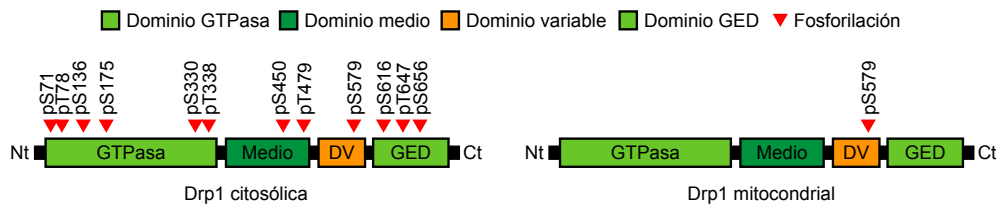


Figura 27. Residuos fosforilados de Drp1 en ESC. (a) Sumario de residuos fosforilados encontrados en la fracción citosólica o mitocondrial de Drp1 por LC-MS/MS. La tabla superior muestra la identificación de proteínas en ambas fracciones subcelulares clasificada por el *Unused ProtScore*. *Unused*, evaluación del parámetro de confianza para la proteína identificada, calculado a partir de la confianza peptídica de péptidos de espectros que no han sido utilizados por las proteínas ganadoras de mayor puntuación; %Cob (cobertura), porcentaje de aminoácidos emparejados de péptidos identificados que muestran una confianza mayor a 0, divididos por el número total de aminoácidos de la secuencia; %Cob (95%), porcentaje de aminoácidos emparejados de las proteínas identificadas que muestran una confianza mayor o igual al 95%, dividido por el número total de aminoácidos en la secuencia. La tabla inferior muestra los detalles de los péptidos identificados y el residuo fosforilado (en rojo) en ambas fracciones subcelulares. Confianza, confianza del péptido identificado; diferencia, diferencia de masa entre el peso molecular del precursor y el peso molecular teórico de la secuencia peptídica emparejada. (b) Diagrama que representa los residuos fosforilados sobre los diferentes dominios de Drp1 en su fracción citosólica (diagrama de la izquierda) o en su fracción mitocondrial (diagrama de la derecha) en ESC identificados por LC-MS/MS.

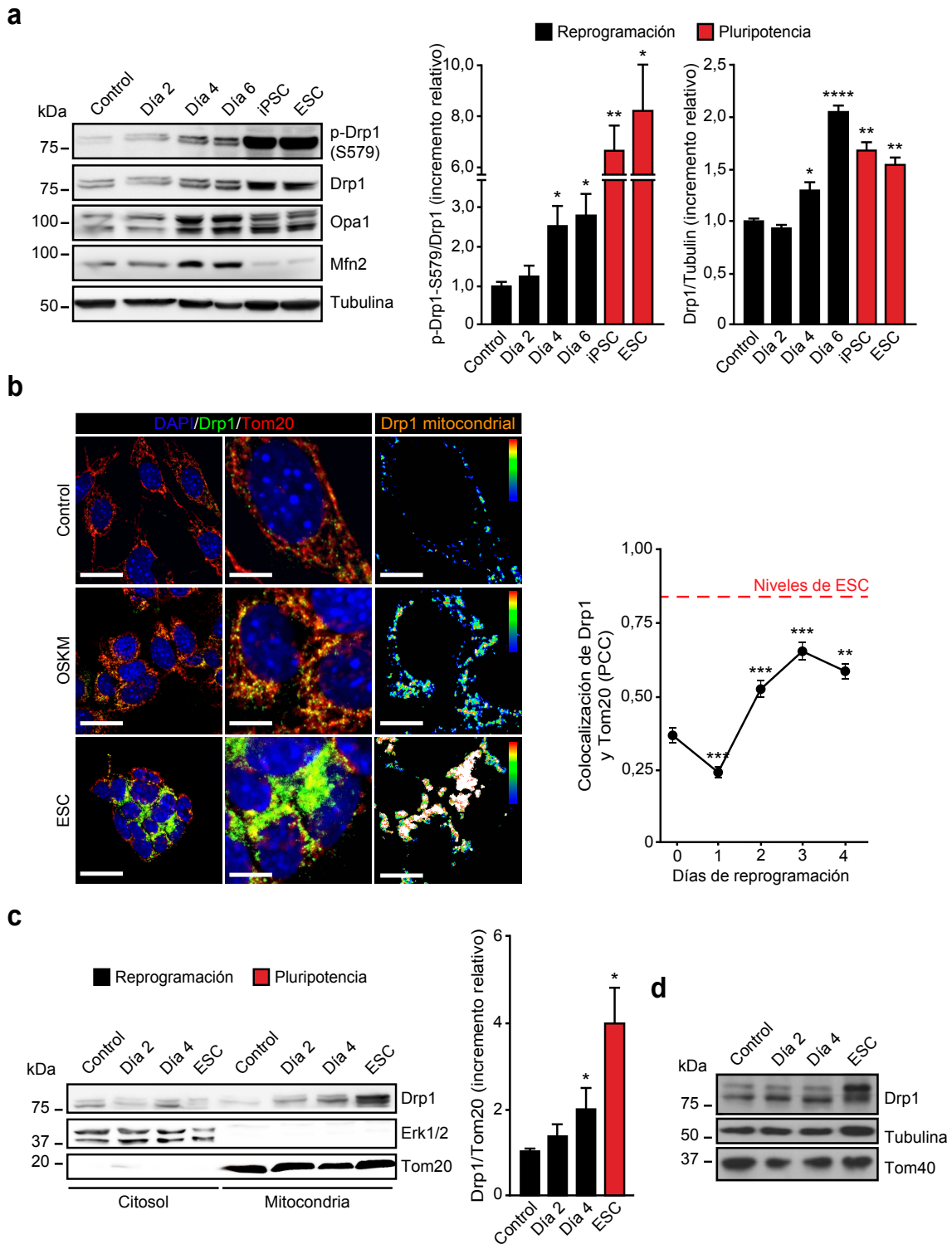


Figura 28. La reprogramación celular induce la fosforilación de Drp1-S579 y su reclutamiento sobre la mitocondria. (a) Paneles de la izquierda, lisados celulares de MEF antes (control) o a los días indicados tras la transducción con *OSKM*, o de las células pluripotentes mostradas fueron analizados por inmunodetección usando los anticuerpos indicados. Gráficas de la derecha, cuantificación de las ratios indicadas ($n = 3$). (b) Paneles de la izquierda, imágenes representativas de microscopía confocal de MEF antes (control, paneles superiores) o 4 días tras la transducción con *OSKM* (paneles centrales), o de ESC (paneles inferiores) teñidas con anticuerpos anti-Tom20 (rojo) y anti-Drp1 (verde). DAPI (azul) fue utilizado como contratiñencia nuclear. Los paneles centrales muestran una magnificación de las imágenes de la

izquierda. Los paneles de la derecha son una representación por colores de las imágenes centrales para mostrar los píxeles que colocalizan entre ambas tinciones de acuerdo a la barra de colores. Los colores cálidos representan píxeles con una alta correlación en intensidad y solapamiento espacial, mientras que los colores fríos son indicativos de aleatoriedad o no correlación. Barras de escala, 24 μm y 12 μm , respectivamente. Gráfica de la derecha, cuantificación del coeficiente de correlación de Pearson (PCC) para evaluar el grado de colocalización entre Drp1 y Tom20 a los días indicados tras la transducción con *OSKM*. La línea punteada roja indica la colocalización entre Drp1 y Tom20 en ESC ($n = 3$). (c) Paneles de la izquierda, MEF antes (control) o a los días indicados tras la transducción con *OSKM*, o ESC fueron lisados y fraccionados en las porciones subcelulares citosólica y mitocondrial. Ambas fracciones fueron analizadas por inmunodetección usando los anticuerpos indicados. Gráfica de la derecha, cuantificación de la ratio Drp1/Tom20 en la fracción mitocondrial ($n = 3$). (d) Paneles mostrando la inmunodetección de las proteínas indicadas en los lisados celulares totales de las células usadas para el fraccionamiento subcelular en (c) como control. Los datos están representados como la media \pm SEM (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$). La prueba t-Student de una cola fue utilizada para comparar los conjuntos de datos.

2.2. La fragmentación mitocondrial inducida por *OSKM* es dependiente de la señalización a través de Erk1/2

Recientemente, se ha descrito que ERK2 fosforila a DRP1-S616 (residuo equivalente a Drp1-S579 en ratón) en células humanas (Kashatus et al., 2015; Serasinghe et al., 2015). Seguidamente, se estudió la posibilidad de que la fosforilación de Drp1-S579 por Erk1/2 pudiera jugar un papel en la fisión mitocondrial inducida por *OSKM*. De hecho, el análisis por inmunodetección de proteínas mostró que la fosforilación de Erk1/2 seguía una cinética paralela a la fosforilación de Drp1-S579 durante los primeros cuatro días de la reprogramación celular (Fig. 29a). Adicionalmente, células transducidas con *OSKM* durante 3 días se incubaron con el inhibidor específico para Mek1/2 PD0325901, observando una disminución de la activación de Erk1/2 y de la fosforilación de Drp1-S579 del 50% y 35%, respectivamente, relativa a células tratadas con DMSO (como vehículo control) (Fig. 29b). Además, el análisis por inmunofluorescencia reveló que la inhibición de Erk1/2 a través del inhibidor de Mek1/2 redujo la fragmentación mitocondrial comparada con células tratadas con DMSO (Fig. 29c). El tratamiento con el inhibidor de Mek1/2 no afectó a las cantidades de Opa1 o Mfn2 (Fig. 29b), sugiriendo que la inhibición de la fisión mitocondrial inducida por *OSKM* se debió a la disminución de la fosforilación de Drp1-S579 por Erk1/2. Apoyando esta idea, la expresión de *Drp1* con la mutación S579D, que mimetiza la fosforilación constitutiva de Ser579, rescató la fragmentación mitocondrial inducida por *OSKM* en células incubadas con el inhibidor, mientras que la forma tipo silvestre de Drp1 no lo hizo (Fig. 29d). Aunque la contribución relativa de Cdk1 a la fosforilación de Drp1-S579 no puede ser descartada, estos resultados sugieren que la activación de Erk1/2 por la expresión de *OSKM* es necesaria para la fisión mitocondrial inducida durante la reprogramación celular.

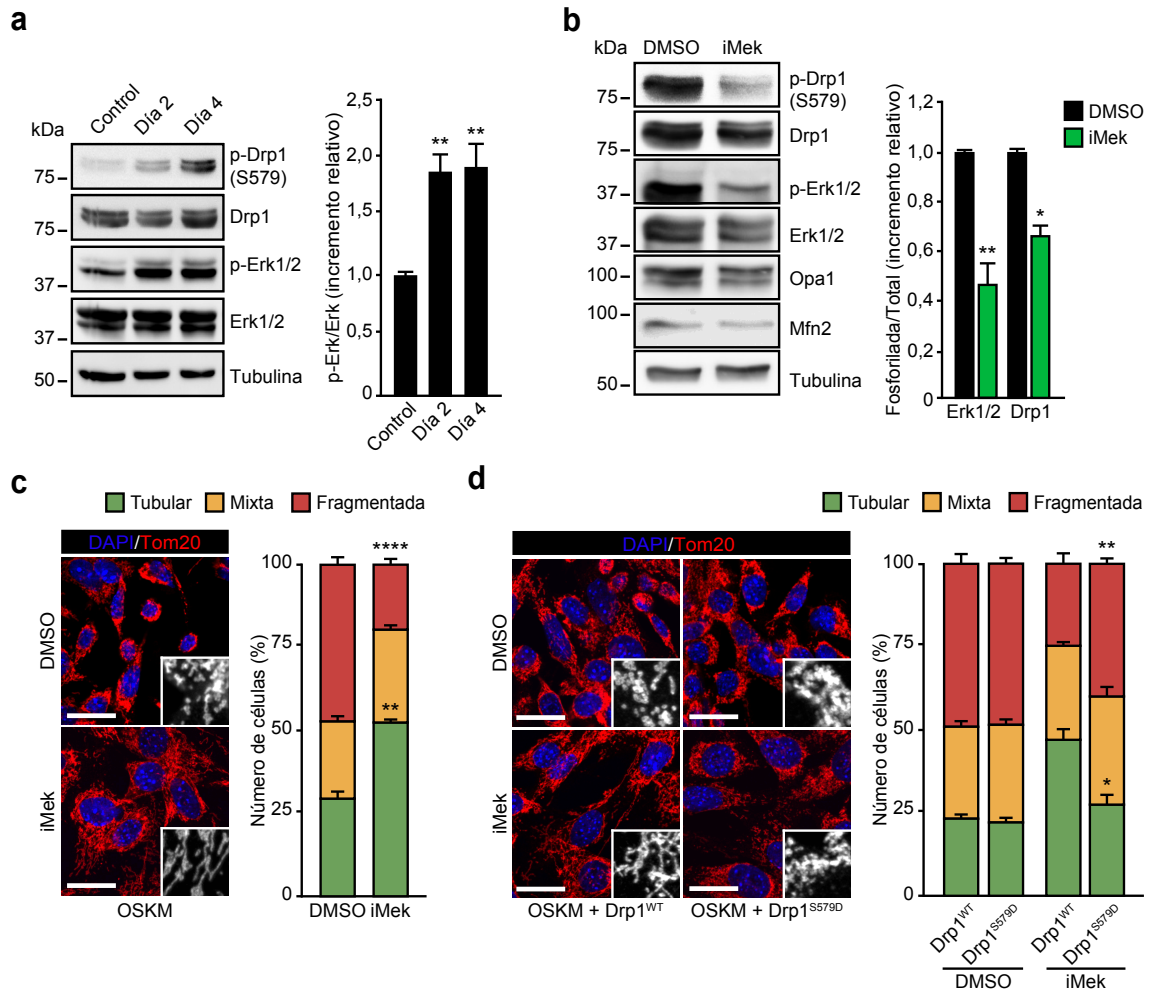


Figura 29. La fisión mitocondrial inducida durante la reprogramación celular depende de la fosforilación de Drp1-S579 por Erk1/2. (a) Paneles de la izquierda, lisados celulares de MEF antes (control) o a los días indicados tras la transducción con *OSKM* fueron analizados por inmunodetección usando los anticuerpos indicados. Gráficas de la derecha, cuantificación de la ratio p-Erk/Erk ($n = 3$). (b) MEF transducidos con *OSKM* durante 3 días fueron tratados con DMSO (barras negras), como vehículo control, o el inhibidor de Mek1/2 PD0325901 (1 μM) (iMek, barras verdes) durante 16 horas. Paneles de la izquierda, los lisados celulares extraídos fueron evaluados por inmunodetección usando los anticuerpos indicados. Gráfica de la derecha, cuantificación de las ratios indicadas ($n = 3$). (c) Paneles de la izquierda, imágenes representativas de microscopía confocal de células tratadas como en (b), fijadas y teñidas con el anticuerpo anti-Tom20 (rojo). Los recuadros inferiores muestran una magnificación en blanco y negro de las respectivas imágenes. DAPI (azul) fue utilizado como contratinción nuclear. Barras de escala, 24 μm . Gráfica de la derecha, cuantificación de las diferentes morfologías encontradas en presencia de DMSO o PD0325901 ($n = 3$). (d) MEF expresando *Drp1* tipo silvestre (*Drp1*^{WT}) o con la mutación S579D (*Drp1*^{S579D}) fueron transducidos con *OSKM*, tratados como en (b), fijados y teñidos como en (c). Paneles de la izquierda, imágenes representativas de microscopía confocal de las células. Los recuadros inferiores muestran una magnificación en blanco y negro de las respectivas imágenes. Barras de escala, 24 μm . Gráfica de la derecha, cuantificación de las diferentes morfologías encontradas en presencia de *Drp1*^{WT} o *Drp1*^{S579D} y/o DMSO o PD0325901 ($n = 3$). Los datos están representados como la media \pm SEM (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; **** $P < 0,0001$). La prueba t-Student de una cola fue utilizada para comparar los conjuntos de datos.

2.3. La fosforilación de Drp1-S579 por Erk1/2 es dependiente del silenciamiento de *Dusp6*

Los miembros de la familia DUSP controlan la actividad intracelular de las MAPK, y la expresión de estas fosfatasas es inversamente proporcional a la actividad MAPK (Caunt and Keyse, 2013; Nunes-Xavier et al., 2013). Curiosamente, se observó que la expresión génica de una de las principales fosfatasas citosólicas de Erk1/2, *Dusp6*, descendió durante los primeros días del proceso (Fig. 30a). Esto sugirió que la activación temprana de la vía ERK podría deberse a la reducción de la expresión de *Dusp6*. De hecho, la sobreexpresión de *Dusp6* durante la transducción con *OSKM* redujo tanto la activación de Erk1/2 como la fosforilación de Drp1-S579 asociada a la expresión de *OSKM* (Fig. 30b). De acuerdo con estos resultados, y relativo a las células control, la sobreexpresión de *Dusp6* redujo un 50% la fragmentación mitocondrial inducida por *OSKM* (Fig. 30c), sin afectar a las cantidades de Opa1 o Mfn2 (Fig. 30b). De forma notable, la co-expresión de *Drp1* con la mutación S579D junto a *Dusp6* durante la reprogramación celular rescató la fisión mitocondrial asociada a la transducción con *OSKM*, mientras que la forma tipo silvestre de Drp1 no lo hizo (Fig. 30d). Además, la adición de *Dusp6* al cóctel de reprogramación redujo un 60% el número de colonias positivas para AP a día 25 del proceso, relativo a células transducidas con vector control (Fig. 30e, gráfica de la izquierda). Un efecto similar fue observado cuando la reprogramación celular se llevó a cabo en presencia del inhibidor de Mek1/2 PD0325901 (Fig. 30e, gráfica de la derecha). En conjunto, estos resultados asocian el silenciamiento de *Dusp6* a la activación temprana de Erk1/2 para dirigir la fragmentación mitocondrial dependiente de Drp1, la cual es necesaria para la reprogramación celular (Fig. 31).

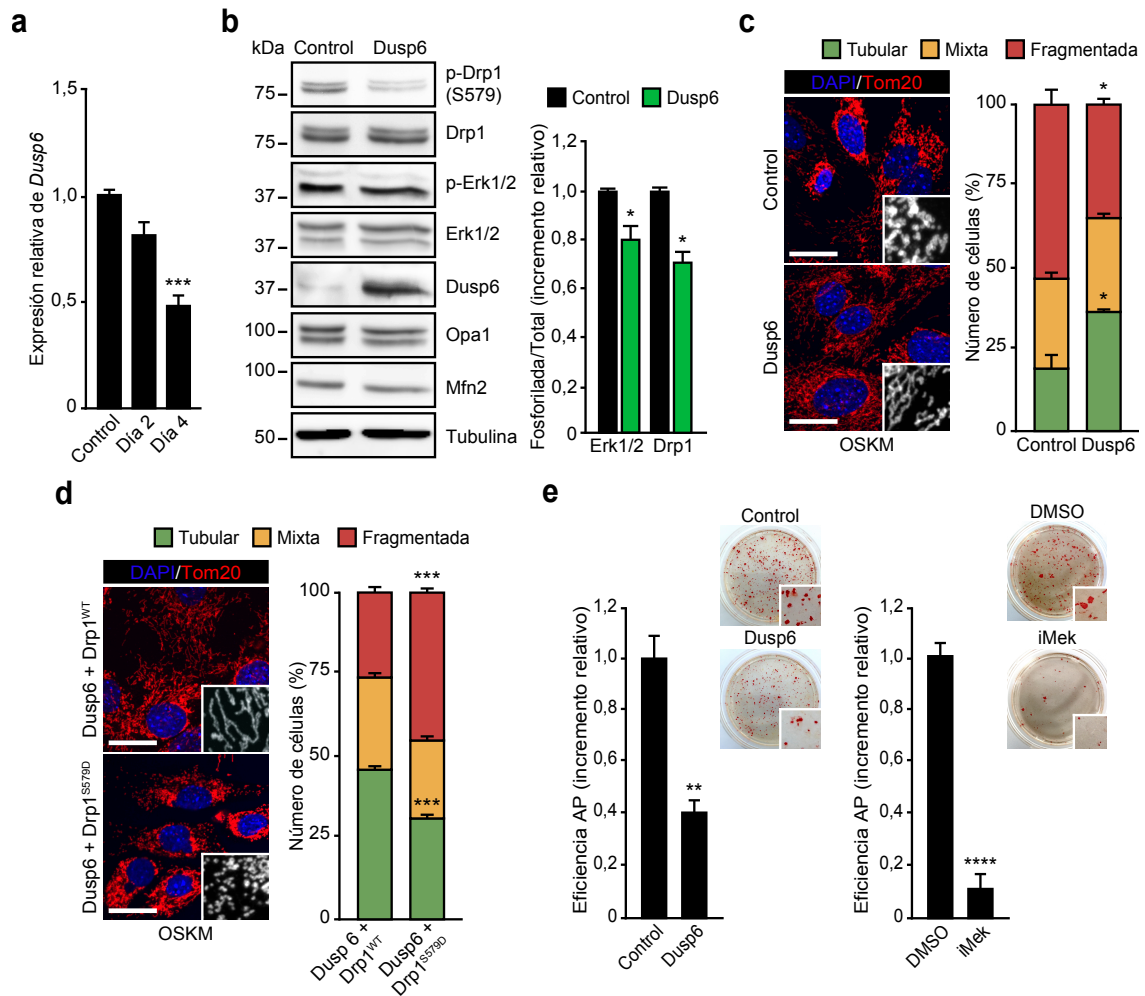


Figura 30. La fosforilación de Drp1-S579 por Erk1/2 depende del silenciamiento de *Dusp6*. (a) El RNA de MEF antes (control) o a los días indicados tras la transducción con OSKM fue aislado y la expresión de *Dusp6* fue evaluada por qPCR y representada como expresión génica relativa a MEF control ($n = 3$). (b) MEF expresando vector control (control, barras negras) o *Dusp6* (barras verdes) fueron transducidos con OSKM durante 4 días. Paneles de la izquierda, los lisados celulares extraídos fueron evaluados por inmunodetección usando los anticuerpos indicados. Gráfica de la derecha, cuantificación de las ratios indicadas ($n = 3$). (c) Paneles de la izquierda, imágenes representativas de microscopía confocal de células tratadas como en (b), fijadas y teñidas con el anticuerpo anti-Tom20 (rojo). Los recuadros inferiores muestran una magnificación en blanco y negro de las respectivas imágenes. DAPI (azul) fue utilizado como contratinción nuclear. Barras de escala, 24 μm . Gráfica de la derecha, cuantificación de las diferentes morfologías encontradas en presencia de vector control o *Dusp6* ($n = 3$). (d) MEF expresando *Dusp6* y *Drp1* tipo silvestre (*Drp1*^{WT}) o con la mutación S579D (*Drp1*^{S579D}) fueron transducidos con OSKM, fijados y teñidos como en (c). Paneles de la izquierda, imágenes representativas de microscopía confocal de las células. Los recuadros inferiores muestran una magnificación en blanco y negro de las respectivas imágenes. Barras de escala, 24 μm . Gráfica de la derecha, cuantificación de las diferentes morfologías encontradas en presencia de *Dusp6* y *Drp1*^{WT} o *Dusp6* y *Drp1*^{S579D} ($n = 3$). (e) MEF tratados como en (b), o con DMSO, como vehículo control, o el inhibidor de Mek1/2 PD0325901 (1 μM) (iMek) fueron sometidos a un ensayo de reprogramación celular con OSKM. Gráficas de la izquierda, cuantificación de la eficiencia de reprogramación mediante el recuento del número de colonias positivas para AP tras 25 días de la expresión de OSKM ($n = 3$). Paneles de la derecha, imágenes representativas de campo claro de las placas de cultivo tras la tinción de AP. Los recuadros inferiores muestran una magnificación de las respectivas imágenes. Los datos están representados como la media \pm SEM (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$). La prueba t-Student de una cola fue utilizada para comparar los conjuntos de datos.

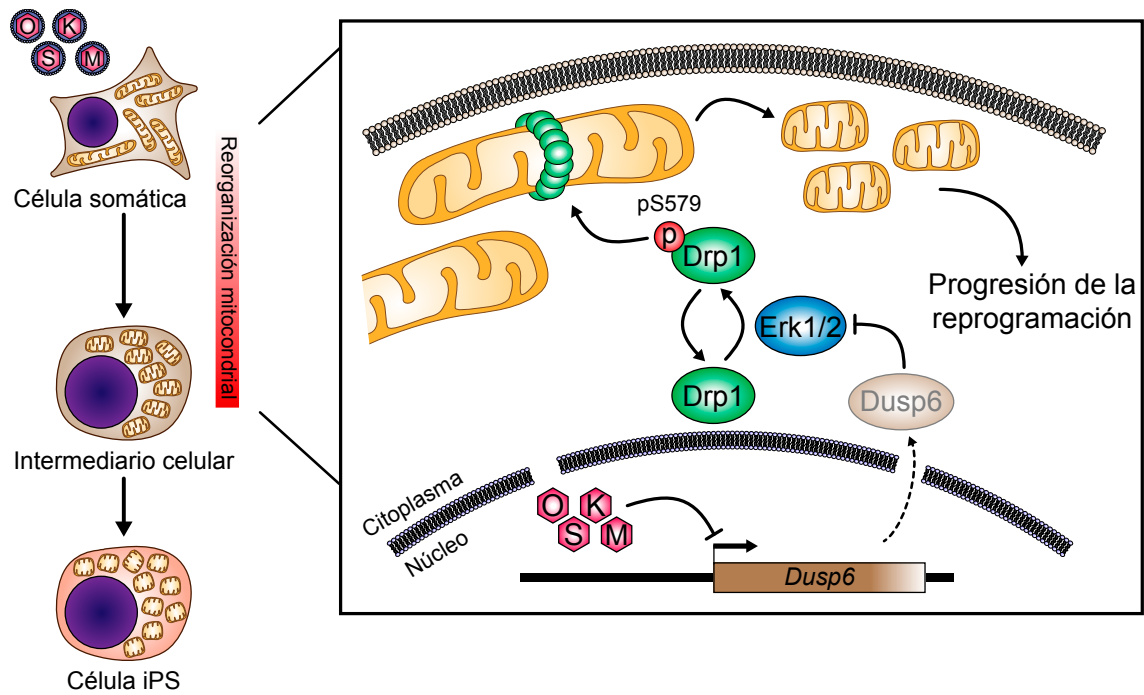


Figura 31. Modelo del papel del eje Dusp6-Erk1/2-Drp1 durante la fase estocástica de la reprogramación celular. La ilustración representa el papel de la señalización a través de Erk1/2 en la activación de Drp1 a través de su fosforilación en la Ser579 durante los primeros días de la reprogramación celular. También se muestra el papel del silenciamiento de *Dusp6* por *OSKM* en la activación de Erk1/2 durante esta fase del proceso.

Capítulo 3

La fisión mitocondrial asociada a la reprogramación celular es dependiente de c-Myc

3.1. La fisión mitocondrial inducida por la reprogramación celular es dependiente de c-Myc

Una vez se describió el proceso de fisión mitocondrial asociado a la reprogramación celular, se trató de elucidar el papel que juegan los factores de Yamanaka en este proceso. Para ello, MEF fueron transducidos con 3 combinaciones diferentes de factores: OSKM, OSK y c-Myc. Las células transducidas con OSK durante 4 días mostraron una morfología mitocondrial tubular similar a la de MEF control, mientras que alrededor del 60% de las células transducidas con OSKM presentaron una morfología fragmentada (Fig. 32a). Curiosamente, la expresión de c-Myc en las células somáticas indujo fisión mitocondrial. Entorno al 70% de las células transducidas con c-Myc presentaron una morfología fragmentada (Fig. 32a), muy similar a la que se observó en células pluripotentes (Fig. 32b). Comparados con los MEF antes o después de ser transducidos con OSK, la fosforilación de Erk1/2 y Drp1-S579 se incrementó alrededor de 2-3 veces en las células transducidas con OSKM o c-Myc (Fig. 32c). Además, se observó que la expresión de OSKM y c-Myc durante 4 días inducía un robusto reclutamiento de Drp1 a la mitocondria, mientras que la colocalización de Drp1 con el marcador mitocondrial Tom20 en las células transducidas con OSK aumentó sólo marginalmente con respecto al control (Fig. 32d).

De acuerdo con los resultados mostrados en el capítulo 2, se observó que las células transducidas con c-Myc durante 3 días e incubadas con el inhibidor de Mek1/2 mostraban una reducción de la fragmentación mitocondrial inducida por c-Myc, una inhibición de la activación de Erk1/2 y un descenso de la fosforilación de Drp1-S579 (Fig. 33a, b). En este sentido, la co-expresión de c-Myc junto a *Drp1* con la mutación S579D, pero no con la forma tipo silvestre de *Drp1*, rescató la fragmentación mitocondrial inducida por c-Myc (Fig. 33c). Curiosamente, la expresión de *Dusp6* sólo se redujo un 25% en células transducidas con OSK o c-Myc, mientras que lo hizo un 50% en células transducidas con OSKM (Fig. 33d), sugiriendo que los cuatro factores actúan cooperativamente en el silenciamiento de *Dusp6*. En conjunto, estos resultados sugieren que la fisión mitocondrial a través de la fosforilación de Drp1-S579 inducida durante la reprogramación celular es dependiente de la presencia de c-Myc en el cóctel de Yamanaka.

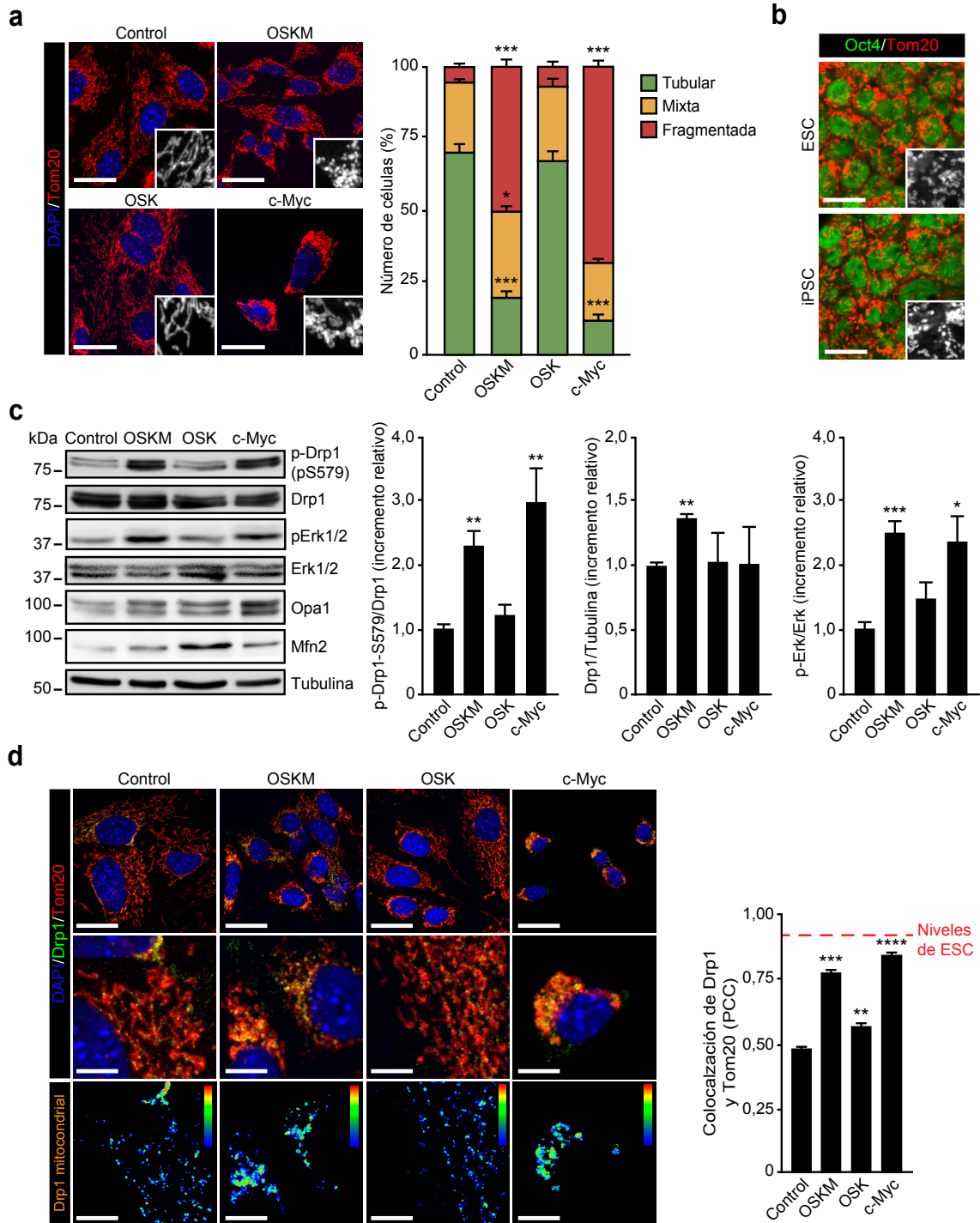


Figura 32. La fisión mitocondrial a través de la fosforilación de Drp1-S579 inducida por OSKM es dependiente de c-Myc. (a) MEF fueron transducidos con OSKM, OSK o c-Myc durante 4 días. Paneles de la izquierda, imágenes representativas de microscopía confocal de las células fijadas y teñidas con anticuerpo anti-Tom20 (rojo). Los recuadros inferiores muestran una magnificación en blanco y negro de las respectivas imágenes. DAPI (azul) fue utilizado como contratinción nuclear. Barras de escala, 24 μ m. Gráfica de la derecha, cuantificación de las diferentes morfologías observadas (n = 3). (b) Imágenes representativas de microscopía confocal de células pluripotentes teñidas con anticuerpos anti-Oct4 (verde) y anti-Tom20 (rojo). Los recuadros inferiores muestran una magnificación en blanco y negro de las respectivas imágenes. Barras de escala, 16 μ m. (c) Paneles de la izquierda, lisados celulares de MEF antes (control) o 4 días tras la transducción con OSKM, OSK o c-Myc fueron analizados por

inmunodetección usando los anticuerpos indicados. Gráficas de la derecha, cuantificación de las ratios indicadas ($n = 3$). (d) Paneles de la izquierda, imágenes representativas de microscopía confocal de MEF antes (control) o 4 días tras la transducción con *OSKM*, *OSK* o *c-Myc* teñidos con anticuerpos anti-Tom20 (rojo) y anti-Drp1 (verde). DAPI (azul) fue utilizado como contratinción nuclear. Los paneles centrales muestran una magnificación de las imágenes superiores. Los paneles inferiores son una representación por colores de las imágenes centrales para mostrar los píxeles que colocalizan entre ambas tinciones de acuerdo a la barra de colores. Los colores cálidos representan píxeles con una alta correlación en intensidad y solapamiento espacial, mientras que los colores fríos son indicativos de aleatoriedad o no correlación. Barras de escala, 24 μm y 12 μm , respectivamente. Gráfica de la derecha, cuantificación del coeficiente de correlación de Pearson (PCC) para evaluar el grado de colocalización entre Drp1 y Tom20 en MEF antes (control) o 4 días tras la transducción con *OSKM*, *OSK* o *c-Myc*. La línea punteada roja indica la colocalización entre Drp1 y Tom20 en ESC ($n = 3$). Los datos están representados como la media \pm SEM (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$). La prueba t-Student de una cola fue utilizada para comparar los conjuntos de datos.

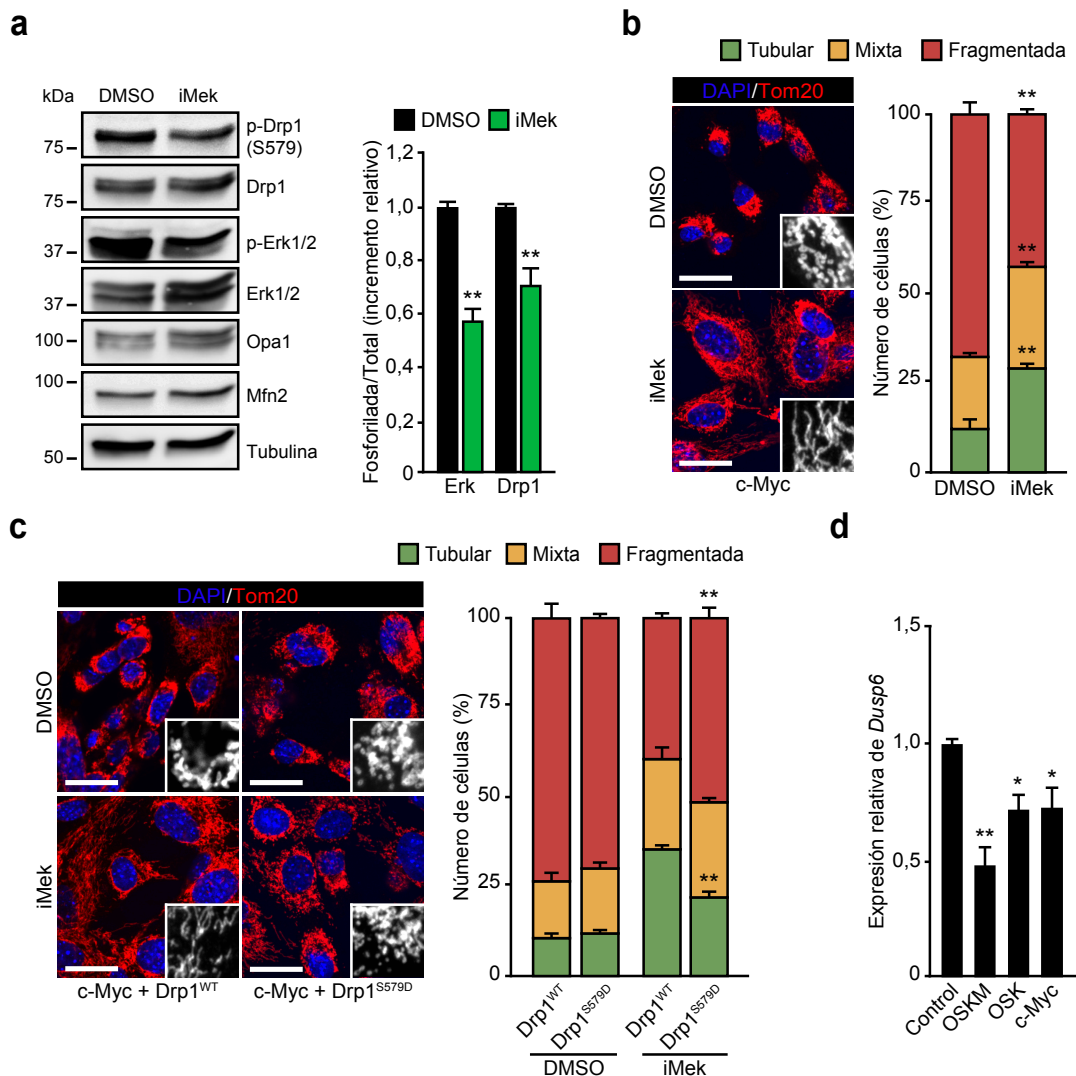


Figura 33. La fosforilación de Erk1/2 inducida durante la reprogramación celular es dependiente de c-Myc. (a) MEF transducidos con *c-Myc* durante 3 días fueron tratados con DMSO (barras negras), como vehículo control, o el inhibidor de Mek1/2 PD0325901 (1 μM) (iMek, barras verdes) durante 16 horas. Paneles de la izquierda, los lisados celulares extraídos fueron evaluados por inmunodetección usando los

anticuerpos indicados. Gráfica de la derecha, cuantificación de las ratios indicadas ($n = 3$). (b) Paneles de la izquierda, imágenes representativas de microscopía confocal de células tratadas como en (a), fijadas y teñidas con el anticuerpo anti-Tom20 (rojo). Los recuadros inferiores muestran una magnificación en blanco y negro de las respectivas imágenes. DAPI (azul) fue utilizado como contratinción nuclear. Barras de escala, 24 μm . Gráfica de la derecha, cuantificación de las diferentes morfologías encontradas en presencia de DMSO o PD0325901 ($n = 3$). (c) MEF expresando *Drp1* tipo silvestre (Drp1^{WT}) o con la mutación S579D ($\text{Drp1}^{\text{S579D}}$) fueron transducidos con *c-Myc*, tratados como en (a), fijados y teñidos como en (b). Paneles de la izquierda, imágenes representativas de microscopía confocal de las células. Los recuadros inferiores muestran una magnificación en blanco y negro de las respectivas imágenes. Barras de escala, 24 μm . Gráfica de la derecha, cuantificación de las diferentes morfologías encontradas en presencia de Drp1^{WT} o $\text{Drp1}^{\text{S579D}}$ y/o DMSO o PD0325901 ($n = 3$). (d) El RNA de MEF antes (control) o 4 días tras la transducción con *OSKM*, *OSK* o *c-Myc* fue aislado y la expresión de *Dusp6* fue evaluada por qPCR y representada como expresión génica relativa a MEF control ($n = 3$). Los datos están representados como la media \pm SEM (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$). La prueba t-Student de una cola fue utilizada para comparar los conjuntos de datos.

3.2. La fosforilación de Drp1-S579 inducida por OSKM es dependiente de Cdk1

La sobreexpresión de *c-Myc* induce la progresión del ciclo celular (Bretones et al., 2015) y el incremento de la proliferación es un marcador de la fase estocástica de la reprogramación celular (Guo et al., 2014; Ruiz et al., 2011; Xu et al., 2013). En este sentido, la expresión de *OSKM* o *c-Myc* incrementó la proliferación celular, mientras que las células que expresaban *OSK* mostraron una tasa de proliferación similar a la exhibida por MEF control (Fig. 34a). La activación transcripcional por *c-Myc* de genes asociados a la progresión del ciclo celular promueven la entrada en el ciclo celular (Bretones et al., 2015). En este sentido, se detectó un incremento en la expresión de los genes *Ccnb1* y *Ccnb2*, durante los primeros días del proceso, aunque sólo *Ccnb1* mantuvo un alta expresión en células pluripotentes (Fig. 34b). Los genes *Ccnb1* y *Ccnb2* codifican para las proteínas Ciclina B1 y B2, respectivamente, necesarias para la transición G2/M del ciclo celular. En este sentido, las cantidades de proteína Ciclina B1 siguió un perfil idéntico durante los primeros días de la reprogramación y en células pluripotentes (Fig. 34c). Curiosamente, y relativo a las células control, la cantidad de proteína Ciclina B1 no cambió en las células transducidas con *OSK* (Fig. 34c). La observación de la existencia de un paralelismo entre el incremento de la expresión de la Ciclina B1 y el aumento de la fosforilación de Drp1-S579 en células transducidas con *OSKM* y *c-Myc* (Fig. 34c) sugirió una correlación entre la proliferación celular y la fisión mitocondrial.

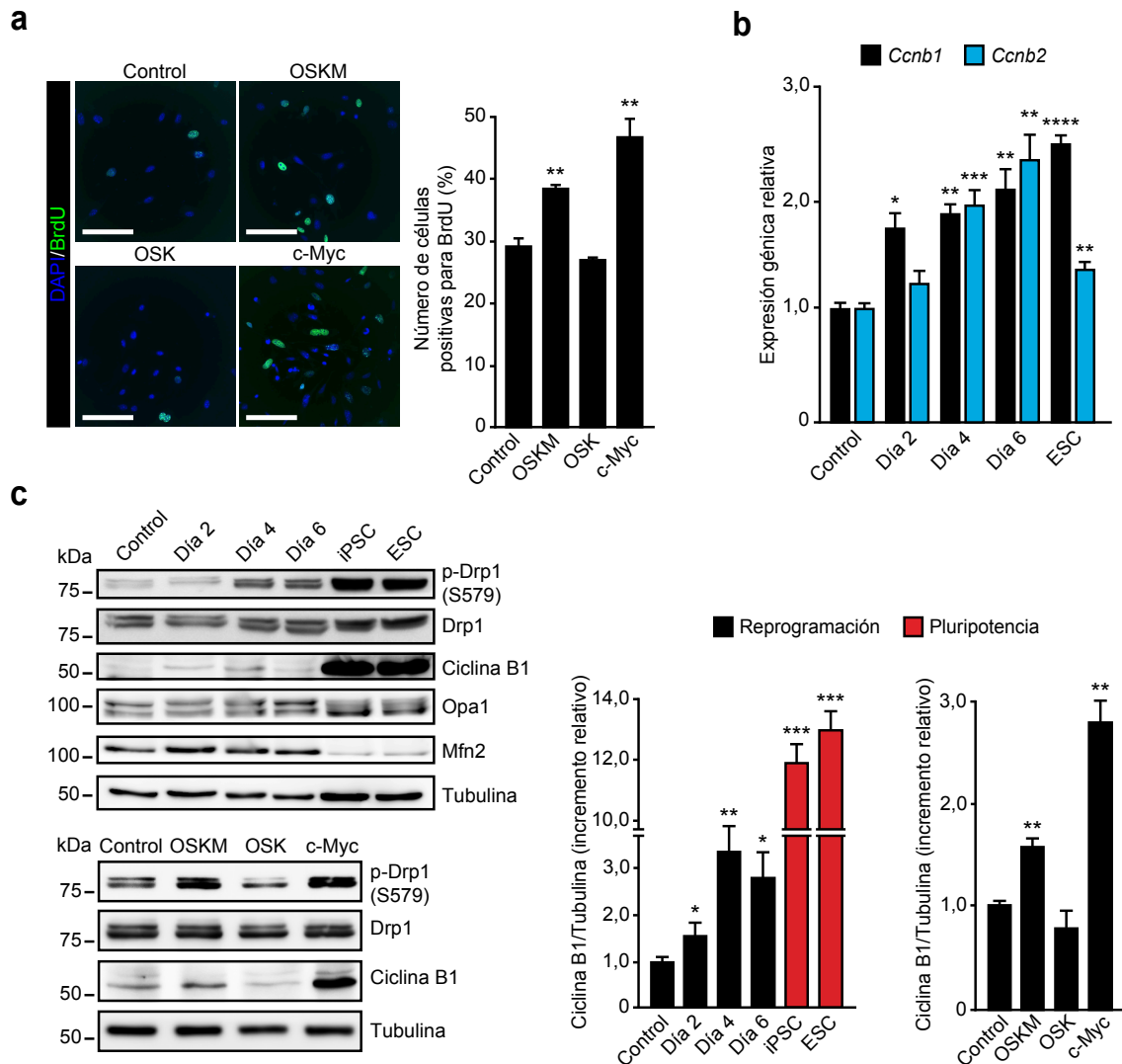


Figura 34. La fisión mitocondrial inducida por c-Myc depende de la fosforilación de Drp1-S579 a través de Cdk1/Ciclina B. (a) MEF fueron transducidos con *OSKM*, *OSK* o *c-Myc* durante 4 días. Las células fueron incubadas con BrdU y fijadas, y la proliferación celular fue evaluada por inmunofluorescencia. Paneles de la izquierda, imágenes representativas de microscopía de fluorescencia de MEF antes (control) o tras la transducción con *OSKM*, *OSK* o *c-Myc* durante 4 días teñidos con anticuerpo anti-BrdU (verde). DAPI (azul) fue utilizado como contratinción nuclear. Barras de escala, 40 μ m. Gráfica de la derecha, cuantificación del número de células positivas para BrdU en MEF antes (control) o 4 días tras la transducción con *OSKM*, *OSK* o *c-Myc* ($n = 3$). (b) El RNA de MEF antes (control) o a los días indicados tras la transducción con *OSKM*, o de las células pluripotentes mostradas fue aislado y la expresión de *Ccnb1* (barras negras) y *Ccnb2* (barras azules) fue evaluada por qPCR y representada como expresión génica relativa a MEF control ($n = 3$). (c) Paneles de la izquierda, lisados celulares de MEF antes (control) o a los días indicados tras la transducción con *OSKM* (paneles superiores), o 4 días tras la transducción con los factores indicados (paneles inferiores) fueron analizados por inmunodetección usando los anticuerpos indicados. Las células pluripotentes mostradas fueron utilizadas como control. Gráficas de la derecha, cuantificación de la ratio Cyclina B1/Tubulina ($n = 3$). Los datos están representados como la media \pm SEM (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$). La prueba t-Student de una cola fue utilizada para comparar los conjuntos de datos.

En relación a esta observación, además de la fosforilación de DRP1-S616 a través de ERK1/2 (Kashatus et al., 2015; Serasinghe et al., 2015), también se ha descrito que el complejo Cdk1/Ciclina B1 fosforila a Drp1-S579 en células de ratón (Taguchi et al., 2007) en un proceso mediado por la proteína RalA (del inglés, *Ras related GTP binding protein A*) y su efector Ralbp1 (del inglés, *RalA binding protein 1*) (Kashatus et al., 2011). Se trató de investigar, pues, si el complejo Cdk1/Ciclina B1 podría participar, junto a Erk1/2, en la fosforilación de Drp1-S579 durante la reprogramación celular. Para ello, se analizó la fosforilación de Drp1-S579 en extractos celulares de MEF transducidos con *OSKM* o *c-Myc* durante 3 días por inmunodetección de proteínas, después de incubar las células con el inhibidor de Cdk1 RO-3306. Relativo a las células tratadas con DMSO, la fosforilación de Drp1-S579 se redujo un 20% en células tratadas con el inhibidor de Cdk1 (Fig. 35a). De acuerdo con esta observación, la fisión mitocondrial inducida por *OSKM* (Fig. 35b) o *c-Myc* (Fig. 35c) se redujo al tratar las células con el inhibidor de Cdk1, pero fue rescatada cuando se co-expresó *Drp1* con la mutación S579D junto a *OSKM* (Fig. 35d) o *c-Myc* (Fig. 35e), en comparación con su co-expresión con la forma tipo silvestre de *Drp1*. El tratamiento con el inhibidor de Cdk1 afectó al proceso de reprogramación celular, reduciendo la eficiencia de conversión de las células transducidas con *OSKM* en un 80% (Fig. 35f). Estos datos sugieren que el complejo Cdk1/Ciclina B1 colabora con Erk1/2 en la activación de Drp1 durante la primera fase de la reprogramación celular, y que dicho proceso es dependiente de *c-Myc* (Fig. 36).

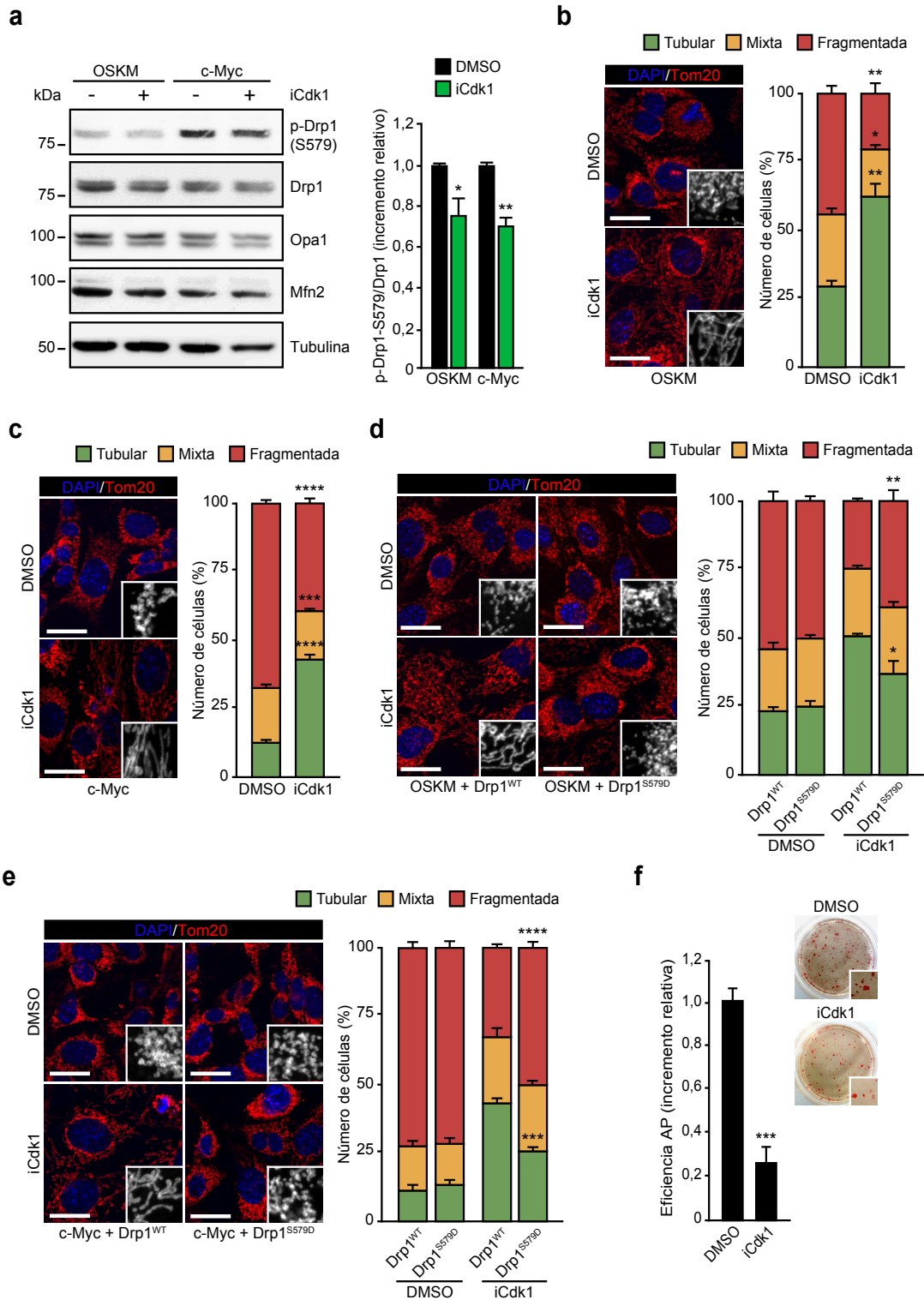


Figura 35. La fisión mitocondrial inducida por c-Myc depende de la fosforilación de Drp1-S579 a través de Cdk1/Ciclina B. (a) MEF transducidos con OSKM o c-Myc durante 3 días fueron tratados con DMSO (barras negras), como vehículo control, o el inhibidor de Cdk1 RO-3306 (10 μ M) (iCdk1, barras verdes) durante 24 horas. Paneles de la izquierda, los lisados celulares extraídos fueron evaluados por inmunodetección usando los anticuerpos indicados. Gráfica de la derecha, cuantificación de la ratio p-Drp1-S579/Drp1 (n = 3). (b, c) Paneles de la izquierda, imágenes representativas de microscopía confocal de células tratadas como en (a), fijadas y teñidas con el anticuerpo anti-Tom20 (rojo). Los recuadros

inferiores muestran una magnificación en blanco y negro de las respectivas imágenes. DAPI (azul) fue utilizado como contratiñencia nuclear. Barras de escala, 24 μm . Gráficas de la derecha, cuantificación de las diferentes morfologías encontradas en presencia de DMSO o RO-3306 ($n = 3$). (d, e) MEF expresando *Drp1* tipo silvestre (Drp1^{WT}) o con la mutación S579D ($\text{Drp1}^{\text{S579D}}$) fueron transducidos con *OSKM* o *c-Myc*, tratados como en (a), fijados y teñidos como en (b, c). Paneles de la izquierda, imágenes representativas de microscopía confocal de las células. Los recuadros inferiores muestran una magnificación en blanco y negro de las respectivas imágenes. Barras de escala, 24 μm . Gráficas de la derecha, cuantificación de las diferentes morfologías encontradas en presencia de Drp1^{WT} o $\text{Drp1}^{\text{S579D}}$ y/o DMSO o RO-3306 ($n = 3$). (f) MEF tratados como en (a) fueron sometidos a un ensayo de reprogramación celular con *OSKM*. Gráfica de la izquierda, cuantificación de la eficiencia de reprogramación mediante el recuento del número de colonias positivas para AP tras 25 días de la expresión de *OSKM* ($n = 3$). Paneles de la derecha, imágenes representativas de campo claro de las placas de cultivo tras la tinción de AP. Los recuadros inferiores muestran una magnificación de las respectivas imágenes. Los datos están representados como la media \pm SEM (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$). La prueba t-Student de una cola fue utilizada para comparar los conjuntos de datos.

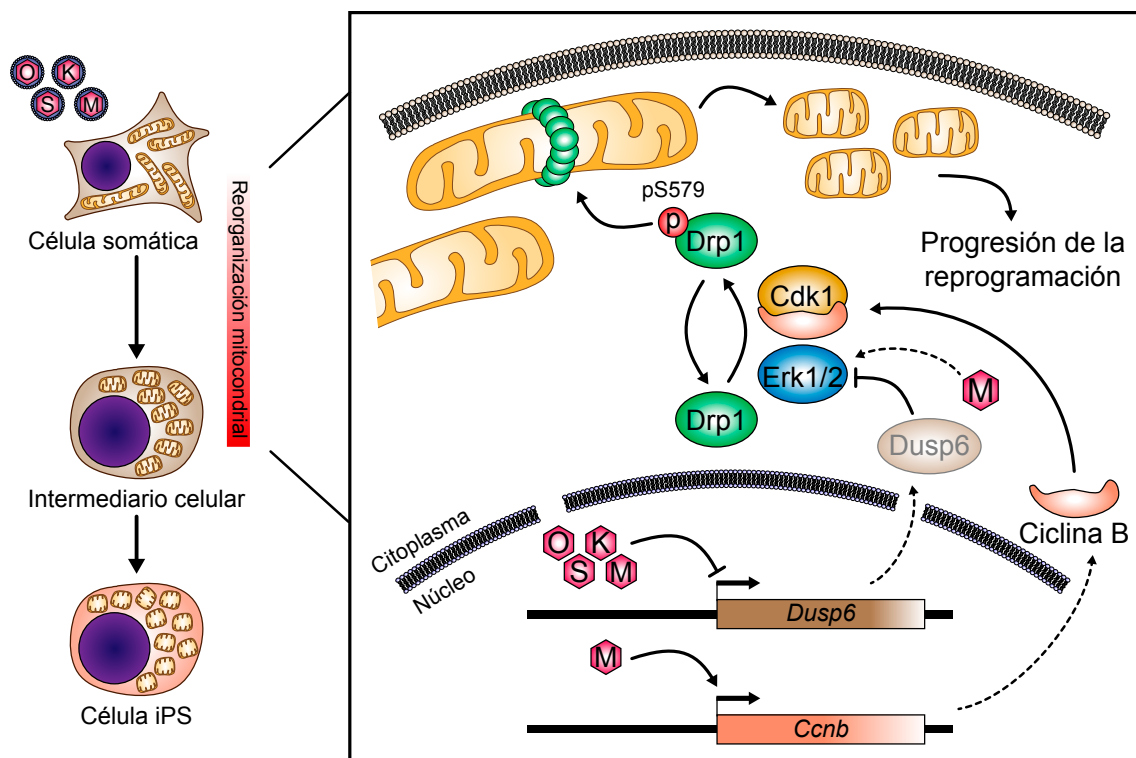


Figura 36. Modelo del papel de la fosforilación de Drp1-S579 dependiente de c-Myc durante la fase estocástica de la reprogramación celular. La ilustración representa la participación del complejo Cdk1/Ciclina B, junto a la señalización a través de Erk1/2, en la fosforilación de Drp1-S579 durante los primeros días de la reprogramación celular. También se muestra el papel de la activación de la expresión de *Ccnb* por c-Myc, junto al silenciamiento de *Dusp6* por OSKM, durante esta fase del proceso. Dado que OSK también participa en el silenciamiento de *Dusp6*, se sugiere algún tipo de estimulación accesoria por parte de c-Myc sobre Erk1/2.

Capítulo 4

El cambio metabólico asociado a la reprogramación celular ocurre simultáneamente a la fisión mitocondrial y es dependiente de c-Myc

4.1. El remodelado metabólico durante la fase estocástica de la reprogramación celular es dependiente de c-Myc

Se ha descrito que durante la reprogramación celular se produce un cambio metabólico, desde un estado somático-oxidativo a un estado pluripotente-glicolítico (Folmes et al., 2011; Panopoulos et al., 2012). Se trató de elucidar la naturaleza y dinámica de este cambio metabólico, y el papel de c-Myc en este proceso. Primeramente, se analizaron las variaciones de los metabolitos en el medio de cultivo de MEF control o transducidos con *OSKM*, *OSK* o *c-Myc* mediante resonancia magnética nuclear (RMN) durante los primeros días del proceso (Fig. 37a). Curiosamente, el análisis de componentes principales de los datos 4 días después de la transducción mostró una robusta agrupación entre las células que expresaban *c-Myc* y las células madre embrionarias, por un lado, y los MEF control y las células que expresaban *OSK*, por otro, indicando que ambos grupos presentaban variaciones metabólicas muy similares (Fig. 37b). El análisis de estas variaciones mostró un mayor consumo de glucosa y glutamina, y una mayor producción de lactato en células transducidas con *c-Myc* y ESC comparado con células transducidas con *OSK* y MEF control (Fig. 37c). Concretamente, la tasa de producción de lactato (Fig. 38a, gráfica de la izquierda) y la tasa de consumo de glucosa (Fig. 38b, gráfica de la izquierda) 4 días después de la transducción se incrementaron en las células transducidas con *OSKM* o *c-Myc*, alcanzando tasas similares a las observadas en ESC. De hecho, se observó un claro paralelismo en la cinética de producción de lactato (Fig. 38a, gráfica de la derecha) y de consumo de glucosa (Fig. 38b, gráfica de la derecha) entre células transducidas con *c-Myc* y ESC, por un lado, y MEF control y células transducidas con *OSK*, por otro. Las células transducidas con *OSKM* reflejaron una cinética intermedia. El análisis de la tasa de consumo de glutamina 4 días después de la transducción reveló un patrón muy similar al del consumo de glucosa (Fig. 38c), no así el de la producción de acetato (Fig. 38d). En conjunto, estos resultados demuestran una inducción de la glucólisis aerobia durante la primera fase de la reprogramación y que dicha activación es dependiente del factor c-Myc.

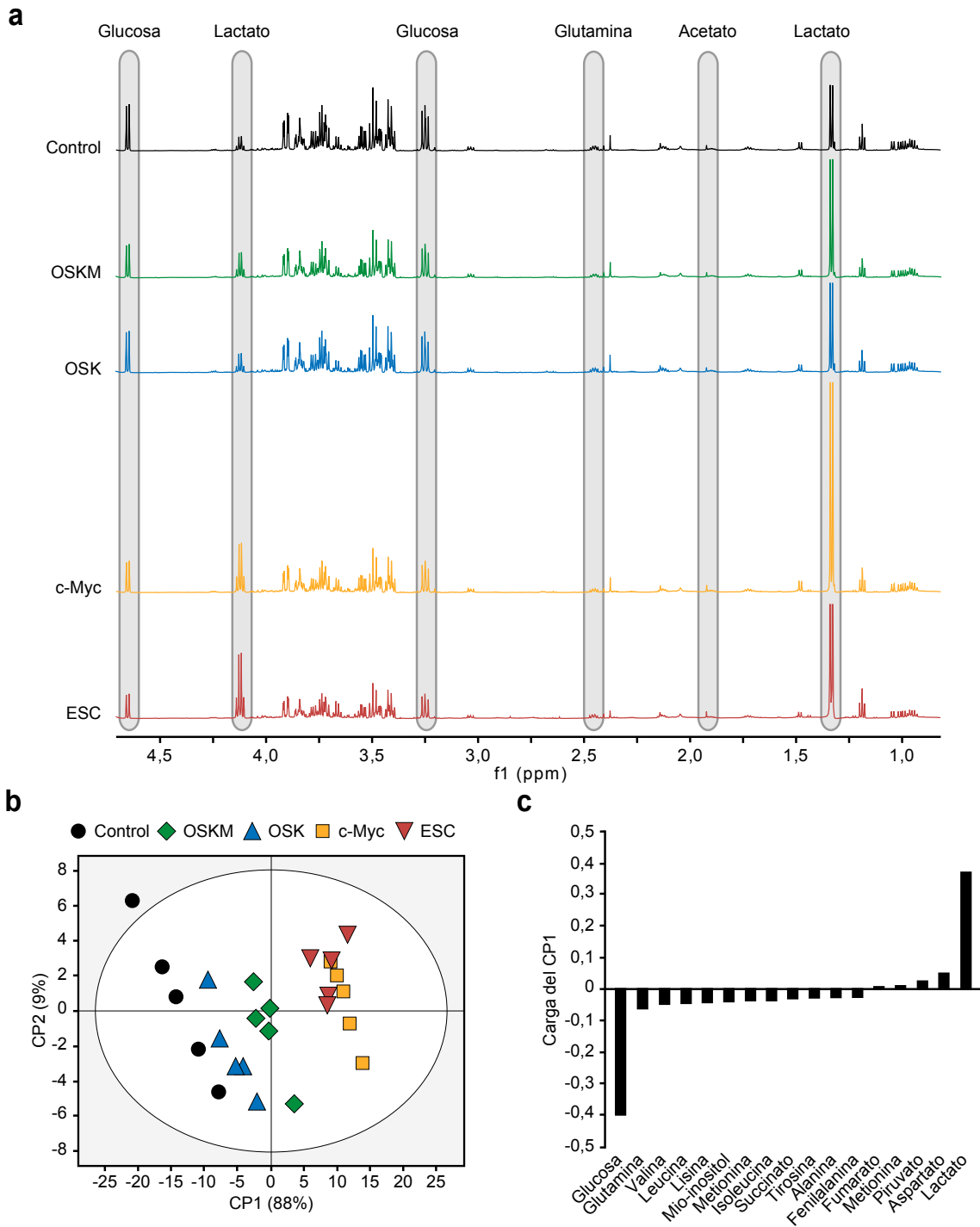


Figura 37. La inducción de la glucólisis durante la fase estocástica de la reprogramación celular es dependiente de c-Myc. (a) MEF fueron transducidos con OSKM, OSK o c-Myc. A día 3 tras la transducción, el medio fue reemplazado. Después, muestras del medio fueron recogidas y analizadas por RMN a 10 (día 3), 24 (día 4), 48 (día 5) y 72 horas (día 6) tras el cambio de medio. Las ESC fueron utilizadas como control. Gráficas, espectros ^1H de RMN de los metabolitos extracelulares de las muestras indicadas a 24 horas (día 4) adquiridos a 500 MHz y 27 °C. En gris se resaltan los picos de los metabolitos más significativos: glucosa, lactato, glutamina y acetato. (b) Análisis de los componentes principales 1 (CP1) y 2 (CP2) de las variaciones de los metabolitos extracelulares de MEF antes (control), o 4 días tras la transducción con OSKM, OSK o c-Myc, o de ESC. PC1: $R^2 = 0,88$, $Q^2 = 0,84$; PC2: $R^2 = 0,08$, $Q^2 = 0,07$ ($n = 5$). (c) Variación de los metabolitos a lo largo del CP1 ($n = 5$).

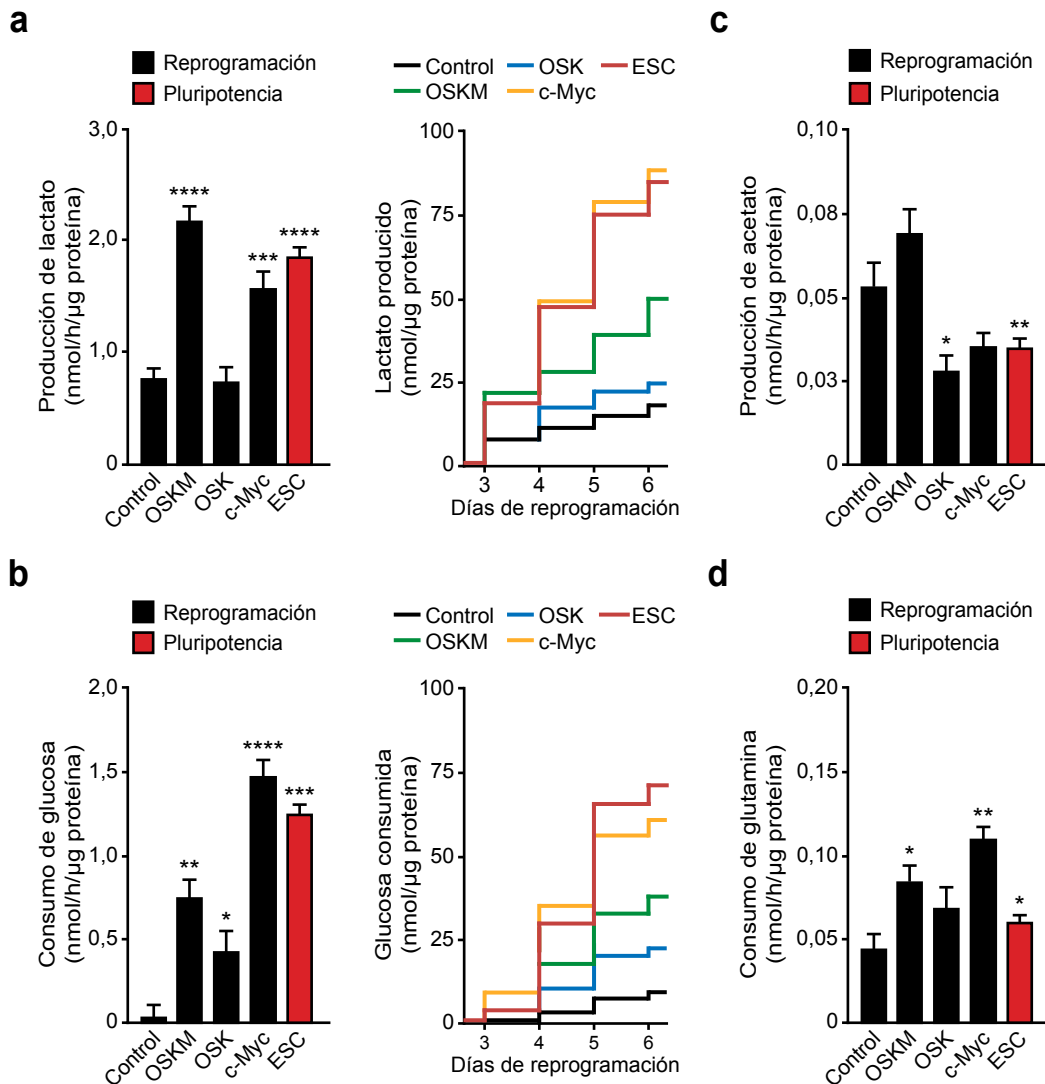


Figura 38. La inducción de la glucólisis durante la fase estocástica de la reprogramación celular es dependiente de c-Myc. (a, b) Gráficas de la izquierda, producción de lactato y consumo de glucosa de MEF antes (control) o 4 días tras la transducción con *OSKM*, *OSK* o *c-Myc* (barras negras), o de las células pluripotentes mostradas (barras rojas). Gráficas de la derecha, evaluación temporal de la producción de lactato y consumo de glucosa de MEF antes (control), o a los días indicados tras la transducción con *OSKM*, *OSK* o *c-Myc*, o de las células pluripotentes mostradas ($n = 5$). (c, d) Producción de acetato y consumo de glutamina de MEF antes (control) o 4 días tras la transducción con *OSKM*, *OSK* o *c-Myc* (barras negras), o de las células pluripotentes mostradas (barras rojas) ($n = 5$). Los datos están representados como la media \pm SEM (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$). La prueba t-Student de una cola fue utilizada para comparar los conjuntos de datos.

Se ha descrito que, durante los primeros días del proceso de reprogramación, las células atraviesan un estado hiperenergético debido a una activación transitoria de la OXPHOS (Kida et al., 2015). Efectivamente, la medición de OCR mediante el sistema Seahorse Analyzer, como indicativo de la actividad OXPHOS, revelaron un pico en el consumo de oxígeno en células transducidas con *OSKM* durante 4 días (Fig.

39a). Para analizar el papel de *c-Myc* en esta rápida transición se cuantificó la OCR en células transducidas con *OSKM*, *OSK* o *c-Myc* (Fig. 39b). Con la excepción de la reserva oxidativa (Fig. 39b, gráfica inferior de la derecha), las células transducidas con *OSKM* y *OSK* mostraron aumentos similares en los parámetros de OCR, en comparación con las células control (Fig. 39b). Curiosamente, MEF transducidos con *c-Myc* mostraron una reducción en todos los parámetros de OCR en comparación con las células control, o transducidas con *OSKM* u *OSK*. Estos datos apoyan la idea de que la presencia de *c-Myc* en el cóctel de reprogramación puede ser la causa de la inhibición de la OXPHOS tras el pico de actividad a día 4 del proceso.

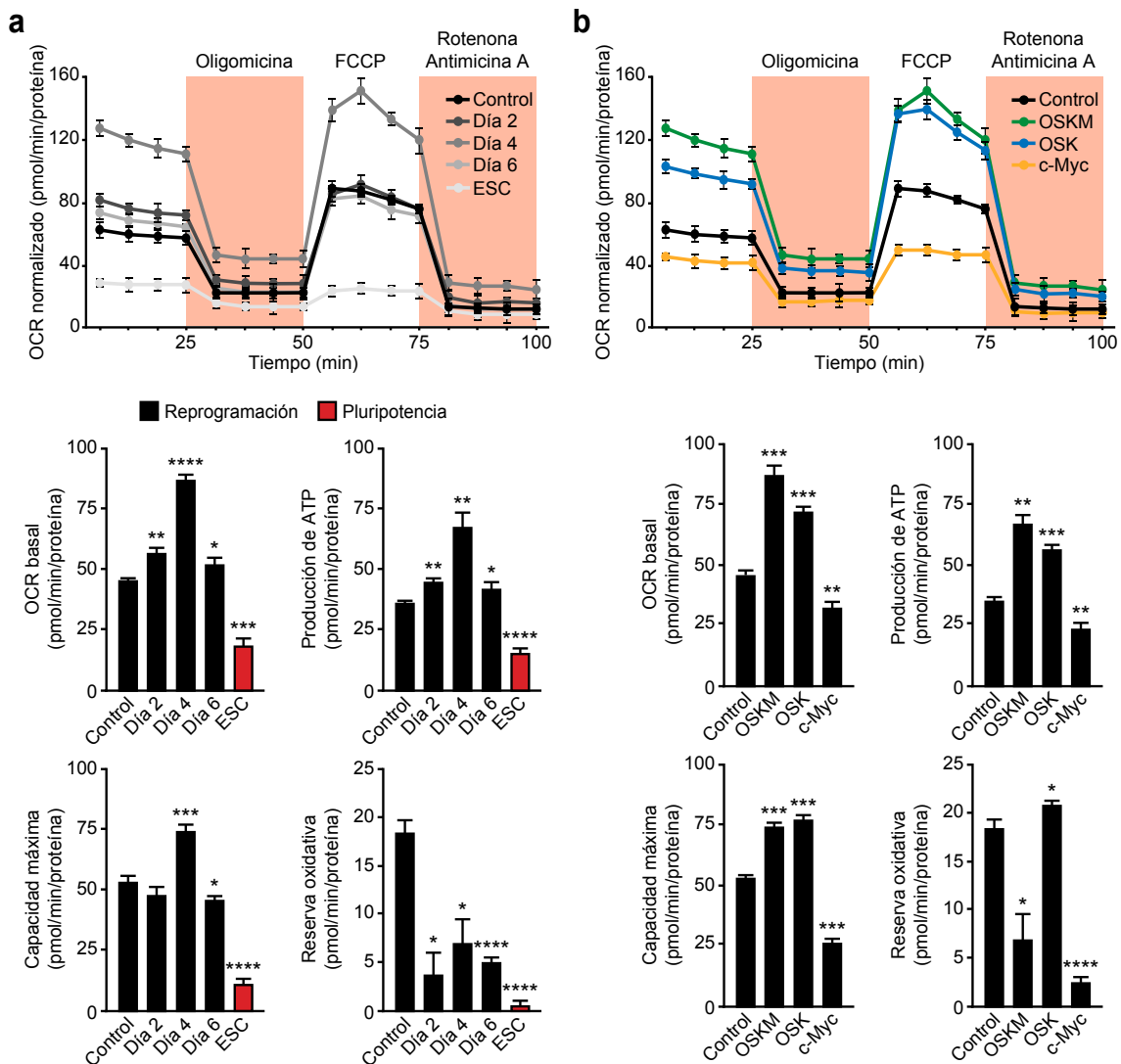


Figura 39. La transición metabólica durante la fase estocástica de la reprogramación celular es dependiente de *c-Myc*. (a, b) Gráficas superiores, las tasas de consumo de oxígeno (OCR) de MEF antes (control) o a los días indicados tras la transducción con *OSKM* (a), o 4 días tras la transducción con los factores indicados (b) fueron cuantificadas mediante el kit Seahorse XF Cell Mito Stress Test. Las ESC

fueron utilizadas como control ($n = 3$). Aunque se muestren por separado, todas las tasas de consumo se obtuvieron durante el mismo análisis. Gráficas inferiores, parámetros de OCR: OCR basal, producción de ATP, capacidad máxima y reserva oxidativa de MEF antes (control) o a los días indicados tras la transducción con *OSKM* (**a**), o 4 días tras la transducción con los factores indicados (**b**). Las ESC fueron utilizadas como control (barras rojas) ($n = 3$). Los datos están representados como la media \pm SEM (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$). La prueba t-Student de una cola fue utilizada para comparar los conjuntos de datos.

4.2. La maquinaria enzimática de la glucólisis y la OXPHOS es inducida por c-Myc

Para investigar en profundidad el papel de c-Myc durante el remodelado metabólico, se analizó la expresión de enzimas que participan en la glucólisis o la OXPHOS durante la reprogramación celular, en presencia o ausencia de c-Myc, mediante chips e inmunodetección de proteínas. El análisis por chips de proteínas reveló un aumento, dependiente del tiempo, de las enzimas glucolíticas (Eno1, Gapdh, Pkm2, Pdhe1 α) y oxidativas (Uqcr2, Cox4, Atp5b) durante los primeros días de la reprogramación celular en células transducidas con *OSKM*. La expresión de estas enzimas en las células pluripotentes mostradas fue elevada (Fig. 40). De acuerdo con estos resultados, mediante inmunodetección de proteínas se observó un aumento de las enzimas glucolíticas Hk1, Hk2, Pkm1/2, Ldha y Gapdh durante la reprogramación celular (Fig. 41, paneles superiores de la izquierda). El análisis de células transducidas con *OSKM*, *OSK* o *c-Myc* evidenció que dicho aumento era dependiente de c-Myc (Fig. 41, paneles superiores de la derecha). Esta cinética y su dependencia de c-Myc fue similar para las subunidades proteicas Nduf3 y Sdha de los complejos I y II de la cadena de transporte electrónico, respectivamente (Fig. 42): las cantidades de estas enzimas aumentaron durante los primeros días de la reprogramación celular (Fig. 42, paneles superiores), y en células transducidas con *OSKM* y *c-Myc* durante 4 días (Fig. 42, paneles inferiores). Curiosamente, la cantidad de Hk1 aumentó durante la primera fase del proceso, pero fue baja en ESC (Fig. 41), apoyando la idea de un cambio dependiente de c-Myc en la expresión de las diferentes isoformas de la hexoquinasa entre el estado somático y el pluripotente (Folmes et al., 2011). En resumen, estos datos sugieren que la presencia de c-Myc durante la reprogramación celular aumenta la expresión de las enzimas glucolíticas y oxidativas.

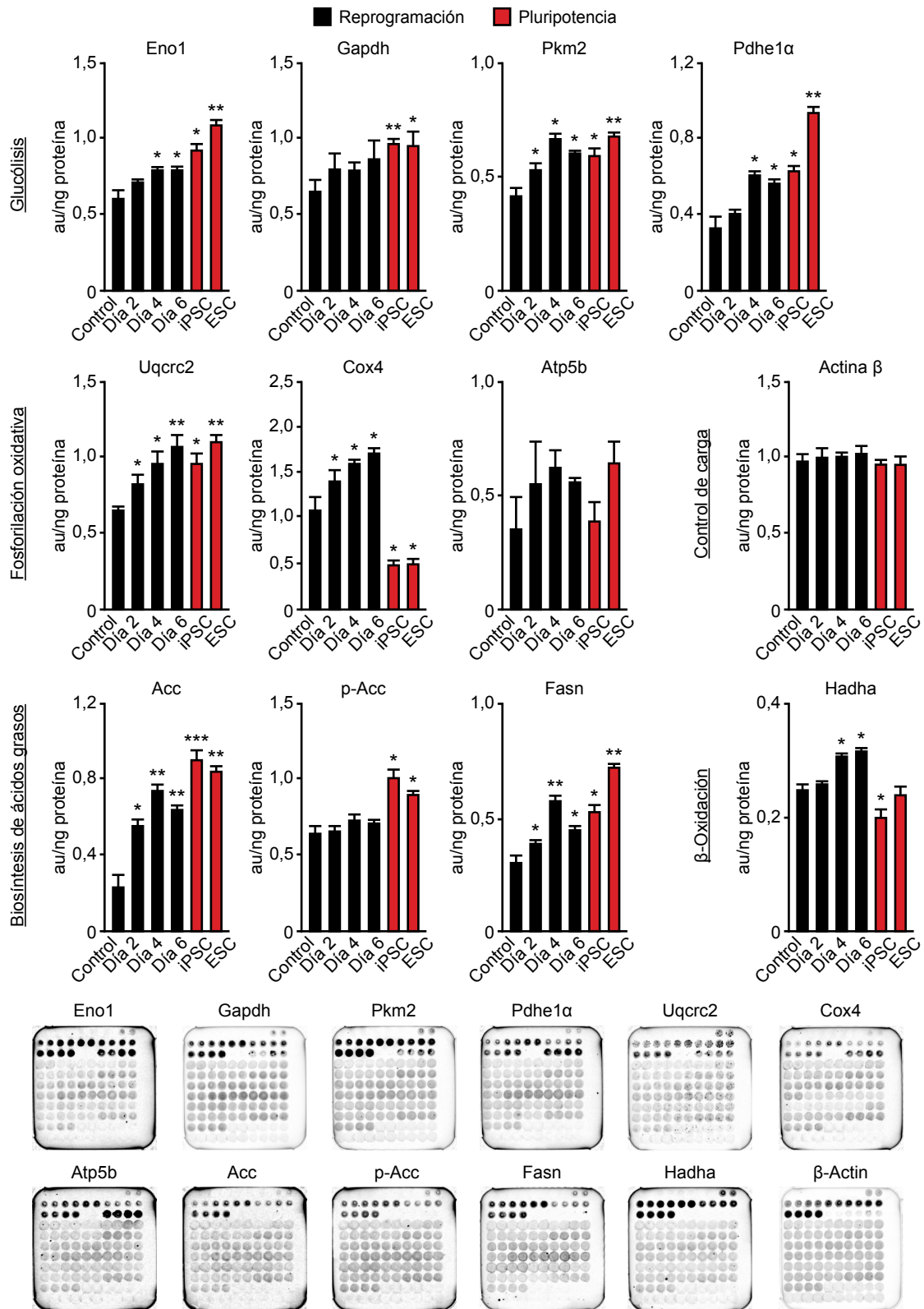


Figura 40. El cambio enzimático de la conversión metabólica comienza durante la fase estocástica de la reprogramación celular. Lisados celulares de MEF antes (control) o a los días indicados tras la transducción con *OSKM* (barras negras), o de las células pluripotentes mostradas (barras rojas) fueron analizados mediante chips de proteínas. Gráficas superiores, cuantificación de la cantidad de las proteínas indicadas (n = 4). Paneles inferiores, imágenes de los chips analizados. El orden de las

muestras de izquierda a derecha y de arriba a abajo en cada chip es: BSA (5 replicas), control HCT116 (10 replicas), control BT549 (8 replicas), control anticuerpos de ratón (6 replicas), MEF (8 replicas), OSKM día 2 (8 replicas), OSKM día 4 (8 replicas), OSKM día 6 (8 replicas), ESC (8 replicas) e iPSC (8 replicas). Los datos están representados como la media \pm SEM (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$). La prueba t-Student de una cola fue utilizada para comparar los conjuntos de datos.

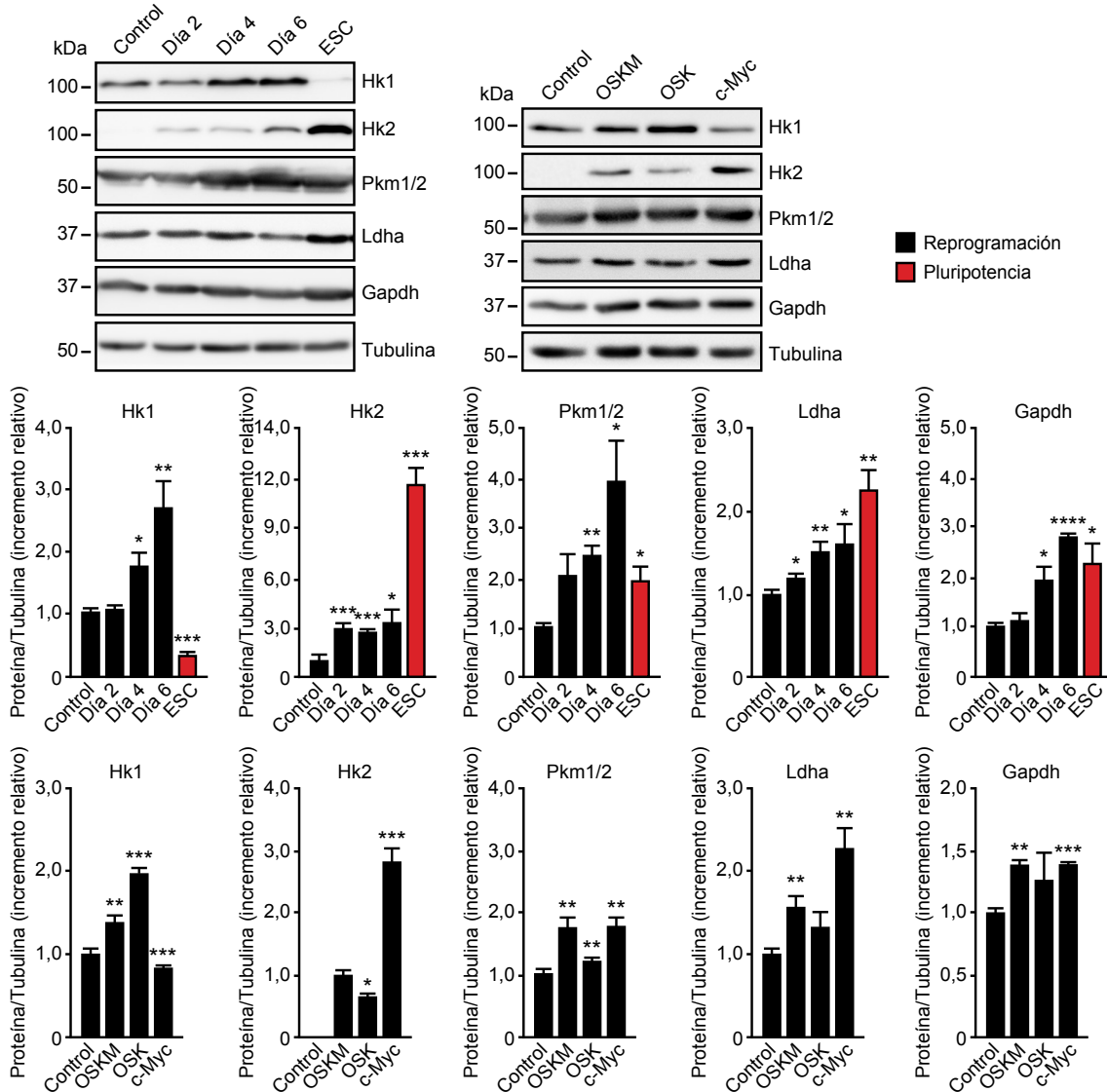


Figura 41. La inducción de la maquinaria enzimática de la glucólisis durante la reprogramación celular es dependiente de c-Myc. Paneles superiores, lisados celulares de MEF antes (control) o a los días indicados tras la transducción con OSKM (paneles de la izquierda), o 4 días tras la transducción con los factores indicados (paneles de la derecha) fueron analizados por inmunodetección usando los anticuerpos indicados. Las ESC fueron utilizadas como control (barras rojas). Gráficas inferiores, cuantificación de las ratios indicadas ($n = 3$). Los datos están representados como la media \pm SEM (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$). La prueba t-Student de una cola fue utilizada para comparar los conjuntos de datos.

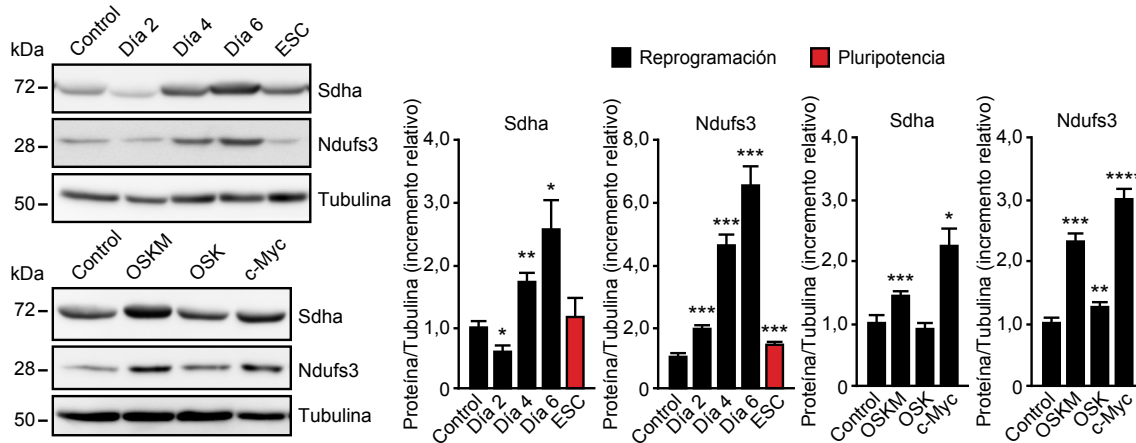


Figura 42. La inducción de la maquinaria enzimática de la OXPHOS durante la reprogramación celular es dependiente de c-Myc. Paneles de la izquierda, lisados celulares de MEF antes (control) o a los días indicados tras la transducción con *OSKM* (paneles superiores), o 4 días tras la transducción con los factores indicados (paneles inferiores) fueron analizados por inmunodetección usando los anticuerpos indicados. Las ESC fueron utilizadas como control (barras rojas). Gráficas de la derecha, cuantificación de las ratios indicadas ($n = 3$). Los datos están representados como la media \pm SEM (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$). La prueba t-Student de una cola fue utilizada para comparar los conjuntos de datos.

4.3. La inhibición de la OXPHOS durante la fase estocástica de la reprogramación celular es dependiente de c-Myc

Los resultados mostrados indican que la expresión de ambos grupos enzimáticos, tanto el glucolítico como el oxidativo, aumenta durante la primera fase de la reprogramación celular de una forma dependiente de c-Myc. Sin embargo, el análisis metabólico reveló que, mientras el aumento de la ruta glucolítica es mantenido en el tiempo, el incremento de la fosforilación oxidativa es frenado bruscamente durante los primeros días de la reprogramación celular en presencia de c-Myc. Este hecho sugirió que la expresión de c-Myc podría generar un déficit de ATP debido a la inhibición de la OXPHOS. Para abordar esta posibilidad, se analizó el grado de activación de Ampk, proteína que juega un papel central en el mantenimiento de la homeostasis energética de la célula y actúa como un sensor de la disponibilidad de ATP (Inoki et al., 2012). De hecho, la activación transitoria de Ampk ha sido descrita durante los primeros días de la reprogramación (Ma et al., 2015). Contrariamente, el análisis por inmunodetección de proteínas mostró una reducción de la actividad Ampk, medida como un descenso en la fosforilación del residuo Thr172 (T172) de la subunidad catalítica alfa o Ampk α , durante los primeros días del proceso y en ESC (Fig. 43a, paneles de la izquierda), y en células transducidas con *OSKM* y *c-Myc* durante 4 días (Fig. 43a, paneles de la derecha). De acuerdo con los resultados del

capítulo 1, estos datos coinciden con la inactivación temprana de la autofagia durante la reprogramación celular, proceso inducido por Ampk (Hardie, 2011), y sugieren que la presencia de c-Myc induce una inactivación de la actividad Ampk durante la primera fase de la reprogramación celular.

Para investigar en mayor profundidad la razón por la cual c-Myc puede inhibir la actividad la OXPHOS, a la vez que induce la expresión de enzimas glucolíticas y oxidativas, se analizó la expresión del factor inhibidor 1 de la ATP sintasa o *Atpif1* (del inglés, *ATP synthase inhibitory factor 1*), un inhibidor fisiológico de la ATP sintasa mitocondrial (Gledhill et al., 2007; Pullman and Monroy, 1963). Curiosamente, y relativo a las células control, la cantidad de proteína (Fig. 43a, paneles de la izquierda) y la expresión de mRNA (Fig. 43b, gráfica de la izquierda) producto del gen *Atpif1* se incrementaron en células transducidas con *OSKM* durante los primeros días de la reprogramación celular y en ESC. Notable fue la observación de que tanto la cantidad de proteína (Fig. 43a, paneles de la derecha) como la expresión de mRNA (Fig. 43b, gráfica de la derecha) producto del gen *Atpif1* se redujeron en células transducidas con *OSK*, pero aumentaron en células transducidas con *OSKM* o *c-Myc* durante 4 días. En este sentido, el silenciamiento de *Atpif1* mediante esiRNA durante los primeros días del proceso redujo un 30% la eficiencia de reprogramación, medida mediante un ensayo de fosfatasa alcalina (Fig. 43c). Estos resultados sugieren que c-Myc remodela el metabolismo oxidativo durante la primera fase de la reprogramación celular en dos pasos: induciendo la expresión de enzimas glucolíticas y oxidativas, primero, e inhibiendo la OXPHOS mediante la expresión de *Atpif1*, después.

Se quiso estudiar la correlación existente entre el aumento de la expresión de *Atpif1* y la inactivación de Ampk. Para ello, MEF transducidos con *OSKM* durante 2 días fueron tratados con metformina, un activador de Ampk. El análisis por inmunodetección de proteínas 4 días tras la transducción reveló una leve activación de Ampk y una reducción del 10% en la cantidad de proteína *Atpif1* (Fig. 44a). Curiosamente, a medida que se trataban a las células transducidas con *OSKM* con metformina a días más tardíos, la eficiencia de reprogramación celular, medida mediante un ensayo de fosfatasa alcalina, se fue reduciendo considerablemente (Fig. 44b). En conjunto, estos datos permiten sugerir una relación entre el aumento de la expresión de *Atpif1* y la inactivación de Ampk, revelando que la inactivación de Ampk durante la fase estocástica del proceso es un paso necesario para la reprogramación celular.

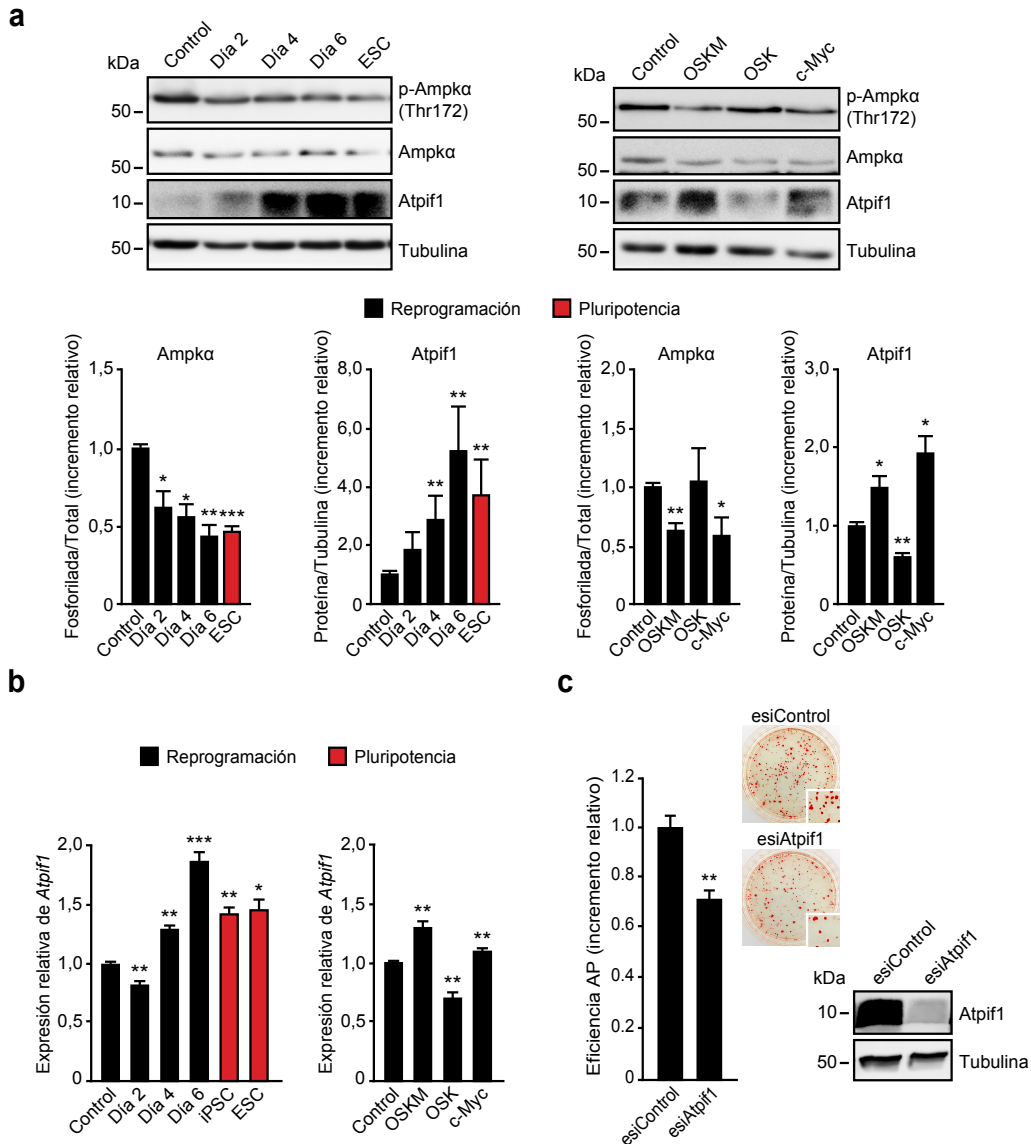


Figura 43. c-Myc induce la inactivación de Ampk y la expresión de *Atpif1* durante la fase estocástica de la reprogramación celular. (a) Paneles superiores, lisados celulares de MEF antes (control) o a los días indicados tras la transducción con *OSKM* (paneles de la izquierda), o 4 días tras la transducción con los factores indicados (paneles de la derecha) fueron analizados por inmunodetección usando los anticuerpos indicados. Las ESC fueron utilizadas como control (barras rojas). Gráficas inferiores, cuantificación de las ratios indicadas ($n = 3$). (b) El RNA de MEF antes (control) o a los días indicados tras la transducción con *OSKM* (gráfica de la izquierda), o 4 días tras la transducción con los factores indicados (gráfica de la derecha) fue aislado y la expresión de *Atpif1* fue evaluada por qPCR y representada como expresión génica relativa a MEF control ($n = 3$). Las ESC fueron utilizadas como control (barras rojas). (c) MEF fueron sometidos a un ensayo de reprogramación celular con *OSKM* en presencia de esiRNA control (esiControl) o esiRNA contra *Atpif1* (esiAtpif1). Gráfica de la izquierda, cuantificación de la eficiencia de reprogramación mediante el recuento del número de colonias positivas para AP tras 25 días de la expresión de *OSKM* en presencia de esiControl o esiAtpif1 ($n = 3$). Paneles superiores de la derecha, imágenes representativas de campo claro de las placas de cultivo tras la tinción de AP. Los recuadros inferiores muestran una magnificación de las respectivas imágenes. Paneles inferiores de la derecha, lisados celulares de MEF tratados como antes fueron analizados a día 6 tras la transducción con *OSKM* por inmunodetección usando los anticuerpos indicados para evaluar el silenciamiento de *Atpif1* ($n = 3$). Los datos están representados como la media \pm SEM (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$). La prueba t-Student de una cola fue utilizada para comparar los conjuntos de datos.

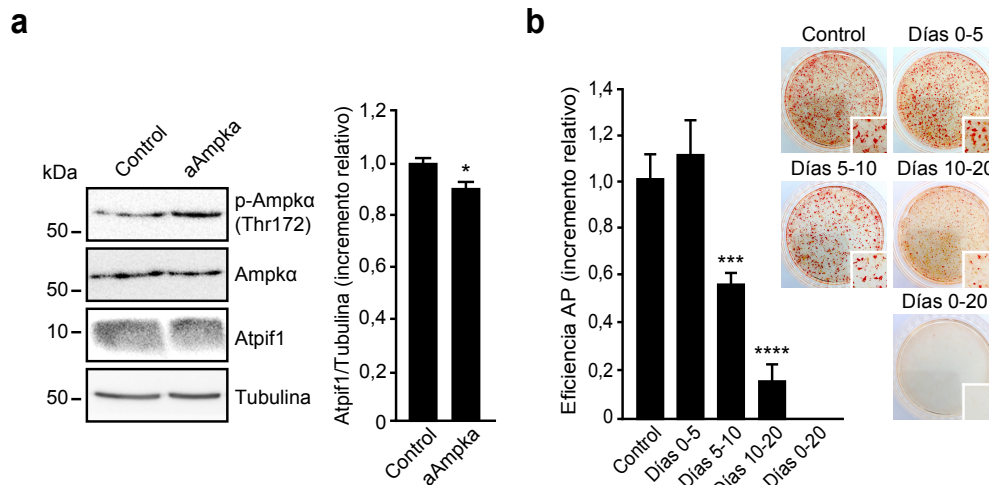


Figura 44. La activación de Ampk reduce la eficiencia de la reprogramación celular. (a) MEF transducidos con OSKM durante 2 días fueron tratados con agua (control), como vehículo control, o el activador de Ampk metformina (aAmpka, 10 mM) durante 48 horas. Paneles de la izquierda, los lisados celulares extraídos fueron evaluados por inmunodetección usando los anticuerpos indicados. Gráfica de la derecha, cuantificación de la ratio Atpif1/Tubulina ($n = 3$). (b) MEF fueron sometidos a un ensayo de reprogramación celular con OSKM y tratados como en (a) durante los períodos indicados. Gráfica de la izquierda, cuantificación de la eficiencia de reprogramación mediante el recuento del número de colonias positivas para AP tras 25 días de la expresión de OSKM ($n = 3$). Paneles de la derecha, imágenes representativas de campo claro de las placas de cultivo tras la tinción de AP. Los recuadros inferiores muestran una magnificación de las respectivas imágenes. Los datos están representados como la media \pm SEM (* $P < 0,05$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$). La prueba t-Student de una cola fue utilizada para comparar los conjuntos de datos.

4.4. La activación del anabolismo durante la fase estocástica de la reprogramación celular es dependiente de c-Myc

Los resultados mostrados sugieren que c-Myc induce un reajuste global del metabolismo celular durante los primeros días de la reprogramación celular de forma análoga al remodelado metabólico que tiene lugar en células cancerosas (DeBerardinis et al., 2008). Este cambio metabólico característico de células proliferativas no sólo implica una activación de la glucólisis aerobia, sino que también conlleva un ajuste del flujo metabólico para producir la biomasa necesaria para la división celular (Lunt and Vander Heiden, 2011).

Uno de los ajustes metabólicos característicos de este tipo de células proliferativas es la activación de la biosíntesis *de novo* de ácidos grasos para garantizar la demanda de fosfolípidos durante la generación de nuevas membranas lipídicas (Menendez and Lupu, 2007). De acuerdo con sus diferentes tasas de proliferación (Fig. 34a), tanto la expresión de mRNA (Fig. 45a, gráficas de la izquierda) como la cantidad de proteína (Fig. 40) producto de los genes *Fasn* y *Acc* en ESC

fueron superiores a las observadas en MEF, y mostraron un incremento paulatino en células transducidas con *OSKM* durante los primeros días de la reprogramación celular en relación a MEF control. La expresión de *Fasn* en células transducidas con *OSK* durante 4 días se redujo, mientras que la *Acc* aumentó. Sin embargo, la expresión de ambos genes aumentó en células transducidas con *OSKM* o *c-Myc* durante 4 días, relativo a MEF control (Fig. 45a, gráficas de la derecha).

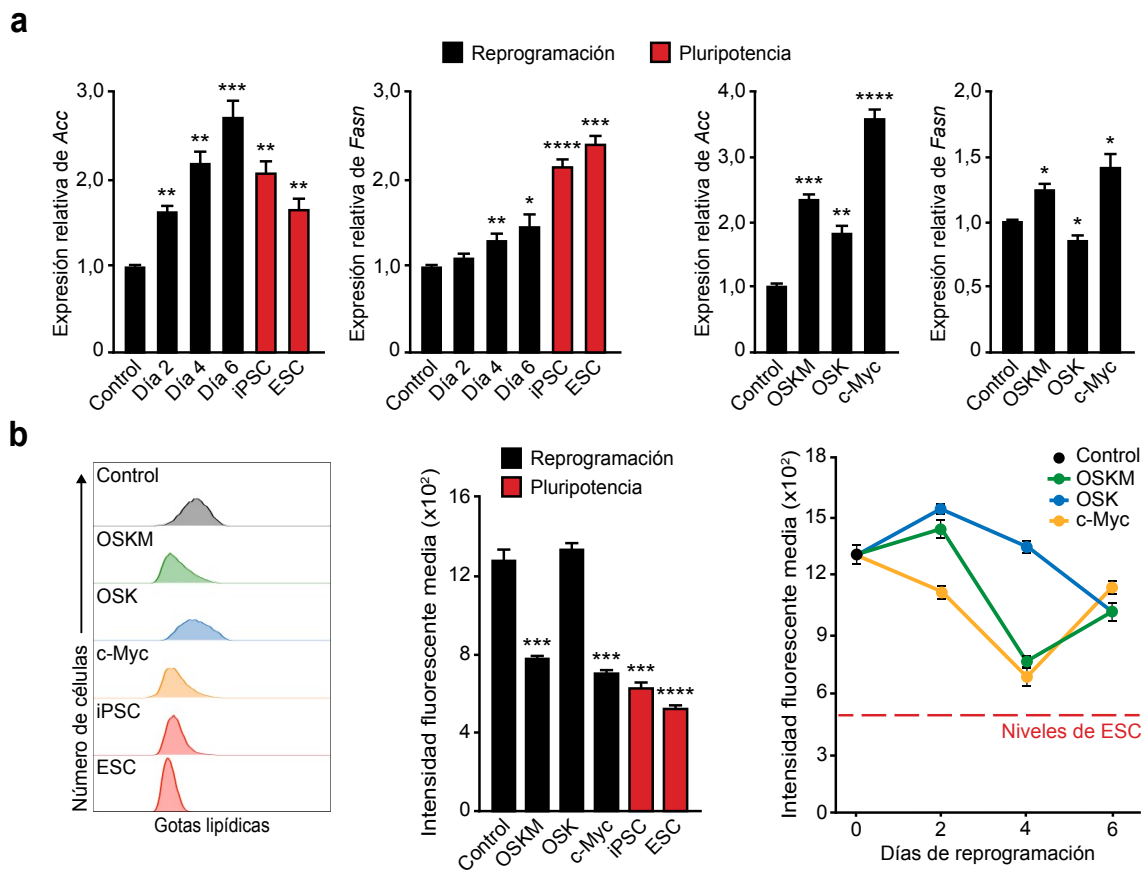


Figura 45. El factor c-Myc induce la biosíntesis de ácidos grasos y la ruta de las pentosas fosfato durante la reprogramación celular. (a) El RNA de MEF antes (control) o a los días indicados tras la transducción con *OSKM* (gráfica de la izquierda), o 4 días tras la transducción con los factores indicados (gráfica de la derecha) fue aislado y la expresión de *Acc* y *Fasn* fue evaluada por qPCR y representada como expresión génica relativa a MEF control ($n = 3$). Las ESC fueron utilizadas como control (barras rojas). (b) Histograma de la izquierda, análisis por citometría de flujo de la cantidad de gotas lipídicas de ácidos grasos no polares con Bodipy 493/503 en MEF antes (control) o 4 días tras la transducción con *OSKM*, *OSK* o *c-Myc*, o en las células pluripotentes mostradas. Gráfica central, cuantificación de la intensidad fluorescente media de los histogramas de la izquierda ($n = 3$). Gráfica de la derecha, análisis temporal de la cantidad de gotas lipídicas de ácidos grasos no polares en MEF antes (control) o a los días indicados tras la transducción con *OSKM*, *OSK* o *c-Myc*. La línea punteada roja indica la cantidad de gotas lipídicas de ácidos grasos no polares en ESC ($n = 3$). Los datos están representados como la media \pm SEM (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$). La prueba t-Student de una cola fue utilizada para comparar los conjuntos de datos.

Los ácidos grasos liberados de los triacilgliceroles de las gotas lipídicas pueden ser exportados, reesterificados en triacilgliceroles o utilizados bien como fuente de energía, a través de la β -oxidación, bien como cofactores en la señalización celular o bien como componentes durante la síntesis de membranas lipídicas (Walther and Farese, 2012). Mediante un análisis por citometría de flujo, se observó que la cantidad de gotas lipídicas no varió en células transducidas con *OSK* durante 4 días en relación a MEF control. Sin embargo, y relativo a MEF control, la cantidad de gotas lipídicas se redujo en células transducidas con *OSKM* o *c-Myc* durante 4 días y en ESC (Fig. 45b).

Además de lípidos, las células con una alta tasa de proliferación celular poseen elevados requerimientos de nucleótidos y aminoácidos para mantener la síntesis de DNA y proteínas, respectivamente. En este sentido, se observó un incremento de la expresión (Fig. 46a, paneles superiores) y la actividad *in vitro* (Fig. 46b, gráfica de la izquierda) de *G6pd*, enzima crucial en la ruta de las pentosas fosfato, en células transducidas con *OSKM* durante los primeros días de la reprogramación celular. El análisis relativo a MEF control de células transducidas con *OSKM*, *OSK* o *c-Myc* durante 4 días reveló que tanto el aumento de la expresión de *G6pd* (Fig. 46a, paneles inferiores) como de su actividad *in vitro* (Fig. 46b, gráfica de la derecha) son dependientes de *c-Myc*.

Estos datos sugieren que la síntesis *de novo* de ácidos grasos y el desvío de intermediarios de la glucólisis hacia la ruta de las pentosas fosfato puede ser importante para el proceso de reprogramación celular. De hecho, la inhibición química de las enzimas *Fasn* y *G6pd* redujo la eficiencia de reprogramación, medida mediante un ensayo de fosfatasa alcalina (Fig. 46c). En conjunto, estos resultados sugieren que *c-Myc* remodela el metabolismo celular para garantizar una alta tasa de proliferación durante la reprogramación celular.

4.5. La reprogramación celular induce un cambio en el contenido lipídico celular dependiente de c-Myc

Dada la temprana implicación de la biosíntesis *de novo* de ácidos grasos en la reprogramación celular, se trató de dilucidar si esta ruta anabólica está asociada a un cambio en el contenido lipídico durante el proceso. Curiosamente, el análisis lipidómico reveló importantes cambios en la cantidad relativa de los diferentes lípidos estructurales durante la reprogramación celular (Fig. 47a). Mientras los MEF contenían elevadas cantidades relativas de lisofosfatidilcolinas (LPC), lisofosfatidiletanolaminas (LPE), esfingomielinas (SM) y ceramidas (CER), las células pluripotentes mostraron bajas cantidades de estos lípidos y elevadas de cardiolipinas (CL) y fosfatidilcolinas (PC). La expresión de *OSKM* indujo el aumento dependiente del tiempo del contenido en fosfatidiletanolaminas (PE) y CL, mientras que la expresión de *OSK* lo redujo y aumentó el de SM o PC (Fig. 47a). El análisis no supervisado por agrupaciones jerarquizadas mostró que los perfiles lipídicos de células transducidas con *c-Myc* se agrupaban con los de las células transducidas con *OSKM* (Fig. 47a). En este sentido, el análisis por componentes principales mostró una transición inicial similar en células transducidas con *OSKM* u *OSK* (Fig. 47b, flecha negra), sin embargo, a partir de día 2, las células que expresaban *OSKM* reflejaron una conexión temporal en sus cambios de la composición lipídica, la cual podría representar diferentes pasos del remodelado durante su progreso desde el estado inicial somático al estado pluripotente (Fig. 47b, flechas verdes). Contrariamente, las células que expresaban *OSK* volvieron hacia su posición inicial dos días después de la transducción (Fig. 47b, flechas azules), reflejando una ausencia de progresión hacia la pluripotencia durante las fases iniciales. Las flechas rojas continua y punteada reflejan las diferencias en la composición lipídica entre las células que expresan *OSKM* durante 6 días y las iPSC, y las iPSC y las ESC, respectivamente. Se utilizó el análisis mediante gráficos tipo volcán para comparar los perfiles lípidos de células transducidas por *OSKM* u *OSK* a los días indicados. Dos días después de la transducción, y relativo a los valores de las células que expresaban *OSK*, las células transducidas con *OSKM* no indujeron cambios significativos (Fig. 47c, gráfica de la izquierda). Sin embargo, 4 días después de la transducción, las células que expresaban *OSKM* mostraron cambios sustanciales en la composición lipídica relativa: un aumento en el contenido de CL y PE, y un descenso en el de PC y SM (Fig. 47c, gráfica central y de la derecha). El aumento en el contenido de cardiolipinas, fosfolípidos específicos de la membrana mitocondrial interna, representa el cambio más dramático y significativo en el contenido lipídico de las células transducidas con *OSKM* (Fig. 47c, cuadrantes superiores de la derecha de las gráficas).

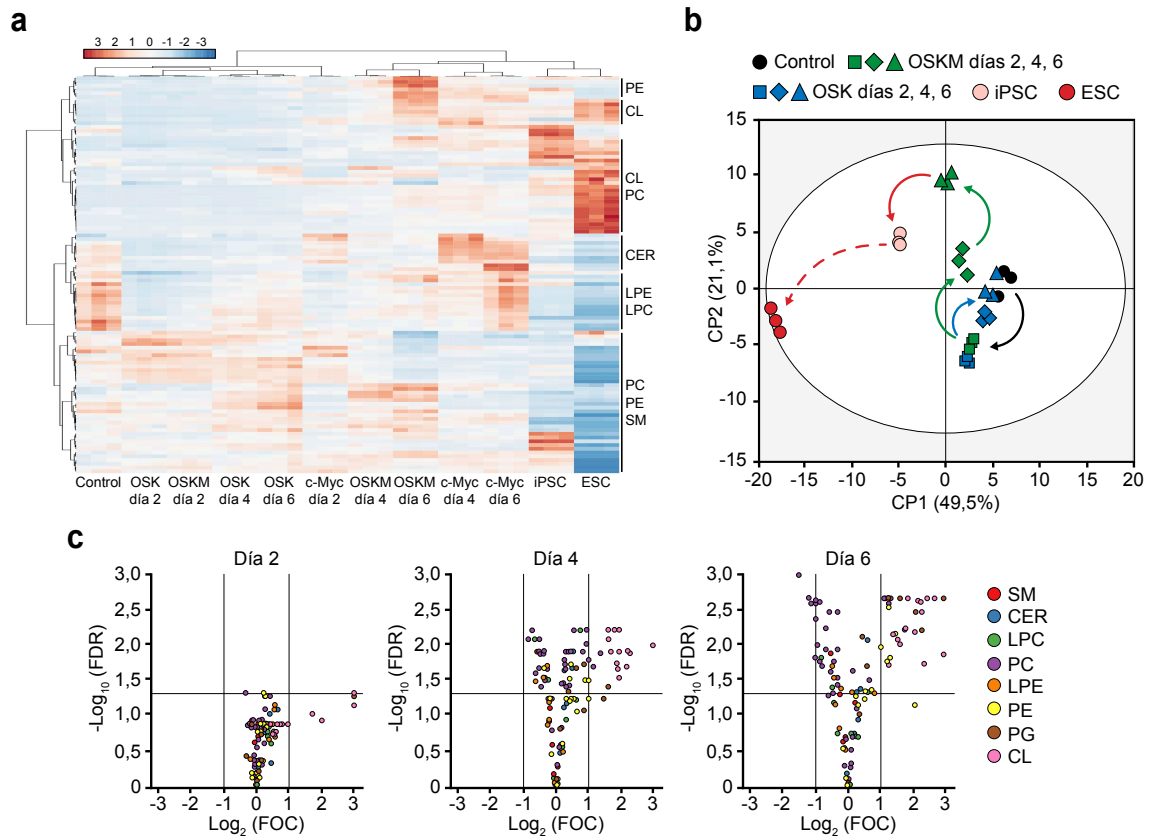


Figura 47. Remodelación de la composición lipídica inducida por c-Myc durante la fase estocástica de la reprogramación celular. (a) MEF fueron transducidos con OSKM, OSK o c-Myc. A los días indicados, la fracción no polar de los extractos celulares fue obtenida y analizada por LC-MS. Panel, mapa de calor (Z-score) ilustrando las diferencias en la composición relativa de lípidos estructurales de MEF antes (control) o a los días indicados tras la transducción con OSKM, OSK o c-Myc: PE, CL, PC, CER, LPE, LPC, PC, PE, SM. Las células pluripotentes mostradas fueron utilizadas como control (n = 3). (b) Análisis de los componentes principales 1 (CP1) y 2 (CP2) de la composición relativa de lípidos estructurales de MEF antes (control) o a los días indicados tras la transducción con OSKM u OSK. Las células pluripotentes mostradas fueron utilizadas como control (n = 3). Línea negra, transición observada en células transducidas con OSKM u OSK a día 2. Línea azul, transición inversa observada en células transducidas con OSK a día 4 y 6. Líneas verdes, transición observada en células transducidas con OSKM a día 4 y 6. Línea roja continua, representación de la hipotética transición de las células transducidas con OSKM a día 6 hasta el estado de iPSC. Línea roja punteada, representación de las diferencias entre las iPSC y las ESC. (c) Gráficas, análisis tipo volcán de las diferencias en la composición relativa de lípidos estructurales de las células transducidas con OSKM u OSK a los días indicados. Los cuadrantes superiores izquierdo y derecho muestran los lípidos aumentados o reducidos sin ambigüedad en células transducidas con OSKM con respecto a las transducidas con OSK, respectivamente (n = 3). FOC, incremento relativo (del inglés, *fold change*); FDR, tasa de descubrimientos falsos (del inglés, *false discovery rate*).

La comparación temporal de la composición relativa de los ácidos grasos de los lípidos totales de la célula reflejó diferencias significativas en su grado de insaturación y en su longitud durante la fase inicial de la reprogramación celular. El análisis no

supervisado por agrupaciones jerarquizadas reveló que las iPSC y las ESC presentaban perfiles similares en su composición de ácidos grasos (Fig. 48).

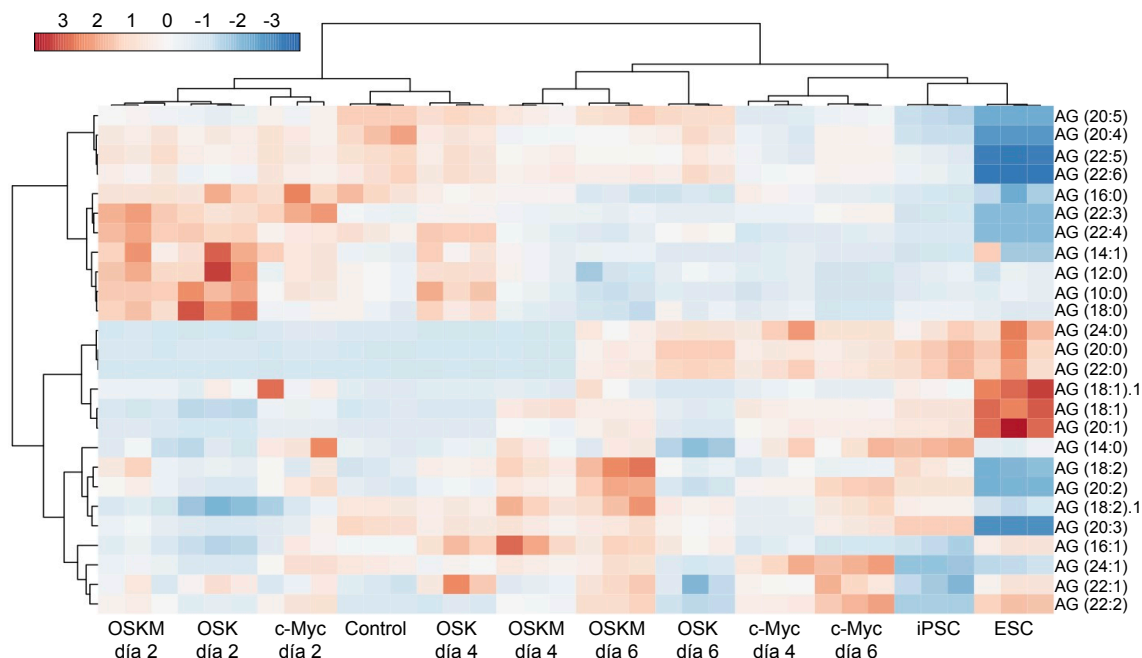


Figura 48. Remodelación de los ácidos grasos inducida por c-Myc durante la fase estocástica de la reprogramación celular. MEF fueron transducidos con *OSKM*, *OSK* o *c-Myc*. A los días indicados, el extracto total de los ácidos grasos de la fracción lipídica total fue analizado por LC-MS. Panel, mapa de calor (Z-score) ilustrando las diferencias en la composición relativa de los residuos acilo de la fracción lipídica total de MEF antes (control) o a los días indicados tras la transducción con *OSKM*, *OSK* o *c-Myc*. Las células pluripotentes mostradas fueron utilizadas como control (n = 3).

Concretamente, y relativo a MEF, las células pluripotentes mostraron un contenido similar en ácidos grasos saturados (Fig. 49a), mayores cantidades de monoinsaturados (Fig. 49b), y menores de cadenas acilo poliinsaturadas (Fig. 49c). Curiosamente, los ácidos grasos monoinsaturados se incrementaron en células transducidas con *OSKM* y *c-Myc*, alcanzando los niveles de iPSC tras 4 días de expresión (Fig. 49b). En sentido opuesto, la cantidad de los ácidos grasos poliinsaturados se redujo en células transducidas con *OSKM*, *c-Myc* y, en menor medida, *OSK* (Fig. 49c), comparado con MEF control. Se observó un aumento de la relación de ácidos grasos $(18:1 + 16:1)/(18:0 + 16:0)$ en las células transducidas con *OSKM*, *c-Myc*, indicando una activación de la desaturasa de estearoil-CoA durante los primeros días de la reprogramación celular, y sugiriendo un papel de *c-Myc* en la regulación de su actividad (Fig. 49d). Además, se detectó un aumento de residuos acilo de 18 carbonos con respecto a los de 16 carbonos durante los primeros días del

proceso (Fig. 49e). Curiosamente, este aumento fue similar en células transducidas con *OSKM*, *OSK* o *c-Myc*, sugiriendo una activación redundante de la actividad elongasa por los diferentes factores de reprogramación (Fig. 49e). En conjunto, estos resultados sugieren que existe una importante remodelación lipídica durante los primeros días de la reprogramación celular y que *c-Myc* juega un papel activo en este proceso, favoreciendo el cambio de clases de lípidos estructurales, así como el aumento de la longitud y el grado de insaturación de las cadenas acilo.

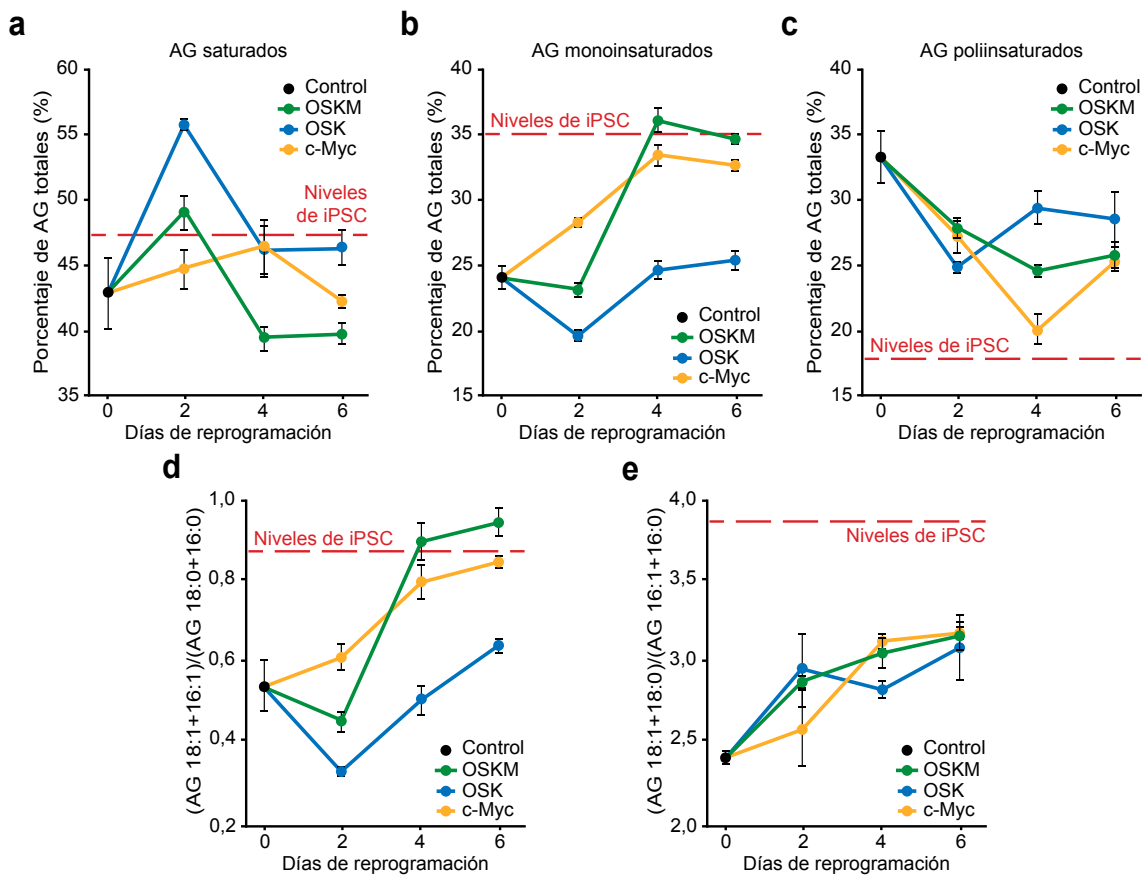


Figura 49. Remodelación de los ácidos grasos inducida por *c-Myc* durante la fase estocástica de la reprogramación celular. (a-e) MEF fueron transducidos con *OSKM*, *OSK* o *c-Myc*. A los días indicados, el extracto total de los ácidos grasos de la fracción lipídica total fue analizado por LC-MS y representado como composición relativa de AG saturados (a), AG monoinsaturados (b) y AG poliinsaturados (c), o en forma de los ratios indicados (d-e). La línea punteada roja indica la cantidad relativa en iPSC (n = 3). Los datos están representados como la media \pm SEM (todas las diferencias fueron significativas con un $P < 0,05$, como máximo). La prueba t-Student de una cola fue utilizada para comparar los conjuntos de datos.

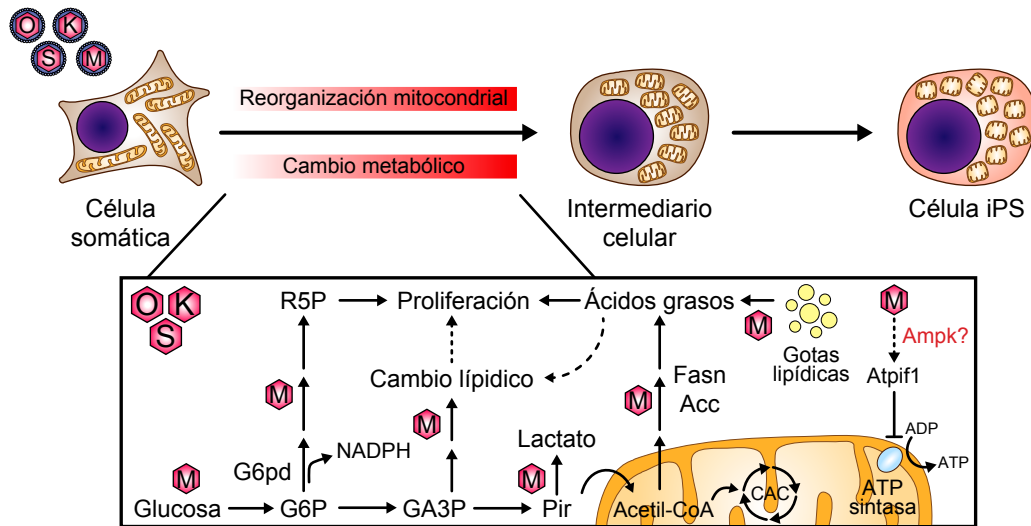


Figura 50. Modelo del papel del cambio metabólico durante la fase estocástica de la reprogramación celular. La ilustración representa el cambio de un metabolismo oxidativo a otro glucolítico y la activación del anabolismo inducidos por c-Myc durante la fase estocástica de la reprogramación celular. El factor transcripcional c-Myc estimula el consumo de glucosa y la producción de lactato a través de la glucólisis aerobia, induce la ruta de las pentosas fosfato, inhibe la OXPHOS a través de la inducción de Atpif1, activa la síntesis *de novo* de ácidos grasos y el consumo de las gotas lipídicas, estimula la síntesis de cardiolipinas y activa la monoinsaturación de ácidos grasos.

Anexo resultados

Caracterización molecular y funcional
de la línea de iPSC utilizada como
control

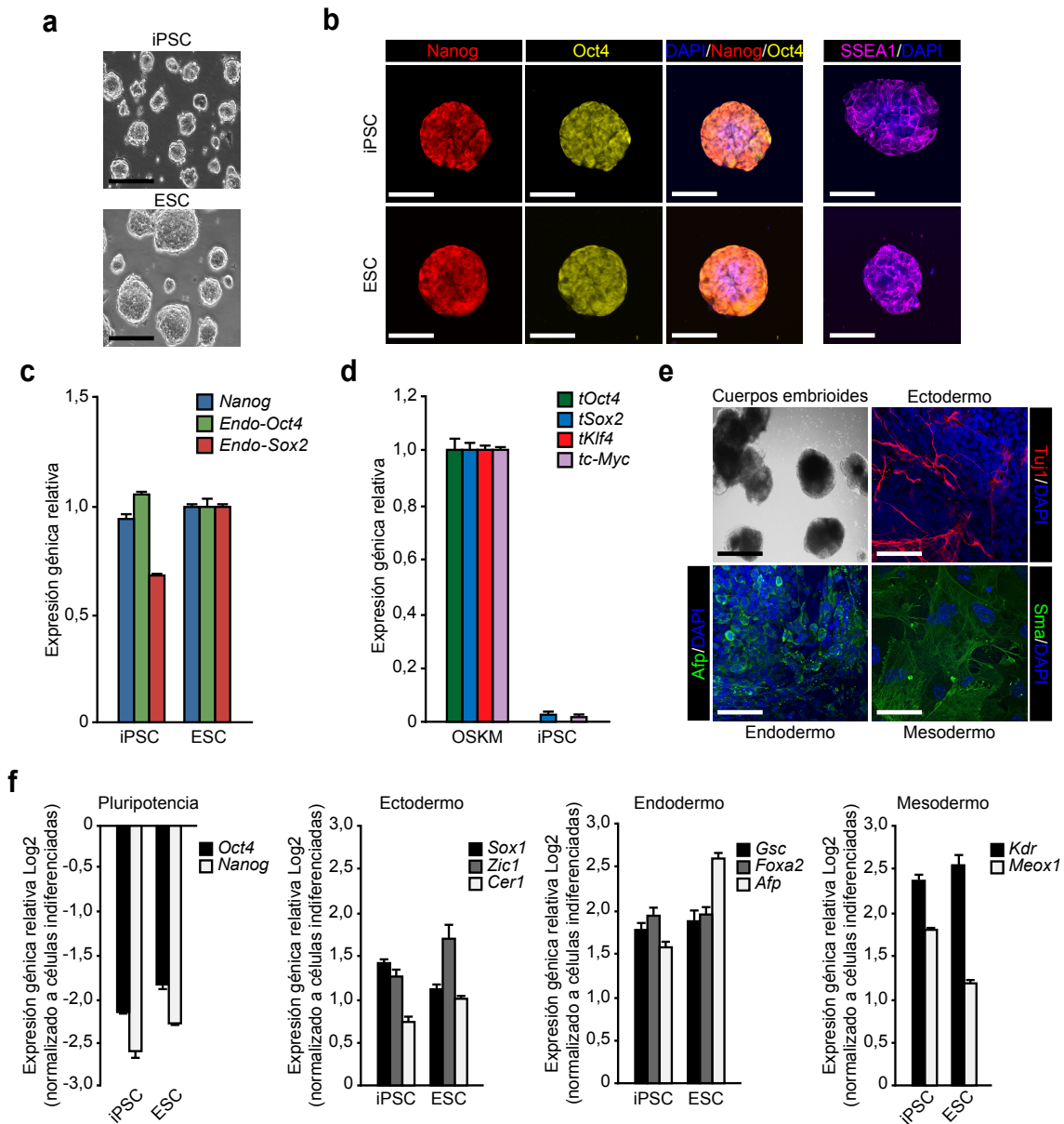


Figura 51. Caracterización molecular y funcional de iPSC derivadas de MEF tipo silvestre. (a) Imágenes representativas de contraste fases de un clon iPSC o la línea de ESC E14Tg2a. Barras de escala, 130 μ m. (b) Las células pluripotentes fueron analizadas por inmunofluorescencia con los anticuerpos indicados. DAPI (azul) fue utilizado como contratinción nuclear. Barras de escala, 30 μ m. Los paneles muestran diferentes campos en comparación a las imágenes de contraste de fases. (c, d) El RNA total de las células indicadas fue aislado y la expresión de (c) marcadores de pluripotencia o de (d) los cDNAs exógenos de OSKM fue evaluada por qPCR y representada como expresión génica relativa a ESC indiferenciadas en (c) o células transducidas con OSKM en (d) ($n = 3$). (e) Un clon de iPSC fue sometido a diferenciación mediante la formación de cuerpos embrioides. Panel superior izquierdo, imagen representativa de contraste de fases de los cuerpos embrioides a día 7. Barras de escala, 500 μ m. Los EB fueron sembrados y, 2 días después, analizados por inmunofluorescencia con los anticuerpos indicados. DAPI (azul) fue utilizado como contratinción nuclear. Barras de escala, 40 μ m. (f) El RNA total de los EB fue aislado a día 7 y la expresión de marcadores de pluripotencia, ectodermo, mesodermo y endodermo fue evaluada por qPCR y representada como expresión génica relativa a sus respectivas células indiferenciadas ($n = 3$). Los datos están representados como la media \pm SEM.

Discusión

Durante la reprogramación celular, las células somáticas sufren una profunda reorganización en el número y la forma de sus mitocondrias asociada a la transición de un estado somático-oxidativo a otro pluripotente-glucolítico. En este trabajo de tesis doctoral se describe: 1) que la fisión mitocondrial y el cambio metabólico son barreras tempranas de la reprogramación celular, 2) los mecanismos moleculares que subyacen a dichos procesos, y 3) su dependencia del factor transcripcional c-Myc.

Las ESC y las iPSC presentan una morfología mitocondrial inmadura y fragmentada frente a la red mitocondrial tubular observada en las células somáticas. (Folmes et al., 2011; Prigione et al., 2010; St John et al., 2005; Suhr et al., 2010; Van Blerkom, 2009). Se ha sugerido que uno de los procesos celulares a los que se debe enfrentar la célula durante la reprogramación celular es la reorganización de la dinámica mitocondrial (Prigione and Adjaye, 2010). Este trabajo de investigación demuestra que la expresión de *OSKM* induce una profunda fragmentación mitocondrial durante los primeros días del proceso, y que los intermediarios celulares y las células de las colonias epiteliales que aparecen durante la primera semana del mismo presentan una morfología mitocondrial fragmentada, similar a la observada en las ESC. Este hecho pone de manifiesto que la reorganización mitocondrial ocurre durante los primeros días de la reprogramación celular, en la fase estocástica del proceso. La fragmentación mitocondrial es, pues, una de las primeras barreras que la célula somática tiene que salvar en su tránsito hacia el estado pluripotente. Los resultados mostrados demuestran que este proceso es dependiente de la proteína de fisión mitocondrial Drp1 y que la fosforilación de su residuo Ser579 es un paso crucial para la activación de este mecanismo. La Ser579 es susceptible de fosforilación por diversas quinasas (Otera et al., 2013). En este trabajo se describe un papel activo de, al menos, las quinasas Erk1/2 y Cdk1 en la fosforilación de Drp1-S579 de una manera dependiente de c-Myc durante la fase estocástica de la reprogramación celular. La regulación de la fosforilación de Drp1-S579 en ESC y su papel en el mantenimiento de la pluripotencia todavía se desconoce. Futuras investigaciones con ESC e iPSC podrán aportar nuevos datos sobre la importancia de la dinámica mitocondrial y su regulación en el estado pluripotente.

Inesperadamente, la proteína Drp1 ha sido descrita como dispensable para la reprogramación celular (Wang et al., 2014). Sin embargo, y de acuerdo con los resultados de esta tesis doctoral, se ha observado que la inhibición química (Vazquez-Martin et al., 2012a) o el silenciamiento (Son et al., 2013b) de Drp1 impiden la reprogramación celular. Estos resultados paradójicos podrían deberse al incompleto silenciamiento de Drp1 conseguido por Wang y colaboradores en sus experimentos.

Comparado con el estado somático, las iPSC muestran una reducción en la complejidad y el número de mitocondrias (Folmes et al., 2011; Suhr et al., 2010). La fisión mitocondrial es parte del proceso de regulación de la masa y funcionalidad mitocondrial mediante mitofagia (Ashrafi and Schwarz, 2013). Los resultados de este trabajo indican que esta forma específica de autofagia no se activa durante la primera fase de la reprogramación. No obstante, ha sido descrito que la inducción de la autofagia es un facilitador del proceso (Chen et al., 2011c) y que una activación temprana y transitoria de este proceso es la responsable de la reducción mitocondrial durante la reprogramación celular (Wang et al., 2013). Es posible que el pico de activación de la autofagia identificado por Wang y colaboradores haya pasado inadvertido debido a su naturaleza rápida y transitoria. Sin embargo, y de acuerdo con los resultados de esta tesis doctoral, dos nuevos trabajos han descrito que la autofagia dependiente de Lc3b/Atg5 no es responsable del remodelado de la masa mitocondrial durante la reprogramación celular (Ma et al., 2015; Wu et al., 2015). Otros estudios han sugerido, además, que las células madre pluripotentes poseen una ratio de masa mitocondrial/proteína total similar a la de células somáticas (Birket et al., 2011; Zhang et al., 2011), por lo que es improbable que se esté produciendo una eliminación activa de mitocondrias. En conjunto, estas observaciones sugieren que la mitofagia no parece ser un proceso necesario para la reprogramación celular, más allá de la renovación constante de mitocondrias disfuncionales. Posiblemente, la reducción absoluta de la masa mitocondrial sea debida a un proceso adaptativo a las nuevas condiciones de proliferación requeridas para el mantenimiento de la pluripotencia, repartiendo estos orgánulos en cada división celular, o a través de una ruta autofágica independiente de Lc3b/Atg5 (Ma et al., 2015). Paradójicamente, esta hipótesis de disminución pasiva de la masa mitocondrial durante las sucesivas rondas de división celular, requeriría la generación de nuevas mitocondrias para su correcto reparto entre las dos células hijas. La activación de los marcadores de biogénesis mitocondrial descrita en esta tesis doctoral y en otro trabajo (Prigione and Adjaye, 2010) avalaría esta posibilidad. Se conoce poco acerca del papel que juega la autofagia, en general, y la mitofagia, en particular, en el mantenimiento de la pluripotencia celular; sin embargo, algunos trabajos parecen indicar que la activación de la autofagia es más importante durante el proceso de diferenciación que en la adquisición del estado pluripotente (Guan et al., 2013). Futuras investigaciones serán necesarias para resolver esta controversia y arrojar luz sobre el tema.

La familia de factores transcripcionales Myc es esencial para la embriogénesis temprana (Laurenti et al., 2009). Aunque la expresión ectópica de *c-Myc* no es necesaria para el proceso de reprogramación celular, su presencia en el cóctel de

Yamanaka aumenta su eficiencia y rapidez (Nakagawa et al., 2008; Wernig et al., 2008b). Hasta la fecha, no ha sido demostrado que la reprogramación celular pueda tener lugar sin la presencia de los genes endógenos *Myc*. Así, como facilitador de este proceso, a la proteína endógena *Myc* se le han atribuido diversas funciones (Knoepfler, 2008). Curiosamente, tras el fenómeno de competencia celular que tiene lugar entre células vecinas del embrión o en las ESC subyacen diferencias en la expresión de *c-Myc* (Claveria et al., 2013; Sancho et al., 2013). Así, la posibilidad de que cambios en la expresión endógena de *c-Myc*, forzados por OSK o mediante compuestos químicos, puedan ser determinantes para alcanzar el estado de pluripotencia inducida es una interesante hipótesis para futuras investigaciones. Hasta la fecha, la expresión exógena o endógena de *c-Myc* parece jugar un papel importante en los estadios tempranos de la reprogramación celular (Polo et al., 2012; Sridharan et al., 2009). En este sentido, la demostración de que los genes endógenos *Myc* no son necesarios para el mantenimiento de la pluripotencia en ESC (Scognamiglio et al., 2016) sugiere que *c-Myc* no participa en la inducción directa del programa endógeno de la pluripotencia durante la reprogramación celular. Los resultados de este trabajo de tesis doctoral apoyan, pues, la idea de un modelo en el que la expresión de *c-Myc* dirige a las células hacia un ambiente intracelular que favorece la inducción y estabilización del estado pluripotente. Esto se consigue mediante la inducción de divisiones celulares rápidas y un cambio metabólico hacia la glucólisis aerobia y el anabolismo.

Una de los requerimientos principales de la diferenciación es la salida del ciclo celular. Es necesario, pues, un fino control del ciclo para el mantenimiento de la pluripotencia. La ausencia de *Myc* induce arresto del ciclo celular (Heikkila et al., 1987; Wickstrom et al., 1988), induciendo diferenciación en ESC (Cartwright et al., 2005), o, en ambientes muy controlados, un estado durmiente de estas células similar a la diapausa embrionaria de algunos mamíferos (Scognamiglio et al., 2016). En este sentido, se ha sugerido que *c-Myc* favorece la reprogramación al activar el ciclo celular (Mikkelsen et al., 2008; Polo et al., 2012; Sridharan et al., 2009). Dado que la reprogramación es un proceso de reconversión epigenética que se incrementa sucesivamente ciclo tras ciclo de división celular, la activación de la proliferación incrementa la eficiencia del proceso, facilitando el borrado del patrón epigenético somático y la impresión del correspondiente al estado pluripotente (Hochedlinger and Plath, 2009). Los resultados de este trabajo demuestran que una de las vías por las que *c-Myc* induce la fosforilación y reclutamiento de Drp1 para dirigir la fisión mitocondrial es a través del complejo Cdk1/Ciclina B. La fisión mitocondrial durante la fase G2/M es un proceso necesario para el avance del ciclo celular (Qian et al., 2012; Taguchi et al., 2007). El factor *c-Myc* se encarga, pues, de enlazar ambos procesos

para favorecer la reprogramación celular. En este sentido, c-Myc es un activador clásico de la expresión de *Ciclina B* en células tumorales (Menssen and Hermeking, 2002; Seo et al., 2008; Yin et al., 2001), y se ha detectado su unión al promotor de Cdk1 (Perna et al., 2012) para favorecer su expresión junto a otros activadores transcripcionales (Born et al., 1994; Liu et al., 1998). Si bien es cierto que ha sido descrito que la fosforilación de DRP1-S616 (Ser579 de ratón) a través de CDK1/Ciclina B en ESC humanas está inducida por el factor asociado a la pluripotencia proteína 1 de expresión reducida o REX1 (del inglés, *reduced expression protein 1*) (Son et al., 2013b), este factor es un marcador tardío de pluripotencia (Polo et al., 2012), asociado al estado naíf (Marks et al., 2012), por lo que dicho efecto puede ser obviado durante los primeros estadios del proceso de reprogramación.

Existe, pues, una relación de dependencia clara entre la expresión de c-Myc y la proliferación celular (Schuhmacher and Eick, 2013). Las formas en las que c-Myc induce la proliferación celular son muy variadas (Bretones et al., 2015): 1) activando genes necesarios para el desarrollo del ciclo celular, 2) reprimiendo la actividad antiproliferativa de p21^{Cip1/Waf1} y la proteína de tumores de 27 kDa o p27^{Kip1} (del inglés, *tumor protein of 27 kDa, kinase inhibitor protein 1*), y 3) induciendo la replicación del DNA. Sin embargo, en ausencia de suero, c-Myc no puede estimular la proliferación celular, tan sólo el crecimiento celular, la síntesis proteica y el metabolismo glucolítico (Schuhmacher et al., 1999). De igual forma, en ausencia de c-Myc, el suero tampoco induce la activación del ciclo celular (Schlosser et al., 2005). Así, parece existir una relación estrecha entre ambos factores. Esta relación sugiere que c-Myc podría inducir las condiciones óptimas para que el medio de cultivo, rico en proteínas séricas (15%) y Lif, induzca la proliferación celular durante la reprogramación. Los resultados de esta tesis demuestran que el silenciamiento de *Dusp6* puede ser uno de estos prerrequisitos, favoreciendo la activación temprana de Erk1/2 a través del suero y Lif (Burdon et al., 1999; Ohtsuka et al., 2015). Sin embargo, dado que la combinación de factores OSK también participa en el silenciamiento de *Dusp6*, junto con c-Myc, se sugiere algún tipo de estimulación accesoria por parte de c-Myc para la activación de Erk1/2. Esta activación de Erk1/2 induce, junto al complejo Cdk1/Ciclina B, la fosforilación de Drp1-S579, que favorece la fisión mitocondrial y con ello la transición de mesénquima a epitelio durante la fase estocástica de la reprogramación celular.

La inhibición de la ruta Erk1/2 ha sido identificada como la clave para alcanzar el estado naíf de pluripotencia en las ESC murinas (Ying et al., 2008) (Fig. 5). En este contexto celular, la ruta Fgf/Erk es un potente inductor de la diferenciación, desestabilizando la red de control de la pluripotencia, dirigiendo la modificación de la

cromatina hacia la expresión de genes de diferenciación y comprometiendo a la célula con la salida del estado pluripotente (Burdon et al., 1999; Kunath et al., 2007; Tee et al., 2014). Sin embargo, y dada la importancia de la señalización a través de Erk1/2 en el mantenimiento de la homeostasis celular (Roskoski, 2012), estas quinasas podrían jugar un papel crucial durante la fase inicial de la reprogramación, orquestando una respuesta coordinada en las células somáticas para emprender los dramáticos cambios que provocan los factores de reprogramación, antes de que se active el programa endógeno de control de la pluripotencia. En este sentido, la activación de la ruta Erk1/2 por la expresión constitutiva de una forma activa de Ras confiere a la célula un alto grado de plasticidad fenotípica, promoviendo su transformación neoplásica y la adquisición de propiedades de célula madre (Ischenko et al., 2013). Los resultados de este trabajo de investigación sugieren que una de las funciones dirigidas por la señalización a través de Erk1/2 durante la fase estocástica de la reprogramación es la fisión mitocondrial a través de la fosforilación de Drp1-S579 y que, aunque la participación de mecanismos accesorios no pueden ser descartados, el silenciamiento de *Dusp6* por OSKM es necesario, aunque no suficiente, para esta activación. De acuerdo con estos resultados, ha sido descrito que: 1) c-Myc induce la activación de Erk1/2 en células de osteosarcoma (Han et al., 2012), 2) N-Myc forma un novedoso complejo represor junto a Sirtuina 1 que inhibe la expresión de *Dusp6*, favoreciendo la fosforilación de Erk1/2 en células de neuroblastoma (Marshall et al., 2011), 3) la ruta Ras/Raf/Mek/Erk induce la expresión de c-Myc (Kerkhoff et al., 1998), 4) diversas fosfatasa de la familia DUSP se reprimen durante las primeras etapas de la reprogramación (Hirsch et al., 2015; Polo et al., 2012; Soufi et al., 2012), y 5) la señalización a través de ERK1/2 induce la fosforilación de DRP1-S616 para dirigir la fisión mitocondrial en células humanas transformadas (Kashatus et al., 2015; Serasinghe et al., 2015). Contrariamente, fosfatasa clásicas de Erk1/2 como *Dusp5* y *Dusp6* presentan una alta expresión en ESC (Chen et al., 2011b; Yang et al., 2012; Zhang et al., 2009), y c-Myc induce la expresión de *Dusp2* y *Dusp7* en ESC para controlar la señalización a través de Erk1/2 (Chappell et al., 2013). La modulación transcripcional de diferentes miembros de la familia DUSP es probable que actúe como un mecanismo común en la regulación de la señalización a través de Erk1/2 en diferentes contextos celulares. En ese sentido, la inhibición de la señalización a través de Erk1/2 durante la fase determinista de la reprogramación celular favorece la adquisición de la pluripotencia, mientras que su inhibición durante la fase estocástica lo impide (Silva et al., 2008). En este contexto, esta tesis doctoral pone de manifiesto que la señalización a través de Erk1/2 puede desempeñar diferentes funciones en las distintas fases de la reprogramación celular, siendo inductora de la reprogramación en la primera (fase estocástica) y represora en la segunda (fase determinista).

Curiosamente, se ha descrito un papel de la señalización a través de Erk1/2 en la autorrenovación de las ESC murinas (Chen et al., 2015), sugiriendo que el mantenimiento de la pluripotencia en el estado naíf, gracias a la condición 2i, se debe a la señalización a través de Mek1/2 independiente de Erk1/2. Sin embargo, siguen apareciendo trabajos en los que se atribuyen un papel pro-diferenciación a la ruta Erk1/2 (Gu et al., 2015).

Esta activación de la proliferación celular durante la fase estocástica de la reprogramación hace que los requerimientos metabólicos de las células cambien con respecto a los de las células somáticas, generalmente, menos proliferativas (Lunt and Vander Heiden, 2011). A diferencias del estado metabólico oxidativo de estas últimas, las iPSC presentan un metabolismo fundamentalmente glucolítico (Folmes et al., 2011). En este sentido, ha sido descrito previamente que células que presentan una capacidad glucolítica mayor y una capacidad oxidativa menor son más propensas a la reprogramación celular (Panopoulos et al., 2012), mientras que la estimulación de la OXPHOS mediante compuestos químicos reducen la eficiencia del proceso (Folmes et al., 2011). No obstante, y aunque la OXPHOS sufre una inhibición durante la reprogramación celular (Prigione and Adjaye, 2010), ésta parece ser necesaria en algún grado durante el proceso: mutaciones heteroplásmicas en el mtDNA generan una OXPHOS disfuncional, afectando a la reprogramación celular (Yokota et al., 2015). Los datos de esta tesis doctoral demuestran que *c-Myc* induce la expresión de las enzimas glucolíticas y oxidativas durante la primera fase del proceso, generando un estado hiperenergético mediante el incremento general de la actividad metabólica. Estos resultados coinciden con los datos de trabajos previos en los que se describe que una activación transitoria de la OXPHOS es necesaria para el progreso de la reprogramación celular (Kida et al., 2015; Prigione et al., 2014). Kida y colaboradores identifican que los intermediarios celulares de la reprogramación presentan un incremento transitorio de la OXPHOS. Aunque los autores demuestran que la inhibición de OXPHOS reduce la conversión celular, contrariamente a trabajos anteriores (Folmes et al., 2011), queda por resolver si esta activación transitoria juega un papel importante durante la reprogramación celular o es sólo un subproducto de la sobreexpresión de *c-Myc*. Dada la existencia de este estado hiperenergético, una posibilidad sería la necesidad de altas cantidades de ATP durante la fase inicial del proceso. En este sentido, y de acuerdo a los resultados de este trabajo, una inhibición temprana de la OXPHOS podría activar a Ampk, reduciendo la eficiencia de la reprogramación celular, similar a lo que ocurre en ciertas células cancerosas (Swinnen et al., 2005). Sea como fuere, los datos aquí presentados sugieren que el rápido aumento de la proteína Atpif1 dependiente de *c-Myc* induce la abrupta y temprana

inhibición de la OXPHOS, pese al incremento de la expresión de las enzimas oxidativas, dirigiendo a la célula hacia un metabolismo fundamentalmente glucolítico. Análisis proteómicos de trabajos previos revelan que algunos complejos de la cadena de transporte tienden a reducir su expresión (complejos I y IV) durante la reprogramación, sin embargo, otros tienden a incrementarla (complejos II, III y V) (Folmes et al., 2011; Hansson et al., 2012). Si bien es cierto que esta variación en la estequiometría de los complejos puede afectar a la eficiencia de la cadena de transporte electrónico, estos cambios pueden no ser lo suficientemente grandes como para afectar sobremanera al correcto funcionamiento de la OXPHOS. La inducción de la expresión de *Atpif1* por parte de c-Myc puede ser la clave para favorecer, pues, este cambio metabólico.

Ha sido descrito que la combinación de ambos factores, una cadena de transporte electrónico funcional y la inhibición de la ATP sintasa por *Atpif1*, promueve la proliferación y supervivencia de células de cáncer de colon al producirse una hiperpolarización de las mitocondrias y un aumento de los niveles de ROS: el gradiente de protones no es consumido por la ATP sintasa, pese al funcionamiento del transporte electrónico, lo que hiperpolariza la mitocondria favoreciendo la aparición de especies reactivas del oxígeno (Formentini et al., 2012; Sanchez-Arago et al., 2013; Santamaria et al., 2006). Curiosamente, la hiperpolarización de mitocondrias (Folmes et al., 2011) y el aumento de los niveles de ROS (Esteban et al., 2010; Ji et al., 2014) han sido descritos durante los primeros días de la reprogramación celular. Altas cantidades locales de ROS pueden estimular la proliferación y la supervivencia celular a través de la activación de las rutas Pi3k/Akt (Kwon et al., 2004; Lee et al., 2002), dependientes de receptores asociados a quinasas de tirosinas (Meng et al., 2002) o Nf-kb (Chandel et al., 2000), de ahí que un aumento de los niveles de ROS pueda favorecer la eficiencia de la reprogramación celular. De hecho, se ha demostrado que el aumento de los niveles de ROS es necesario para que la reprogramación celular llegue a término (Zhou et al., 2016): en células humanas este incremento de ROS favorece la transición metabólica al activar a HIF a través del factor respiratorio nuclear 2 o NRF2 (del inglés, *nuclear respiratory factor 2*) (Hawkins et al., 2016), de manera similar a lo que ocurre durante el desarrollo de algunos tumores (Santacatterina et al., 2016). Si bien es cierto que este aumento de ROS favorece la aparición de daños sobre el DNA, Nrf2 activa la respuesta antioxidante en células cancerosas (Santacatterina et al., 2016) y tratamientos con antioxidantes incrementan la eficiencia de la reprogramación celular (Esteban et al., 2010). Los resultados de este trabajo permiten sugerir esta hipótesis como una explicación plausible de la necesidad de una cadena de transporte electrónico funcional (Kida et al., 2015; Liu et al., 2013) y la

inhibición de la ATP sintasa mitocondrial por *Atpif1*: inducir la hiperpolarización de la mitocondria y estimular la generación de ROS para favorecer la reprogramación celular durante, al menos, la fase estocástica.

Al igual que muchas células cancerosas, las ESC también presentan una alta expresión de *Atpif1* asociada a una baja actividad OXPHOS. Se ha descrito que la activación química de Ampk en estas células induce el silenciamiento y/o degradación de *Atpif1* (Vazquez-Martin et al., 2013). Los resultados de esta tesis doctoral demuestran una correlación entre el aumento de expresión de *Atpif1* y la reducción de la actividad de Ampk. Aunque existe una controversia en el papel que juega la activación de Ampk durante la reprogramación celular (Ma et al., 2015; Vazquez-Martin et al., 2012b), los datos aquí mostrados sugieren que la inactivación de Ampk durante los primeros estadios de la reprogramación celular es un requisito para la reconversión celular. En este sentido, la inactivación de Ampk coincide con las observaciones del descenso de autofagia durante los primeros días, proceso dependiente de la actividad Ampk (Hardie, 2011). Este hecho también coincide con los resultados de un trabajo que sugiere que la activación de la autofagia es un impedimento para la reprogramación (Wu et al., 2015). Curiosamente, la sobreexpresión de *Atpif1* induce la activación de Ampk en respuesta a la demanda de ATP (Santacatterina et al., 2016). Sin embargo, los datos de esta tesis doctoral sugieren que la disminución de la actividad Ampk inducida por c-Myc podría ser la causa del aumento de *Atpif1*, aunque no se puede descartar un efecto directo de c-Myc sobre *Atpif1* a nivel transcripcional (Garcia-Bermudez and Cuezva, 2016). Futuras investigaciones serán necesarias para aportar más información sobre la relación entre ambas proteínas.

Uno de los principales motivos por los cuales las células proliferativas, como las ESC o las CSC, presentan un alto flujo glucolítico se debe a la capacidad de esta ruta para proveer de intermediarios a las rutas biosintéticas (Fig. 14). En este sentido, este trabajo de tesis doctoral describe que una eficiente reprogramación celular es dependiente de la inducción del anabolismo: la activación dependiente de c-Myc de la biosíntesis *de novo* de ácidos grasos y la ruta de las pentosas fosfato durante la fase estocástica del proceso es necesaria para la adquisición del estado pluripotente, similar a lo que ocurre en algunos procesos cancerosos (Edmunds et al., 2014; Morrish et al., 2008). Además, el consumo de las gotas lipídicas dependiente c-Myc también ha sido descrito en cáncer (Edmunds et al., 2014; Zirath et al., 2013). Los resultados sugieren, pues, que la activación de ambas rutas y el consumo de las gotas lipídicas están dirigidos a sostener las rutas anabólicas que participan en la replicación del DNA y la biosíntesis de la membranas biológicas. Si bien no se puede descartar la

utilización de las gotas lipídicas como fuente de energía a través de la β -oxidación, la inactivación de Ampk sugiere que esta ruta no se activa durante la reprogramación celular (Hardie and Pan, 2002).

La aparente hiperactivación de estas rutas durante la fase estocástica de la reprogramación celular con respecto a sus niveles en ESC puede deberse a un acoplamiento entre el metabolismo de la célula y la hiperproliferación durante esta fase. Una alta tasa de proliferación durante la reprogramación favorece el proceso de desmetilación pasiva de promotores (Maherali et al., 2007; Mikkelsen et al., 2008; Polo et al., 2010); sin embargo, la sobreexpresión de genes asociados a la proliferación celular puede bloquear a las células en estados intermedios (Mikkelsen et al., 2008). En conjunto, estos datos sugieren que una vez que la célula alcanza el estado naíf de pluripotencia, la proliferación debe estabilizarse, y con ella el metabolismo.

La activación temprana de la biosíntesis *de novo* de los ácidos grasos coincide con el aumento del consumo de glutamina dependiente de c-Myc detectado por RMN. La glutaminólisis es una ruta anapletórica que ayuda a restablecer el flujo del ciclo de Krebs cuando intermediarios de éste son utilizados para favorecer otras rutas, como es el caso del ácido cítrico utilizado en la biosíntesis de ácidos grasos (Fig. 14 y 15). Su dependencia del factor c-Myc es ampliamente conocida en cáncer (Yuneva et al., 2007): c-Myc activa directamente la expresión de los transportadores de glutamina (Wise et al., 2008) e indirectamente la expresión de la glutaminasa, a través de la represión del microRNA-23 (Gao et al., 2009). Así, las ESC son dependientes de esta ruta para su supervivencia y el mantenimiento de la pluripotencia (Carey et al., 2015; Tohyama et al., 2016). Es sabido que c-Myc puede reducir la producción de acetil-CoA al inducir la expresión de Pdk, la cual inactiva a Pdh por fosforilación (Kim et al., 2007b), de modo que la glutaminólisis también participa en la renovación del acetil-CoA en la mitocondria para fomentar la biosíntesis *de novo* de ácidos grasos: el α -cetoglutarato producido por la glutaminólisis puede ser transformado a citrato a través de las reacciones inversas del ciclo de Krebs, mediante la isocitrato deshidrogenasa y la aconitasa, tanto en el citosol como en la mitocondria (Metallo et al., 2011; Mullen et al., 2011). Los datos de esta tesis doctoral permiten, al menos, sugerir que la activación de esta ruta se produce durante la fase estocástica de la reprogramación celular, de una forma dependiente de c-Myc y en paralelo a la activación del anabolismo.

Finalmente, los datos aportados en este trabajo demuestran que desde los primeros estadios de la reprogramación, y hasta el final del proceso, existe un remodelado del contenido lipídico de las células, afectando al tipo de lípidos

estructurales, y a la longitud y el grado de insaturación de sus residuos acilo. Durante los primeros días del proceso, se detecta un incremento en la biosíntesis de cardiolipinas. El remodelado de los residuos acilo de las cardiolipinas tras su síntesis podría jugar un papel crucial para un eficiente ensamblado de la cadena de transporte electrónico (Kiebish et al., 2008). El aumento en el contenido de cardiolipinas podría ser una prueba del requerimiento de la biogénesis mitocondrial durante la proliferación celular, en concordancia con el hecho de que la degradación activa de mitocondrias no es necesaria durante la reprogramación celular. Sin embargo, la alta tasa de división celular podría impedir la correcta y completa maduración de las cardiolipinas, lo que podría explicar parcialmente la aparente inmadurez de las mitocondrias observada en las células pluripotentes (Folmes et al., 2011). El análisis de la composición de ácidos grasos reveló un aumento en los residuos acilo de 18 carbonos, un descenso de los ácidos grasos poliinsaturados y un aumento de los monoinsaturados durante la primera fase de la reprogramación celular. Estos procesos: la elongación y la monoinsaturación de los ácidos grasos han sido propuestos como una diana terapéutica en cáncer debido a su importancia en el crecimiento y la supervivencia de tumores. Dado que la adición de lípidos exógenos, como el ácido oleico, permite sortear la inhibición del crecimiento y la supervivencia de tumores cuando se inhiben estas rutas de síntesis o modificación de ácidos grasos (Carroll et al., 2015), es tentador especular que suplementar el medio de cultivo con un cóctel lipídico definido podría favorecer la obtención de iPSC, llegando incluso a ser un sustituto natural de algunos de los factores transcripcionales o compuestos químicos presentes en los diferentes cócteles de reprogramación celular (Hou et al., 2013; Takahashi and Yamanaka, 2006; Yu et al., 2007; Zhao et al., 2015), tanto *in vitro* como *in vivo* (Abad et al., 2013; Ohnishi et al., 2014).

Análogamente al proceso de dilución pasiva del estado epigenético somático mediante proliferación (Apostolou and Hochedlinger, 2013), los datos aquí presentados permiten sugerir un proceso similar en el cambio del perfil lipídico de la célula. Así, la expresión de *OSKM* induce un cambio en el metabolismo anabólico, alterando las rutas biosintéticas de los componentes lipídicos. Los fosfolípidos característicos del estado pluripotente empiezan a sintetizarse en una proporción mayor, de modo que en cada ronda de división celular, el perfil lipídico somático se diluye y el pluripotente se instaaura.

La activación de estos tres procesos: la ruta de las pentosas fosfato, la biosíntesis *de novo* de ácidos grasos y el cambio en la composición lipídica durante la fase estocástica de la reprogramación revela la importancia de la glucólisis durante

este proceso. La hiperactivación de la glucólisis durante los primeros estadios permitiría la acumulación de los intermediarios adecuados para fomentar estas tres rutas: 1) la glucosa-6-fosfato, que entra en la ruta de las pentosas fosfato; 2) la fructosa-6-fosfato y el gliceraldehído-3-fosfato, que también pueden entrar y salir de esta ruta; 3) la dihidroxiacetona fosfato, que es crucial en la biosíntesis de fosfolípidos y triacilgliceroles; 4) el 3-fosfoglicerato, que participa en la síntesis de fosfolípidos a través de su conversión a serina; o 5) el piruvato, que entra en la biosíntesis de ácidos grasos a través del ácido cítrico desde la mitocondria (Fig. 14).

c-Myc es un protooncogén. Su relación con el cambio metabólico durante la transformación celular en células cancerosas es bien conocido (DeBerardinis et al., 2008). Si bien esta función ya se había sugerido durante la reprogramación celular (Folmes et al., 2013; Polo et al., 2012; Sridharan et al., 2009), y algunos procesos asociados al cambio metabólico durante la reprogramación ya han sido descritos como dependientes de c-Myc (Cao et al., 2015), los resultados de la presente tesis doctoral revelan nuevas funciones asociadas a este protooncogén, nuevas barreras para la reprogramación dependientes de c-Myc y una visión globalizada de su acción sobre la conversión metabólica durante este proceso (Fig. 52). El papel de c-MYC en el cóctel de Yamanaka para células humanas ha sido reemplazado por la proteína de unión a RNA LIN28 (Yu et al., 2007). Esta proteína ha sido descrita como un efector clave en el metabolismo de la glucosa, jugando un papel importante en la transición hacia un estado metabólico glucolítico desde células somáticas a iPSC, en la reprogramación celular, o desde el estado naíf al condicionado, en ESC (Zhang et al., 2016; Zhu et al., 2011). A pesar de que Lin28 no es indispensable para la reprogramación celular, la ausencia endógena del gen *Lin28* reduce considerablemente la eficiencia, y su introducción en el cóctel de Yamanaka favorece la reconversión celular (Hanna et al., 2009). Dado que c-Myc y Lin28 parecen integrar mecanismos de retroalimentación positiva el uno sobre el otro (Viswanathan and Daley, 2010), futuras investigaciones arrojarán luz sobre el papel de cada proteína por separado y su relación en el proceso de reprogramación celular.

Aunque las iPSC pueden ser obtenidas de cualquier tipo celular, la reprogramación celular es un proceso muy ineficiente. Los diferentes resultados que produce la expresión de los factores de reprogramación podría ser un reflejo de las distintas respuestas celulares que inducen, las cuales podrían depender de las condiciones fisiológicas de la célula, como por ejemplo la organización celular, la fase del ciclo celular o el estado metabólico. En este sentido, las células que sufren el proceso de reprogramación constituyen una subpoblación de células privilegiadas con

un ciclo celular ultrarápido (Guo et al., 2014). Investigar la citoarquitectura celular, la expresión génica o el perfil metabólico de esta subpoblación de células ayudaría a arrojar luz sobre las ventajas que presentan éstas frente a la población celular normal y a entender los procesos que una célula con un ciclo celular estándar debe emprender para iniciar su transición hacia el estado pluripotente. Los resultados de esta tesis doctoral apoyan un modelo en el que la dinámica mitocondrial y el estado metabólico intracelular, inducidos por la actividad de c-Myc (Fig. 52), influyen en el destino celular durante la primera fase del proceso, pudiendo contribuir a los cambios epigenéticos que, eventualmente, terminan en la completa reactivación del programa endógeno de control de la pluripotencia (Folmes and Terzic, 2016; Ryall et al., 2015; Wu et al., 2016).

La fisión mitocondrial (Rehman et al., 2012; Zhao et al., 2013), la regulación de Drp1 (Kashatus et al., 2015; Serasinghe et al., 2015; Xie et al., 2015), la señalización a través de Erk1/2 (Han et al., 2012) y su regulación por Dusp6 (Marshall et al., 2011), la transición de mesénquima a epitelio (De Craene and Berx, 2013), el cambio metabólico (Montal et al., 2015; Ye et al., 2011), las rutas anabólicas (Menendez and Lupu, 2007; Tsouko et al., 2014; Zirath et al., 2013) y su relación con c-Myc (Edmunds et al., 2014; Edmunds et al., 2015; Morrish et al., 2008), la remodelación lipídica por c-Myc (Eberlin et al., 2014), o la regulación de Ampk (Phoenix et al., 2012; Pineda et al., 2015; Sato et al., 2012) y Atpif1 (Sanchez-Arago et al., 2012; Sanchez-Cenizo et al., 2010) son procesos centrales en las CSC y durante el inicio del proceso tumorigénico. Los resultados presentados en esta tesis doctoral aportan una mayor solidez para sugerir un estrecho paralelismo entre la fase estocástica de la reprogramación celular y el proceso de transformación celular (Apostolou and Hochedlinger, 2013). La correcta activación del programa endógeno de la pluripotencia durante la fase determinista dirigirá a la célula hacia el estado de iPSC. No obstante, esta similitud entre ambos procesos revela que cualquier avance en el control de la pluripotencia inducida no sólo ayudará a manejar adecuadamente esta potente herramienta para su uso en terapia celular, sino también a comprender mejor las etapas iniciales de los procesos de transformación celular en cáncer (Fig. 52).

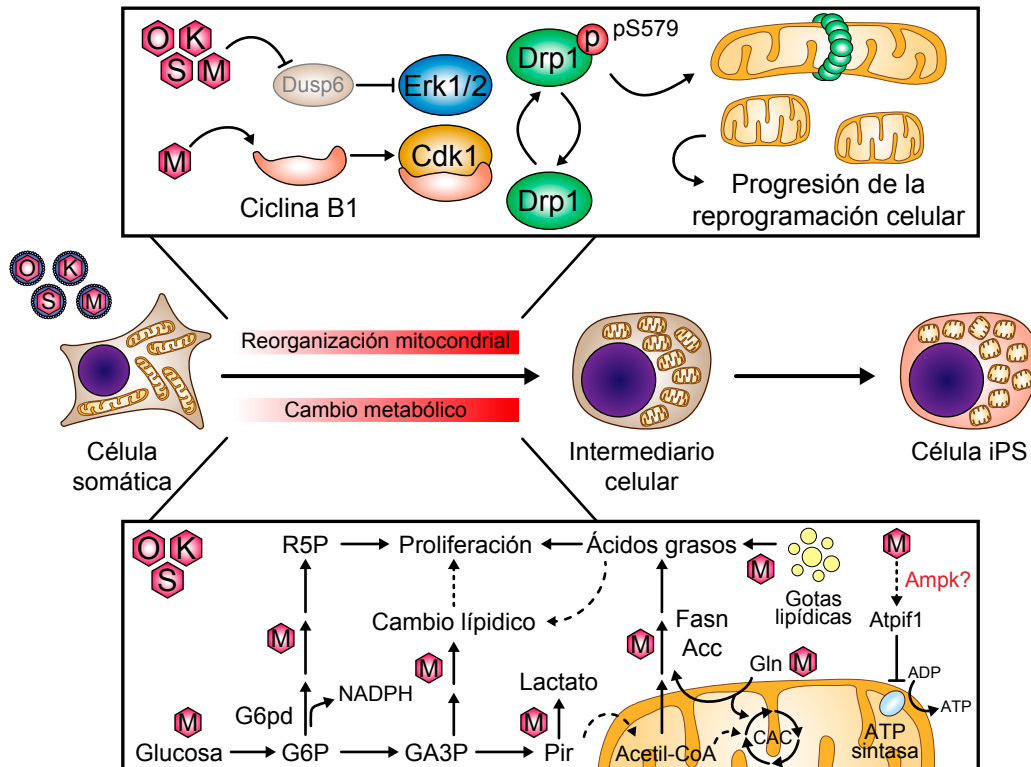


Figura 52. Modelo del papel de la reorganización mitocondrial y el cambio metabólico durante la fase estocástica de la reprogramación celular. La ilustración representa la reorganización mitocondrial a través de la fosforilación de Drp1-S579 por Erk1/2 y Cdk1. El silenciamiento de *Dusp6* por OSKM favorece la activación de Erk1/2. A su vez, c-Myc induce la activación de ambas quinasas para favorecer la fragmentación mitocondrial. También se ilustra el cambio desde el estado somático-oxidativo al estado pluripotente-glucolítico, la activación del anabolismo y la remodelación de la composición lipídica, tres procesos inducidos por c-Myc durante la fase estocástica de la reprogramación celular. El factor transcripcional c-Myc estimula el consumo de glucosa y la producción de lactato a través de la glucólisis aerobia, induce la ruta de las pentosas fosfato, inhibe la OXPHOS a través de la inducción de Atpif1, activa la síntesis *de novo* de ácidos grasos, favorece el consumo de las gotas lipídicas, estimula la síntesis de cardiolipinas y activa la monoinsaturación de ácidos grasos. El mayor consumo de glutamina inducido por c-Myc puede reponer el acetil-CoA para la biosíntesis de ácidos grasos durante la inhibición de Pdh por Pdk.

Conclusiones

Las conclusiones que se derivan de este trabajo de tesis doctoral son:

1. La expresión de *OSKM* induce una fragmentación mitocondrial dependiente de la fosforilación de Drp1-S579 durante la fase estocástica de la reprogramación celular.
2. La fosforilación temprana de Drp1-S579 durante la reprogramación celular a través de las quinasas Erk1/2 y Cdk1 es dependiente de c-Myc.
3. La activación temprana de Erk1/2 es dependiente del silenciamiento de *Dusp6* por OSKM durante la reprogramación celular.
4. La fisión mitocondrial inducida por OSKM no está asociada a una reducción de la masa mitocondrial por mitofagia durante la reprogramación celular.
5. C-Myc induce el cambio metabólico desde el estado somático-oxidativo al estado pluripotente-glucolítico durante la fase estocástica de la reprogramación celular.
6. C-Myc activa la expresión de enzimas glucolíticas y *Atpif1* durante el cambio metabólico de la fase estocástica de la reprogramación celular.
7. C-Myc activa la ruta de las pentosas fosfato y la biosíntesis *de novo* de ácidos grasos durante la fase estocástica de la reprogramación celular.
8. La reprogramación celular induce una remodelación del contenido lipídico de la célula que empieza en la fase estocástica y es dependiente de c-Myc.

The derived conclusions from this doctoral dissertation are:

1. *OSKM* expression induces a Drp1-S579 phosphorylation-dependent mitochondrial fragmentation during the stochastic phase of cell reprogramming.
2. Early Drp1-S579 phosphorylation during cell reprogramming by Erk1/2 and Cdk1 kinases is c-Myc-dependent.
3. Early activation of Erk1/2 depends on *Dusp6* downregulation by OSKM during cell reprogramming.
4. OSKM-induced mitochondrial fission is not associated with a mitochondrial mass reduction by mitophagy during cell reprogramming.
5. C-Myc induces a metabolic change from a somatic-oxidative to a pluripotent-glycolytic state during the stochastic phase of cell reprogramming.
6. C-Myc induces the expression of glycolytic enzymes and *Atpif1* during the metabolic change of the stochastic phase of cell reprogramming.
7. C-Myc activates both pentose phosphate pathway and *de novo* fatty acid biosynthesis during the stochastic phase of cell reprogramming.
8. Cell reprogramming induces a cellular lipid content remodeling which starts in the stochastic phase and is c-Myc-dependent.

Bibliografía

- Aasen, T., Raya, A., Barrero, M.J., Garreta, E., Consiglio, A., Gonzalez, F., Vassena, R., Bilic, J., Pekarik, V., Tiscornia, G., *et al.* (2008). Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol* 26, 1276-1284.
- Abad, M., Mosteiro, L., Pantoja, C., Canamero, M., Rayon, T., Ors, I., Grana, O., Megias, D., Dominguez, O., Martinez, D., *et al.* (2013). Reprogramming in vivo produces teratomas and iPS cells with totipotency features. *Nature* 502, 340-345.
- Adhikary, S., and Eilers, M. (2005). Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 635-645.
- Alexander, C., Votruba, M., Pesch, U.E., Thiselton, D.L., Mayer, S., Moore, A., Rodriguez, M., Kellner, U., Leo-Kottler, B., Auburger, G., *et al.* (2000). OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat Genet* 26, 211-215.
- Alison, M.R., and Islam, S. (2009). Attributes of adult stem cells. *J Pathol* 217, 144-160.
- Ambrosetti, D.C., Basilico, C., and Dailey, L. (1997). Synergistic activation of the fibroblast growth factor 4 enhancer by Sox2 and Oct-3 depends on protein-protein interactions facilitated by a specific spatial arrangement of factor binding sites. *Mol Cell Biol* 17, 6321-6329.
- Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., *et al.* (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290, 457-465.
- Ang, Y.S., Tsai, S.Y., Lee, D.F., Monk, J., Su, J., Ratnakumar, K., Ding, J., Ge, Y., Darr, H., Chang, B., *et al.* (2011). Wdr5 mediates self-renewal and reprogramming via the embryonic stem cell core transcriptional network. *Cell* 145, 183-197.
- Anton, R., Kestler, H.A., and Kuhl, M. (2007). Beta-catenin signaling contributes to stemness and regulates early differentiation in murine embryonic stem cells. *FEBS Lett* 581, 5247-5254.
- Aoi, T., Yae, K., Nakagawa, M., Ichisaka, T., Okita, K., Takahashi, K., Chiba, T., and Yamanaka, S. (2008). Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science* 321, 699-702.
- Apostolou, E., and Hochedlinger, K. (2013). Chromatin dynamics during cellular reprogramming. *Nature* 502, 462-471.
- Armstrong, L., Tilgner, K., Saretzki, G., Atkinson, S.P., Stojkovic, M., Moreno, R., Przyborski, S., and 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, 661-673.
- Arnoult, D. (2007). Mitochondrial fragmentation in apoptosis. *Trends Cell Biol* 17, 6-12.
- Ashrafi, G., and Schwarz, T.L. (2013). The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria. *Cell Death Differ* 20, 31-42.
- Banito, A., Rashid, S.T., Acosta, J.C., Li, S., Pereira, C.F., Geti, I., Pinho, S., Silva, J.C., Azuara, V., Walsh, M., *et al.* (2009). Senescence impairs successful reprogramming to pluripotent stem cells. *Genes Dev* 23, 2134-2139.

- Baxter, R.V., Ben Othmane, K., Rochelle, J.M., Stajich, J.E., Hulette, C., Dew-Knight, S., Hentati, F., Ben Hamida, M., Bel, S., Stenger, J.E., *et al.* (2002). Ganglioside-induced differentiation-associated protein-1 is mutant in Charcot-Marie-Tooth disease type 4A/8q21. *Nat Genet* 30, 21-22.
- Bereiter-Hahn, J., and Voth, M. (1994). Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microsc Res Tech* 27, 198-219.
- Bessonnard, S., De Mot, L., Gonze, D., Barriol, M., Dennis, C., Goldbeter, A., Dupont, G., and Chazaud, C. (2014). Gata6, Nanog and Erk signaling control cell fate in the inner cell mass through a tristable regulatory network. *Development* 141, 3637-3648.
- Birket, M.J., Orr, A.L., Gerencser, A.A., Madden, D.T., Vitelli, C., Swistowski, A., Brand, M.D., and Zeng, X. (2011). A reduction in ATP demand and mitochondrial activity with neural differentiation of human embryonic stem cells. *J Cell Sci* 124, 348-358.
- Bock, C., Kiskinis, E., Verstappen, G., Gu, H., Boulting, G., Smith, Z.D., Ziller, M., Croft, G.F., Amoroso, M.W., Oakley, D.H., *et al.* (2011). Reference Maps of human ES and iPS cell variation enable high-throughput characterization of pluripotent cell lines. *Cell* 144, 439-452.
- Boeuf, H., Hauss, C., Graeve, F.D., Baran, N., and Keding, C. (1997). Leukemia inhibitory factor-dependent transcriptional activation in embryonic stem cells. *J Cell Biol* 138, 1207-1217.
- Boland, M.L., Chourasia, A.H., and Macleod, K.F. (2013). Mitochondrial dysfunction in cancer. *Front Oncol* 3, 292.
- Bolte, S., and Cordelières, F.P. (2006). A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J Microsc* 224, 213-232.
- Born, T.L., Frost, J.A., Schonthal, A., Prendergast, G.C., and Feramisco, J.R. (1994). c-Myc cooperates with activated Ras to induce the cdc2 promoter. *Mol Cell Biol* 14, 5710-5718.
- Boyer, L.A., Lee, T.I., Cole, M.F., Johnstone, S.E., Levine, S.S., Zucker, J.P., Guenther, M.G., Kumar, R.M., Murray, H.L., Jenner, R.G., *et al.* (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 122, 947-956.
- Bracha, A.L., Ramanathan, A., Huang, S., Ingber, D.E., and Schreiber, S.L. (2010). Carbon metabolism-mediated myogenic differentiation. *Nat Chem Biol* 6, 202-204.
- Bradley, A., Evans, M., Kaufman, M.H., and Robertson, E. (1984). Formation of germline chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* 309, 255-256.
- Brambrink, T., Foreman, R., Welstead, G.G., Lengner, C.J., Wernig, M., Suh, H., and Jaenisch, R. (2008). Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. *Cell Stem Cell* 2, 151-159.
- Bretones, G., Delgado, M.D., and Leon, J. (2015). Myc and cell cycle control. *Biochim Biophys Acta* 1849, 506-516.

- Briggs, R., and King, T.J. (1952). Transplantation of Living Nuclei From Blastula Cells into Enucleated Frogs' Eggs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **38**, 455-463.
- Brinster, R.L. (1974). The effect of cells transferred into the mouse blastocyst on subsequent development. *J Exp Med* **140**, 1049-1056.
- Brons, I.G., Smithers, L.E., Trotter, M.W., Rugg-Gunn, P., Sun, B., Chuva de Sousa Lopes, S.M., Howlett, S.K., Clarkson, A., Ahrlund-Richter, L., Pedersen, R.A., *et al.* (2007). Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* **448**, 191-195.
- Buehr, M., Meek, S., Blair, K., Yang, J., Ure, J., Silva, J., McLay, R., Hall, J., Ying, Q.L., and Smith, A. (2008). Capture of authentic embryonic stem cells from rat blastocysts. *Cell* **135**, 1287-1298.
- Buganim, Y., Faddah, D.A., Cheng, A.W., Itskovich, E., Markoulaki, S., Ganz, K., Klemm, S.L., van Oudenaarden, A., and Jaenisch, R. (2012). Single-cell expression analyses during cellular reprogramming reveal an early stochastic and a late hierarchic phase. *Cell* **150**, 1209-1222.
- Buganim, Y., Faddah, D.A., and Jaenisch, R. (2013). Mechanisms and models of somatic cell reprogramming. *Nat Rev Genet* **14**, 427-439.
- Burdon, T., Stracey, C., Chambers, I., Nichols, J., and Smith, A. (1999). Suppression of SHP-2 and ERK signalling promotes self-renewal of mouse embryonic stem cells. *Dev Biol* **210**, 30-43.
- Cacchiarelli, D., Trapnell, C., Ziller, M.J., Soumillon, M., Cesana, M., Karnik, R., Donaghey, J., Smith, Z.D., Ratanasirintrao, S., Zhang, X., *et al.* (2015). Integrative Analyses of Human Reprogramming Reveal Dynamic Nature of Induced Pluripotency. *Cell* **162**, 412-424.
- Cao, Y., Guo, W.T., Tian, S., He, X., Wang, X.W., Liu, X., Gu, K.L., Ma, X., Huang, D., Hu, L., *et al.* (2015). miR-290/371-Mbd2-Myc circuit regulates glycolytic metabolism to promote pluripotency. *EMBO J* **34**, 609-623.
- Carey, B.W., Finley, L.W., Cross, J.R., Allis, C.D., and Thompson, C.B. (2015). Intracellular alpha-ketoglutarate maintains the pluripotency of embryonic stem cells. *Nature* **518**, 413-416.
- Carroll, P.A., Diolaiti, D., McFerrin, L., Gu, H., Djukovic, D., Du, J., Cheng, P.F., Anderson, S., Ulrich, M., Hurley, J.B., *et al.* (2015). Deregulated Myc requires MondoA/Mlx for metabolic reprogramming and tumorigenesis. *Cancer Cell* **27**, 271-285.
- Cartwright, P., McLean, C., Sheppard, A., Rivett, D., Jones, K., and Dalton, S. (2005). LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development* **132**, 885-896.
- Caunt, C.J., and Keyse, S.M. (2013). Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs): shaping the outcome of MAP kinase signalling. *FEBS J* **280**, 489-504.
- Cereghetti, G.M., Stangherlin, A., Martins de Brito, O., Chang, C.R., Blackstone, C., Bernardi, P., and Scorrano, L. (2008). Dephosphorylation by calcineurin regulates translocation of Drp1 to mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 15803-15808.

- Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., and Smith, A. (2003). Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* *113*, 643-655.
- Chambers, I., Silva, J., Colby, D., Nichols, J., Nijmeijer, B., Robertson, M., Vrana, J., Jones, K., Grotewold, L., and Smith, A. (2007). Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature* *450*, 1230-1234.
- Chan, N.C., Salazar, A.M., Pham, A.H., Sweredoski, M.J., Kolawa, N.J., Graham, R.L., Hess, S., and Chan, D.C. (2011). Broad activation of the ubiquitin-proteasome system by Parkin is critical for mitophagy. *Hum Mol Genet* *20*, 1726-1737.
- Chandel, N.S., Trzyna, W.C., McClintock, D.S., and Schumacker, P.T. (2000). Role of oxidants in NF-kappa B activation and TNF-alpha gene transcription induced by hypoxia and endotoxin. *J Immunol* *165*, 1013-1021.
- Chang, C.R., and Blackstone, C. (2007). Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation of Drp1 regulates its GTPase activity and mitochondrial morphology. *J Biol Chem* *282*, 21583-21587.
- Chappell, J., Sun, Y., Singh, A., and Dalton, S. (2013). MYC/MAX control ERK signaling and pluripotency by regulation of dual-specificity phosphatases 2 and 7. *Genes Dev* *27*, 725-733.
- Chazaud, C., Yamanaka, Y., Pawson, T., and Rossant, J. (2006). Early lineage segregation between epiblast and primitive endoderm in mouse blastocysts through the Grb2-MAPK pathway. *Dev Cell* *10*, 615-624.
- Chen, G., Gulbranson, D.R., Hou, Z., Bolin, J.M., Ruotti, V., Probasco, M.D., Smuga-Otto, K., Howden, S.E., Diol, N.R., Propson, N.E., *et al.* (2011a). Chemically defined conditions for human iPSC derivation and culture. *Nat Methods* *8*, 424-429.
- Chen, H., Chomyn, A., and Chan, D.C. (2005). Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J Biol Chem* *280*, 26185-26192.
- Chen, H., Detmer, S.A., Ewald, A.J., Griffin, E.E., Fraser, S.E., and Chan, D.C. (2003). Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol* *160*, 189-200.
- Chen, H., Guo, R., Zhang, Q., Guo, H., Yang, M., Wu, Z., Gao, S., Liu, L., and Chen, L. (2015). Erk signaling is indispensable for genomic stability and self-renewal of mouse embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *112*, E5936-5943.
- Chen, H., McCaffery, J.M., and Chan, D.C. (2007). Mitochondrial fusion protects against neurodegeneration in the cerebellum. *Cell* *130*, 548-562.
- Chen, H., Vermulst, M., Wang, Y.E., Chomyn, A., Prolla, T.A., McCaffery, J.M., and Chan, D.C. (2010). Mitochondrial fusion is required for mtDNA stability in skeletal muscle and tolerance of mtDNA mutations. *Cell* *141*, 280-289.
- Chen, Q., Zhou, Y., Zhao, X., and Zhang, M. (2011b). Effect of dual-specificity protein phosphatase 5 on pluripotency maintenance and differentiation of mouse embryonic stem cells. *J Cell Biochem* *112*, 3185-3193.
- Chen, T., Shen, L., Yu, J., Wan, H., Guo, A., Chen, J., Long, Y., Zhao, J., and Pei, G. (2011c). Rapamycin and other longevity-promoting compounds enhance the generation of mouse induced pluripotent stem cells. *Aging Cell* *10*, 908-911.

- Chen, Y., Shi, L., Zhang, L., Li, R., Liang, J., Yu, W., Sun, L., Yang, X., Wang, Y., Zhang, Y., *et al.* (2008). The molecular mechanism governing the oncogenic potential of SOX2 in breast cancer. *J Biol Chem* **283**, 17969-17978.
- Chin, M.H., Mason, M.J., Xie, W., Volinia, S., Singer, M., Peterson, C., Ambartsumyan, G., Aimiwu, O., Richter, L., Zhang, J., *et al.* (2009). Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. *Cell Stem Cell* **5**, 111-123.
- Cho, D.H., Nakamura, T., Fang, J., Cieplak, P., Godzik, A., Gu, Z., and Lipton, S.A. (2009). S-nitrosylation of Drp1 mediates beta-amyloid-related mitochondrial fission and neuronal injury. *Science* **324**, 102-105.
- Cho, Y.M., Kwon, S., Pak, Y.K., Seol, H.W., Choi, Y.M., Park, D.J., Park, K.S., and Lee, H.K. (2006). Dynamic changes in mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during the spontaneous differentiation of human embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* **348**, 1472-1478.
- Choi, H.W., Kim, J.H., Chung, M.K., Hong, Y.J., Jang, H.S., Seo, B.J., Jung, T.H., Kim, J.S., Chung, H.M., Byun, S.J., *et al.* (2015). Mitochondrial and metabolic remodeling during reprogramming and differentiation of the reprogrammed cells. *Stem Cells Dev* **24**, 1366-1373.
- Chou, C.H., Lin, C.C., Yang, M.C., Wei, C.C., Liao, H.D., Lin, R.C., Tu, W.Y., Kao, T.C., Hsu, C.M., Cheng, J.T., *et al.* (2012). GSK3beta-mediated Drp1 phosphorylation induced elongated mitochondrial morphology against oxidative stress. *PLoS One* **7**, e49112.
- Chung, S., Dzeja, P.P., Faustino, R.S., Perez-Terzic, C., Behfar, A., and Terzic, A. (2007). Mitochondrial oxidative metabolism is required for the cardiac differentiation of stem cells. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* **4 Suppl 1**, S60-67.
- Cibelli, J.B., Stice, S.L., Golueke, P.J., Kane, J.J., Jerry, J., Blackwell, C., Ponce de Leon, F.A., and Robl, J.M. (1998). Transgenic bovine chimeric offspring produced from somatic cell-derived stem-like cells. *Nat Biotechnol* **16**, 642-646.
- Cipolat, S., Martins de Brito, O., Dal Zilio, B., and Scorrano, L. (2004). OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 15927-15932.
- Claveria, C., Giovinazzo, G., Sierra, R., and Torres, M. (2013). Myc-driven endogenous cell competition in the early mammalian embryo. *Nature* **500**, 39-44.
- Clevers, H. (2006). Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* **127**, 469-480.
- Cloonan, S.M., and Choi, A.M. (2013). Mitochondria: sensors and mediators of innate immune receptor signaling. *Curr Opin Microbiol* **16**, 327-338.
- Cowan, C.A., Atienza, J., Melton, D.A., and Eggan, K. (2005). Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science* **309**, 1369-1373.
- Cribbs, J.T., and Strack, S. (2007). Reversible phosphorylation of Drp1 by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcineurin regulates mitochondrial fission and cell death. *EMBO Rep* **8**, 939-944.

- Curi, R., Newsholme, P., and Newsholme, E.A. (1988). Metabolism of pyruvate by isolated rat mesenteric lymphocytes, lymphocyte mitochondria and isolated mouse macrophages. *Biochem J* 250, 383-388.
- Davis, R.L., Weintraub, H., and Lassar, A.B. (1987). Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* 51, 987-1000.
- De Craene, B., and Berx, G. (2013). Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat Rev Cancer* 13, 97-110.
- DeBerardinis, R.J., Lum, J.J., Hatzivassiliou, G., and Thompson, C.B. (2008). The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab* 7, 11-20.
- Delettre, C., Lenaers, G., Griffoin, J.M., Gigarel, N., Lorenzo, C., Belenguer, P., Pelloquin, L., Grosgeorge, J., Turc-Carel, C., Perret, E., *et al.* (2000). Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat Genet* 26, 207-210.
- Deng, J., Shoemaker, R., Xie, B., Gore, A., LeProust, E.M., Antosiewicz-Bourget, J., Egli, D., Maherali, N., Park, I.H., Yu, J., *et al.* (2009). Targeted bisulfite sequencing reveals changes in DNA methylation associated with nuclear reprogramming. *Nat Biotechnol* 27, 353-360.
- Di Giorgio, F.P., Carrasco, M.A., Siao, M.C., Maniatis, T., and Eggan, K. (2007). Non-cell autonomous effect of glia on motor neurons in an embryonic stem cell-based ALS model. *Nat Neurosci* 10, 608-614.
- Ding, X., Wang, X., Sontag, S., Qin, J., Wanek, P., Lin, Q., and Zenke, M. (2014). The polycomb protein Ezh2 impacts on induced pluripotent stem cell generation. *Stem Cells Dev* 23, 931-940.
- Doble, B.W., Patel, S., Wood, G.A., Kockeritz, L.K., and Woodgett, J.R. (2007). Functional redundancy of GSK-3alpha and GSK-3beta in Wnt/beta-catenin signaling shown by using an allelic series of embryonic stem cell lines. *Dev Cell* 12, 957-971.
- Doi, A., Park, I.H., Wen, B., Murakami, P., Aryee, M.J., Irizarry, R., Herb, B., Ladd-Acosta, C., Rho, J., Loewer, S., *et al.* (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, 1350-1353.
- Dunn, S.J., Martello, G., Yordanov, B., Emmott, S., and Smith, A.G. (2014). Defining an essential transcription factor program for naive pluripotency. *Science* 344, 1156-1160.
- Eberlin, L.S., Gabay, M., Fan, A.C., Gouw, A.M., Tibshirani, R.J., Felsher, D.W., and Zare, R.N. (2014). Alteration of the lipid profile in lymphomas induced by MYC overexpression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 10450-10455.
- Edmunds, L.R., Sharma, L., Kang, A., Lu, J., Vockley, J., Basu, S., Uppala, R., Goetzman, E.S., Beck, M.E., Scott, D., *et al.* (2014). c-Myc programs fatty acid metabolism and dictates acetyl-CoA abundance and fate. *J Biol Chem* 289, 25382-25392.
- Edmunds, L.R., Sharma, L., Wang, H., Kang, A., d'Souza, S., Lu, J., McLaughlin, M., Dolezal, J.M., Gao, X., Weintraub, S.T., *et al.* (2015). c-Myc and AMPK Control

- Cellular Energy Levels by Cooperatively Regulating Mitochondrial Structure and Function. *PLoS One* 10, e0134049.
- Eggan, K., Akutsu, H., Loring, J., Jackson-Grusby, L., Klemm, M., Rideout, W.M., 3rd, Yanagimachi, R., and Jaenisch, R. (2001). Hybrid vigor, fetal overgrowth, and viability of mice derived by nuclear cloning and tetraploid embryo complementation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 6209-6214.
- Eminli, S., Foudi, A., Stadtfeld, M., Maherali, N., Ahfeldt, T., Mostoslavsky, G., Hock, H., and Hochedlinger, K. (2009). Differentiation stage determines potential of hematopoietic cells for reprogramming into induced pluripotent stem cells. *Nat Genet* 41, 968-976.
- Eminli, S., Utikal, J., Arnold, K., Jaenisch, R., and Hochedlinger, K. (2008). Reprogramming of neural progenitor cells into induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2 expression. *Stem Cells* 26, 2467-2474.
- Estaquier, J., and Arnoult, D. (2007). Inhibiting Drp1-mediated mitochondrial fission selectively prevents the release of cytochrome c during apoptosis. *Cell Death Differ* 14, 1086-1094.
- Esteban, M.A., Wang, T., Qin, B., Yang, J., Qin, D., Cai, J., Li, W., Weng, Z., Chen, J., Ni, S., *et al.* (2010). Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 6, 71-79.
- Evans, M.J., and Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-156.
- Ezashi, T., Das, P., and Roberts, R.M. (2005). Low O₂ tensions and the prevention of differentiation of hES cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 4783-4788.
- Facucho-Oliveira, J.M., Alderson, J., Spikings, E.C., Egginton, S., and St John, J.C. (2007). Mitochondrial DNA replication during differentiation of murine embryonic stem cells. *J Cell Sci* 120, 4025-4034.
- Fang, M., Shen, Z., Huang, S., Zhao, L., Chen, S., Mak, T.W., and Wang, X. (2010). The ER UDPase ENTPD5 promotes protein N-glycosylation, the Warburg effect, and proliferation in the PTEN pathway. *Cell* 143, 711-724.
- Feng, B., Jiang, J., Kraus, P., Ng, J.H., Heng, J.C., Chan, Y.S., Yaw, L.P., Zhang, W., Loh, Y.H., Han, J., *et al.* (2009a). Reprogramming of fibroblasts into induced pluripotent stem cells with orphan nuclear receptor Esrrb. *Nat Cell Biol* 11, 197-203.
- Feng, B., Ng, J.H., Heng, J.C., and Ng, H.H. (2009b). Molecules that promote or enhance reprogramming of somatic cells to induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 4, 301-312.
- Festuccia, N., Osorno, R., Halbritter, F., Karwacki-Neisius, V., Navarro, P., Colby, D., Wong, F., Yates, A., Tomlinson, S.R., and Chambers, I. (2012). Esrrb is a direct Nanog target gene that can substitute for Nanog function in pluripotent cells. *Cell Stem Cell* 11, 477-490.
- Finch, B.W., and Ephrussi, B. (1967). RETENTION OF MULTIPLE DEVELOPMENTAL POTENTIALITIES BY CELLS OF A MOUSE TESTICULAR TERATOCARCINOMA DURING PROLONGED CULTURE *in vitro* AND THEIR EXTINCTION UPON HYBRIDIZATION WITH CELLS OF PERMANENT LINES. *Proc Natl Acad Sci U S A* 57, 615-621.

- Folmes, C.D., Dzeja, P.P., Nelson, T.J., and Terzic, A. (2012). Metabolic plasticity in stem cell homeostasis and differentiation. *Cell Stem Cell* *11*, 596-606.
- Folmes, C.D., Martinez-Fernandez, A., Faustino, R.S., Yamada, S., Perez-Terzic, C., Nelson, T.J., and Terzic, A. (2013). Nuclear reprogramming with c-Myc potentiates glycolytic capacity of derived induced pluripotent stem cells. *J Cardiovasc Transl Res* *6*, 10-21.
- Folmes, C.D., Nelson, T.J., Martinez-Fernandez, A., Arrell, D.K., Lindor, J.Z., Dzeja, P.P., Ikeda, Y., Perez-Terzic, C., and Terzic, A. (2011). Somatic oxidative bioenergetics transitions into pluripotency-dependent glycolysis to facilitate nuclear reprogramming. *Cell Metab* *14*, 264-271.
- Folmes, C.D., and Terzic, A. (2016). Energy metabolism in the acquisition and maintenance of stemness. *Semin Cell Dev Biol* *52*, 68-75.
- Formentini, L., Sanchez-Arago, M., Sanchez-Cenizo, L., and Cuezva, J.M. (2012). The mitochondrial ATPase inhibitory factor 1 triggers a ROS-mediated retrograde prosurvival and proliferative response. *Mol Cell* *45*, 731-742.
- Frank, S., Gaume, B., Bergmann-Leitner, E.S., Leitner, W.W., Robert, E.G., Catez, F., Smith, C.L., and Youle, R.J. (2001). The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev Cell* *1*, 515-525.
- Friedman, J.R., Lackner, L.L., West, M., DiBenedetto, J.R., Nunnari, J., and Voeltz, G.K. (2011). ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science* *334*, 358-362.
- Gao, P., Tchernyshyov, I., Chang, T.C., Lee, Y.S., Kita, K., Ochi, T., Zeller, K.I., De Marzo, A.M., Van Eyk, J.E., Mendell, J.T., *et al.* (2009). c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. *Nature* *458*, 762-765.
- Garcia-Bermudez, J., and Cuezva, J.M. (2016). The ATPase Inhibitory Factor 1 (IF1): A master regulator of energy metabolism and of cell survival. *Biochim Biophys Acta* *1857*, 1167-1182.
- Gardner, R.L. (1998). The origin and efficient derivation of embryonic stem (ES) cells in the mouse. *Pathol Biol (Paris)* *46*, 676-677.
- Gardner, R.L., and Beddington, R.S. (1988). Multi-lineage 'stem' cells in the mammalian embryo. *J Cell Sci Suppl* *10*, 11-27.
- Gassmann, M., Donoho, G., and Berg, P. (1995). Maintenance of an extrachromosomal plasmid vector in mouse embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 1292-1296.
- Ghosh, Z., Wilson, K.D., Wu, Y., Hu, S., Quertermous, T., and Wu, J.C. (2010). Persistent donor cell gene expression among human induced pluripotent stem cells contributes to differences with human embryonic stem cells. *PLoS One* *5*, e8975.
- Gledhill, J.R., Montgomery, M.G., Leslie, A.G., and Walker, J.E. (2007). How the regulatory protein, IF(1), inhibits F(1)-ATPase from bovine mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 15671-15676.

- Gomes, L.C., Di Benedetto, G., and Scorrano, L. (2011). During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nat Cell Biol* 13, 589-598.
- Gu, H., Li, Q., Huang, S., Lu, W., Cheng, F., Gao, P., Wang, C., Miao, L., Mei, Y., and Wu, M. (2015). Mitochondrial E3 ligase March5 maintains stemness of mouse ES cells via suppression of ERK signalling. *Nat Commun* 6, 7112.
- Guan, J.L., Simon, A.K., Prescott, M., Menendez, J.A., Liu, F., Wang, F., Wang, C., Wolvetang, E., Vazquez-Martin, A., and Zhang, J. (2013). Autophagy in stem cells. *Autophagy* 9, 830-849.
- Guenther, M.G., Frampton, G.M., Soldner, F., Hockemeyer, D., Mitalipova, M., Jaenisch, R., and Young, R.A. (2010). Chromatin structure and gene expression programs of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 7, 249-257.
- Guo, G., Huss, M., Tong, G.Q., Wang, C., Li Sun, L., Clarke, N.D., and Robson, P. (2010). Resolution of cell fate decisions revealed by single-cell gene expression analysis from zygote to blastocyst. *Dev Cell* 18, 675-685.
- Guo, G., Yang, J., Nichols, J., Hall, J.S., Eyres, I., Mansfield, W., and Smith, A. (2009). Klf4 reverts developmentally programmed restriction of ground state pluripotency. *Development* 136, 1063-1069.
- Guo, S., Zi, X., Schulz, V.P., Cheng, J., Zhong, M., Koochaki, S.H., Megyola, C.M., Pan, X., Heydari, K., Weissman, S.M., *et al.* (2014). Nonstochastic reprogramming from a privileged somatic cell state. *Cell* 156, 649-662.
- Guppy, M., Greiner, E., and Brand, K. (1993). The role of the Crabtree effect and an endogenous fuel in the energy metabolism of resting and proliferating thymocytes. *Eur J Biochem* 212, 95-99.
- Gurdon, J.B. (1962). The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J Embryol Exp Morphol* 10, 622-640.
- Gurdon, J.B., Laskey, R.A., and Reeves, O.R. (1975). The developmental capacity of nuclei transplanted from keratinized skin cells of adult frogs. *J Embryol Exp Morphol* 34, 93-112.
- Haase, A., Olmer, R., Schwanke, K., Wunderlich, S., Merkert, S., Hess, C., Zweigerdt, R., Gruh, I., Meyer, J., Wagner, S., *et al.* (2009). Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood. *Cell Stem Cell* 5, 434-441.
- Han, G., Wang, Y., and Bi, W. (2012). C-Myc overexpression promotes osteosarcoma cell invasion via activation of MEK-ERK pathway. *Oncol Res* 20, 149-156.
- Han, X.J., Lu, Y.F., Li, S.A., Kaitsuka, T., Sato, Y., Tomizawa, K., Nairn, A.C., Takei, K., Matsui, H., and Matsushita, M. (2008). CaM kinase I alpha-induced phosphorylation of Drp1 regulates mitochondrial morphology. *J Cell Biol* 182, 573-585.
- Hanna, J., Markoulaki, S., Schorderet, P., Carey, B.W., Beard, C., Wernig, M., Creyghton, M.P., Steine, E.J., Cassady, J.P., Foreman, R., *et al.* (2008). Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. *Cell* 133, 250-264.

- Hanna, J., Saha, K., Pando, B., van Zon, J., Lengner, C.J., Creighton, M.P., van Oudenaarden, A., and Jaenisch, R. (2009). Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration. *Nature* **462**, 595-601.
- Hansson, J., Rafiee, M.R., Reiland, S., Polo, J.M., Gehring, J., Okawa, S., Huber, W., Hochedlinger, K., and Krijgsveld, J. (2012). Highly coordinated proteome dynamics during reprogramming of somatic cells to pluripotency. *Cell Rep* **2**, 1579-1592.
- Hara, T., Takamura, A., Kishi, C., Iemura, S., Natsume, T., Guan, J.L., and Mizushima, N. (2008). FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells. *J Cell Biol* **181**, 497-510.
- Hardie, D.G. (2011). AMPK and autophagy get connected. *EMBO J* **30**, 634-635.
- Hardie, D.G., and Pan, D.A. (2002). Regulation of fatty acid synthesis and oxidation by the AMP-activated protein kinase. *Biochem Soc Trans* **30**, 1064-1070.
- Hawkins, K.E., Joy, S., Delhove, J.M., Kotiadis, V.N., Fernandez, E., Fitzpatrick, L.M., Whiteford, J.R., King, P.J., Bolanos, J.P., Duchen, M.R., *et al.* (2016). NRF2 Orchestrates the Metabolic Shift during Induced Pluripotent Stem Cell Reprogramming. *Cell Rep* **14**, 1883-1891.
- Heikkila, R., Schwab, G., Wickstrom, E., Loke, S.L., Pluznik, D.H., Watt, R., and Neckers, L.M. (1987). A c-myc antisense oligodeoxynucleotide inhibits entry into S phase but not progress from G0 to G1. *Nature* **328**, 445-449.
- Hirsch, C.L., Coban Akdemir, Z., Wang, L., Jayakumaran, G., Trcka, D., Weiss, A., Hernandez, J.J., Pan, Q., Han, H., Xu, X., *et al.* (2015). Myc and SAGA rewire an alternative splicing network during early somatic cell reprogramming. *Genes Dev* **29**, 803-816.
- Hochedlinger, K., and Plath, K. (2009). Epigenetic reprogramming and induced pluripotency. *Development* **136**, 509-523.
- Hollenbeck, P.J., and Saxton, W.M. (2005). The axonal transport of mitochondria. *J Cell Sci* **118**, 5411-5419.
- Hom, J.R., Quintanilla, R.A., Hoffman, D.L., de Mesy Bentley, K.L., Molkentin, J.D., Sheu, S.S., and Porter, G.A., Jr. (2011). The permeability transition pore controls cardiac mitochondrial maturation and myocyte differentiation. *Dev Cell* **21**, 469-478.
- Hong, H., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Kanagawa, O., Nakagawa, M., Okita, K., and Yamanaka, S. (2009). Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway. *Nature* **460**, 1132-1135.
- Hooper, M., Hardy, K., Handyside, A., Hunter, S., and Monk, M. (1987). HPRT-deficient (Lesch-Nyhan) mouse embryos derived from germline colonization by cultured cells. *Nature* **326**, 292-295.
- Hou, P., Li, Y., Zhang, X., Liu, C., Guan, J., Li, H., Zhao, T., Ye, J., Yang, W., Liu, K., *et al.* (2013). Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science* **341**, 651-654.
- Huangfu, D., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Snitow, M., Chen, A.E., and Melton, D.A. (2008a). Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat Biotechnol* **26**, 795-797.

- Huangfu, D., Osafune, K., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Chen, S., Muhlestein, W., and Melton, D.A. (2008b). Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat Biotechnol* 26, 1269-1275.
- Inoki, K., Kim, J., and Guan, K.L. (2012). AMPK and mTOR in cellular energy homeostasis and drug targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 52, 381-400.
- Ischenko, I., Zhi, J., Moll, U.M., Nemajerova, A., and Petrenko, O. (2013). Direct reprogramming by oncogenic Ras and Myc. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 3937-3942.
- Ishihara, N., Nomura, M., Jofuku, A., Kato, H., Suzuki, S.O., Masuda, K., Otera, H., Nakanishi, Y., Nonaka, I., Goto, Y., *et al.* (2009). Mitochondrial fission factor Drp1 is essential for embryonic development and synapse formation in mice. *Nat Cell Biol* 11, 958-966.
- Ito, K., and Suda, T. (2014). Metabolic requirements for the maintenance of self-renewing stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 243-256.
- Ivanova, N., Dobrin, R., Lu, R., Kotenko, I., Levorse, J., DeCoste, C., Schafer, X., Lun, Y., and Lemischka, I.R. (2006). Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference. *Nature* 442, 533-538.
- Izpisua Belmonte, J.C., Callaway, E.M., Caddick, S.J., Churchland, P., Feng, G., Homanics, G.E., Lee, K.F., Leopold, D.A., Miller, C.T., Mitchell, J.F., *et al.* (2015). Brains, genes, and primates. *Neuron* 86, 617-631.
- Jacobson, J., and Duchon, M.R. (2004). Interplay between mitochondria and cellular calcium signalling. *Mol Cell Biochem* 256-257, 209-218.
- Ji, J., Sharma, V., Qi, S., Guarch, M.E., Zhao, P., Luo, Z., Fan, W., Wang, Y., Mbabaali, F., Neculai, D., *et al.* (2014). Antioxidant supplementation reduces genomic aberrations in human induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports* 2, 44-51.
- Jiang, J., Chan, Y.S., Loh, Y.H., Cai, J., Tong, G.Q., Lim, C.A., Robson, P., Zhong, S., and Ng, H.H. (2008). A core Klf circuitry regulates self-renewal of embryonic stem cells. *Nat Cell Biol* 10, 353-360.
- Johnson, L.V., Walsh, M.L., Bockus, B.J., and Chen, L.B. (1981). Monitoring of relative mitochondrial membrane potential in living cells by fluorescence microscopy. *J Cell Biol* 88, 526-535.
- Johnson, M.T., Mahmood, S., and Patel, M.S. (2003). Intermediary metabolism and energetics during murine early embryogenesis. *J Biol Chem* 278, 31457-31460.
- Judson, R.L., Babiarz, J.E., Venere, M., and Blelloch, R. (2009). Embryonic stem cell-specific microRNAs promote induced pluripotency. *Nat Biotechnol* 27, 459-461.
- Kahan, B.W., and Ephrussi, B. (1970). Developmental potentialities of clonal in vitro cultures of mouse testicular teratoma. *J Natl Cancer Inst* 44, 1015-1036.
- Kaji, K., Caballero, I.M., MacLeod, R., Nichols, J., Wilson, V.A., and Hendrich, B. (2006). The NuRD component Mbd3 is required for pluripotency of embryonic stem cells. *Nat Cell Biol* 8, 285-292.
- Kaji, K., Nichols, J., and Hendrich, B. (2007). Mbd3, a component of the NuRD co-repressor complex, is required for development of pluripotent cells. *Development* 134, 1123-1132.

- Kaji, K., Norrby, K., Paca, A., Mileikovsky, M., Mohseni, P., and Woltjen, K. (2009). Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature* *458*, 771-775.
- Kanki, T., Wang, K., and Klionsky, D.J. (2010). A genomic screen for yeast mutants defective in mitophagy. *Autophagy* *6*, 278-280.
- Kasahara, A., Cipolat, S., Chen, Y., Dorn, G.W., 2nd, and Scorrano, L. (2013). Mitochondrial fusion directs cardiomyocyte differentiation via calcineurin and Notch signaling. *Science* *342*, 734-737.
- Kashatus, D.F., Lim, K.H., Brady, D.C., Pershing, N.L., Cox, A.D., and Counter, C.M. (2011). RALA and RALBP1 regulate mitochondrial fission at mitosis. *Nat Cell Biol* *13*, 1108-1115.
- Kashatus, J.A., Nascimento, A., Myers, L.J., Sher, A., Byrne, F.L., Hoehn, K.L., Counter, C.M., and Kashatus, D.F. (2015). Erk2 phosphorylation of Drp1 promotes mitochondrial fission and MAPK-driven tumor growth. *Mol Cell* *57*, 537-551.
- Kashyap, V., Rezende, N.C., Scotland, K.B., Shaffer, S.M., Persson, J.L., Gudas, L.J., and Mongan, N.P. (2009). Regulation of stem cell pluripotency and differentiation involves a mutual regulatory circuit of the NANOG, OCT4, and SOX2 pluripotency transcription factors with polycomb repressive complexes and stem cell microRNAs. *Stem Cells Dev* *18*, 1093-1108.
- Kawamura, T., Suzuki, J., Wang, Y.V., Menendez, S., Morera, L.B., Raya, A., Wahl, G.M., and Izpisua Belmonte, J.C. (2009). Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming. *Nature* *460*, 1140-1144.
- Keller, G. (2005). Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine. *Genes Dev* *19*, 1129-1155.
- Kelly, R.D., Mahmud, A., McKenzie, M., Trounce, I.A., and St John, J.C. (2012). Mitochondrial DNA copy number is regulated in a tissue specific manner by DNA methylation of the nuclear-encoded DNA polymerase gamma A. *Nucleic Acids Res* *40*, 10124-10138.
- Kelly, R.D., Sumer, H., McKenzie, M., Facucho-Oliveira, J., Trounce, I.A., Verma, P.J., and St John, J.C. (2013). The effects of nuclear reprogramming on mitochondrial DNA replication. *Stem Cell Rev* *9*, 1-15.
- Kelly, S.J. (1977). Studies of the developmental potential of 4- and 8-cell stage mouse blastomeres. *J Exp Zool* *200*, 365-376.
- Kerkhoff, E., Houben, R., Loffler, S., Troppmair, J., Lee, J.E., and Rapp, U.R. (1998). Regulation of c-myc expression by Ras/Raf signalling. *Oncogene* *16*, 211-216.
- Khacho, M., Clark, A., Svoboda, D.S., Azzi, J., MacLaurin, J.G., Meghaizel, C., Sesaki, H., Lagace, D.C., Germain, M., Harper, M.E., *et al.* (2016). Mitochondrial Dynamics Impacts Stem Cell Identity and Fate Decisions by Regulating a Nuclear Transcriptional Program. *Cell Stem Cell* *19*, 232-247.
- Kida, Y.S., Kawamura, T., Wei, Z., Sogo, T., Jacinto, S., Shigeno, A., Kushige, H., Yoshihara, E., Liddle, C., Ecker, J.R., *et al.* (2015). ERRs Mediate a Metabolic Switch Required for Somatic Cell Reprogramming to Pluripotency. *Cell Stem Cell* *16*, 547-555.

- Kiebish, M.A., Han, X., Cheng, H., Chuang, J.H., and Seyfried, T.N. (2008). Cardiolipin and electron transport chain abnormalities in mouse brain tumor mitochondria: lipidomic evidence supporting the Warburg theory of cancer. *J Lipid Res* 49, 2545-2556.
- Kim, I., Rodriguez-Enriquez, S., and Lemasters, J.J. (2007a). Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Arch Biochem Biophys* 462, 245-253.
- Kim, J.B., Greber, B., Arauzo-Bravo, M.J., Meyer, J., Park, K.I., Zaehres, H., and Scholer, H.R. (2009). Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4. *Nature* 461, 649-643.
- Kim, J.B., Zaehres, H., Wu, G., Gentile, L., Ko, K., Sebastiano, V., Arauzo-Bravo, M.J., Ruau, D., Han, D.W., Zenke, M., *et al.* (2008). Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature* 454, 646-650.
- Kim, J.W., Gao, P., Liu, Y.C., Semenza, G.L., and Dang, C.V. (2007b). Hypoxia-inducible factor 1 and dysregulated c-Myc cooperatively induce vascular endothelial growth factor and metabolic switches hexokinase 2 and pyruvate dehydrogenase kinase 1. *Mol Cell Biol* 27, 7381-7393.
- Kim, J.W., Tchernyshyov, I., Semenza, G.L., and Dang, C.V. (2006). HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab* 3, 177-185.
- Kim, K., Doi, A., Wen, B., Ng, K., Zhao, R., Cahan, P., Kim, J., Aryee, M.J., Ji, H., Ehrlich, L.I., *et al.* (2010). Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature* 467, 285-290.
- Kim, K., Zhao, R., Doi, A., Ng, K., Unternaehrer, J., Cahan, P., Huo, H., Loh, Y.H., Aryee, M.J., Lensch, M.W., *et al.* (2011). Donor cell type can influence the epigenome and differentiation potential of human induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 29, 1117-1119.
- King, T.J., and Briggs, R. (1955). Changes in the Nuclei of Differentiating Gastrula Cells, as Demonstrated by Nuclear Transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 41, 321-325.
- Kleinsmith, L.J., and Pierce, G.B., Jr. (1964). Multipotentiality of Single Embryonal Carcinoma Cells. *Cancer Res* 24, 1544-1551.
- Knobloch, M., Braun, S.M., Zurkirchen, L., von Schoutz, C., Zamboni, N., Arauzo-Bravo, M.J., Kovacs, W.J., Karalay, O., Suter, U., Machado, R.A., *et al.* (2013). Metabolic control of adult neural stem cell activity by Fasn-dependent lipogenesis. *Nature* 493, 226-230.
- Knoepfler, P.S. (2007). Myc goes global: new tricks for an old oncogene. *Cancer Res* 67, 5061-5063.
- Knoepfler, P.S. (2008). Why myc? An unexpected ingredient in the stem cell cocktail. *Cell Stem Cell* 2, 18-21.
- Knoepfler, P.S., Cheng, P.F., and Eisenman, R.N. (2002). N-myc is essential during neurogenesis for the rapid expansion of progenitor cell populations and the inhibition of neuronal differentiation. *Genes Dev* 16, 2699-2712.

- Knoepfler, P.S., Zhang, X.Y., Cheng, P.F., Gafken, P.R., McMahon, S.B., and Eisenman, R.N. (2006). Myc influences global chromatin structure. *EMBO J* 25, 2723-2734.
- Kopp, J.L., Ormsbee, B.D., Desler, M., and Rizzino, A. (2008). Small increases in the level of Sox2 trigger the differentiation of mouse embryonic stem cells. *Stem Cells* 26, 903-911.
- Korobova, F., Ramabhadran, V., and Higgs, H.N. (2013). An actin-dependent step in mitochondrial fission mediated by the ER-associated formin INF2. *Science* 339, 464-467.
- Koshiha, T., Detmer, S.A., Kaiser, J.T., Chen, H., McCaffery, J.M., and Chan, D.C. (2004). Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science* 305, 858-862.
- Krizhanovsky, V., and Lowe, S.W. (2009). Stem cells: The promises and perils of p53. *Nature* 460, 1085-1086.
- Kulesa, H., Frampton, J., and Graf, T. (1995). GATA-1 reprograms avian myelomonocytic cell lines into eosinophils, thromboblats, and erythroblasts. *Genes Dev* 9, 1250-1262.
- Kunath, T., Saba-EI-Leil, M.K., Almousailleakh, M., Wray, J., Meloche, S., and Smith, A. (2007). FGF stimulation of the Erk1/2 signalling cascade triggers transition of pluripotent embryonic stem cells from self-renewal to lineage commitment. *Development* 134, 2895-2902.
- Kwon, J., Lee, S.R., Yang, K.S., Ahn, Y., Kim, Y.J., Stadtman, E.R., and Rhee, S.G. (2004). Reversible oxidation and inactivation of the tumor suppressor PTEN in cells stimulated with peptide growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 16419-16424.
- Larsson, N.G., Wang, J., Wilhelmsson, H., Oldfors, A., Rustin, P., Lewandoski, M., Barsh, G.S., and Clayton, D.A. (1998). Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. *Nat Genet* 18, 231-236.
- Laurenti, E., Wilson, A., and Trumpp, A. (2009). Myc's other life: stem cells and beyond. *Curr Opin Cell Biol* 21, 844-854.
- Lee, S.R., Yang, K.S., Kwon, J., Lee, C., Jeong, W., and Rhee, S.G. (2002). Reversible inactivation of the tumor suppressor PTEN by H₂O₂. *J Biol Chem* 277, 20336-20342.
- Lee, Y.J., Jeong, S.Y., Karbowski, M., Smith, C.L., and Youle, R.J. (2004). Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in apoptosis. *Mol Biol Cell* 15, 5001-5011.
- Legros, F., Lombes, A., Frachon, P., and Rojo, M. (2002). Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins. *Mol Biol Cell* 13, 4343-4354.
- Lei, H., Oh, S.P., Okano, M., Juttermann, R., Goss, K.A., Jaenisch, R., and Li, E. (1996). De novo DNA cytosine methyltransferase activities in mouse embryonic stem cells. *Development* 122, 3195-3205.

- Lewis, M.R., and Lewis, W.H. (1914). Mitochondria in Tissue Culture. *Science* 39, 330-333.
- Li, H., Collado, M., Villasante, A., Matheu, A., Lynch, C.J., Canamero, M., Rizzoti, K., Carneiro, C., Martinez, G., Vidal, A., *et al.* (2012a). p27(Kip1) directly represses Sox2 during embryonic stem cell differentiation. *Cell Stem Cell* 11, 845-852.
- Li, H., Collado, M., Villasante, A., Strati, K., Ortega, S., Canamero, M., Blasco, M.A., and Serrano, M. (2009a). The Ink4/Arf locus is a barrier for iPS cell reprogramming. *Nature* 460, 1136-1139.
- Li, J., Li, J., and Chen, B. (2012b). Oct4 was a novel target of Wnt signaling pathway. *Mol Cell Biochem* 362, 233-240.
- Li, P., Tong, C., Mehrian-Shai, R., Jia, L., Wu, N., Yan, Y., Maxson, R.E., Schulze, E.N., Song, H., Hsieh, C.L., *et al.* (2008). Germline competent embryonic stem cells derived from rat blastocysts. *Cell* 135, 1299-1310.
- Li, R., Liang, J., Ni, S., Zhou, T., Qing, X., Li, H., He, W., Chen, J., Li, F., Zhuang, Q., *et al.* (2010). A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell* 7, 51-63.
- Li, W., and Ding, S. (2010). Small molecules that modulate embryonic stem cell fate and somatic cell reprogramming. *Trends Pharmacol Sci* 31, 36-45.
- Li, W., Wei, W., Zhu, S., Zhu, J., Shi, Y., Lin, T., Hao, E., Hayek, A., Deng, H., and Ding, S. (2009b). Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors. *Cell Stem Cell* 4, 16-19.
- Liao, B., Bao, X., Liu, L., Feng, S., Zovoilis, A., Liu, W., Xue, Y., Cai, J., Guo, X., Qin, B., *et al.* (2011). MicroRNA cluster 302-367 enhances somatic cell reprogramming by accelerating a mesenchymal-to-epithelial transition. *J Biol Chem* 286, 17359-17364.
- Lin, T., Chao, C., Saito, S., Mazur, S.J., Murphy, M.E., Appella, E., and Xu, Y. (2005). p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing Nanog expression. *Nat Cell Biol* 7, 165-171.
- Lister, R., Pelizzola, M., Kida, Y.S., Hawkins, R.D., Nery, J.R., Hon, G., Antosiewicz-Bourget, J., O'Malley, R., Castanon, R., Klugman, S., *et al.* (2011). Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature* 471, 68-73.
- Liu, H., Zhu, F., Yong, J., Zhang, P., Hou, P., Li, H., Jiang, W., Cai, J., Liu, M., Cui, K., *et al.* (2008). Generation of induced pluripotent stem cells from adult rhesus monkey fibroblasts. *Cell Stem Cell* 3, 587-590.
- Liu, W., Long, Q., Chen, K., Li, S., Xiang, G., Chen, S., Liu, X., Li, Y., Yang, L., Dong, D., *et al.* (2013). Mitochondrial metabolism transition cooperates with nuclear reprogramming during induced pluripotent stem cell generation. *Biochem Biophys Res Commun* 431, 767-771.
- Liu, Z.J., Ueda, T., Miyazaki, T., Tanaka, N., Mine, S., Tanaka, Y., Taniguchi, T., Yamamura, H., and Minami, Y. (1998). A critical role for cyclin C in promotion of the hematopoietic cell cycle by cooperation with c-Myc. *Mol Cell Biol* 18, 3445-3454.

- Loh, Y.H., Wu, Q., Chew, J.L., Vega, V.B., Zhang, W., Chen, X., Bourque, G., George, J., Leong, B., Liu, J., *et al.* (2006). The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat Genet* 38, 431-440.
- Lonergan, T., Brenner, C., and Bavister, B. (2006). Differentiation-related changes in mitochondrial properties as indicators of stem cell competence. *J Cell Physiol* 208, 149-153.
- Lopez Del Amo, V., Seco-Cervera, M., Garcia-Gimenez, J.L., Whitworth, A.J., Pallardo, F.V., and Galindo, M.I. (2015). Mitochondrial defects and neuromuscular degeneration caused by altered expression of *Drosophila* Gdap1: implications for the Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Hum Mol Genet* 24, 21-36.
- Loson, O.C., Song, Z., Chen, H., and Chan, D.C. (2013). Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission. *Mol Biol Cell* 24, 659-667.
- Lunt, S.Y., and Vander Heiden, M.G. (2011). Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 27, 441-464.
- Ma, T., Li, J., Xu, Y., Yu, C., Xu, T., Wang, H., Liu, K., Cao, N., Nie, B.M., Zhu, S.Y., *et al.* (2015). Atg5-independent autophagy regulates mitochondrial clearance and is essential for iPSC reprogramming. *Nat Cell Biol* 17, 1379-1387.
- Maherali, N., Ahfeldt, T., Rigamonti, A., Utikal, J., Cowan, C., and Hochedlinger, K. (2008). A high-efficiency system for the generation and study of human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 3, 340-345.
- Maherali, N., Sridharan, R., Xie, W., Utikal, J., Eminli, S., Arnold, K., Stadtfeld, M., Yachechko, R., Tchieu, J., Jaenisch, R., *et al.* (2007). Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell* 1, 55-70.
- Mandal, S., Lindgren, A.G., Srivastava, A.S., Clark, A.T., and Banerjee, U. (2011). Mitochondrial function controls proliferation and early differentiation potential of embryonic stem cells. *Stem Cells* 29, 486-495.
- Manganelli, G., Fico, A., Masullo, U., Pizzolongo, F., Cimmino, A., and Filosa, S. (2012). Modulation of the pentose phosphate pathway induces endodermal differentiation in embryonic stem cells. *PLoS One* 7, e29321.
- Mao, K., Wang, K., Liu, X., and Klionsky, D.J. (2013). The scaffold protein Atg11 recruits fission machinery to drive selective mitochondria degradation by autophagy. *Dev Cell* 26, 9-18.
- Marchetto, M.C., Yeo, G.W., Kainohana, O., Marsala, M., Gage, F.H., and Muotri, A.R. (2009). Transcriptional signature and memory retention of human-induced pluripotent stem cells. *PLoS One* 4, e7076.
- Marion, R.M., Strati, K., Li, H., Murga, M., Blanco, R., Ortega, S., Fernandez-Capetillo, O., Serrano, M., and Blasco, M.A. (2009). A p53-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure iPS cell genomic integrity. *Nature* 460, 1149-1153.
- Marks, H., Kalkan, T., Menafra, R., Denissov, S., Jones, K., Hofemeister, H., Nichols, J., Kranz, A., Stewart, A.F., Smith, A., *et al.* (2012). The transcriptional and epigenomic foundations of ground state pluripotency. *Cell* 149, 590-604.

- Marshall, G.M., Liu, P.Y., Gherardi, S., Scarlett, C.J., Bedalov, A., Xu, N., Iraci, N., Valli, E., Ling, D., Thomas, W., *et al.* (2011). SIRT1 promotes N-Myc oncogenesis through a positive feedback loop involving the effects of MKP3 and ERK on N-Myc protein stability. *PLoS Genet* 7, e1002135.
- Martello, G., and Smith, A. (2014). The nature of embryonic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 30, 647-675.
- Martin, G.R. (1975). Teratocarcinomas as a model system for the study of embryogenesis and neoplasia. *Cell* 5, 229-243.
- Martin, G.R. (1980). Teratocarcinomas and mammalian embryogenesis. *Science* 209, 768-776.
- Martin, G.R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 7634-7638.
- Martin, G.R., and Evans, M.J. (1975). Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: formation of embryoid bodies in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 1441-1445.
- Masui, S., Nakatake, Y., Toyooka, Y., Shimosato, D., Yagi, R., Takahashi, K., Okochi, H., Okuda, A., Matoba, R., Sharov, A.A., *et al.* (2007). Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol* 9, 625-635.
- Mathieu, J., Zhou, W., Xing, Y., Sperber, H., Ferreccio, A., Agoston, Z., Kuppusamy, K.T., Moon, R.T., and Ruohola-Baker, H. (2014). Hypoxia-inducible factors have distinct and stage-specific roles during reprogramming of human cells to pluripotency. *Cell Stem Cell* 14, 592-605.
- Matsuda, T., Nakamura, T., Nakao, K., Arai, T., Katsuki, M., Heike, T., and Yokota, T. (1999). STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *EMBO J* 18, 4261-4269.
- Matsui, T., Leung, D., Miyashita, H., Maksakova, I.A., Miyachi, H., Kimura, H., Tachibana, M., Lorincz, M.C., and Shinkai, Y. (2010). Proviral silencing in embryonic stem cells requires the histone methyltransferase ESET. *Nature* 464, 927-931.
- Matsui, Y., Zsebo, K., and Hogan, B.L. (1992). Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell* 70, 841-847.
- McMahon, A.P., and Bradley, A. (1990). The Wnt-1 (int-1) proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain. *Cell* 62, 1073-1085.
- Mears, J.A., Lackner, L.L., Fang, S., Ingerman, E., Nunnari, J., and Hinshaw, J.E. (2011). Conformational changes in Dnm1 support a contractile mechanism for mitochondrial fission. *Nat Struct Mol Biol* 18, 20-26.
- Meissner, A., Wernig, M., and Jaenisch, R. (2007). Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 25, 1177-1181.
- Menendez, J.A., and Lupu, R. (2007). Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nat Rev Cancer* 7, 763-777.

- Meng, T.C., Fukada, T., and Tonks, N.K. (2002). Reversible oxidation and inactivation of protein tyrosine phosphatases in vivo. *Mol Cell* 9, 387-399.
- Menssen, A., and Hermeking, H. (2002). Characterization of the c-MYC-regulated transcriptome by SAGE: identification and analysis of c-MYC target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 6274-6279.
- Metallo, C.M., Gameiro, P.A., Bell, E.L., Mattaini, K.R., Yang, J., Hiller, K., Jewell, C.M., Johnson, Z.R., Irvine, D.J., Guarente, L., *et al.* (2011). Reductive glutamine metabolism by IDH1 mediates lipogenesis under hypoxia. *Nature* 481, 380-384.
- Mikkelsen, T.S., Hanna, J., Zhang, X., Ku, M., Wernig, M., Schorderet, P., Bernstein, B.E., Jaenisch, R., Lander, E.S., and Meissner, A. (2008). Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature* 454, 49-55.
- Miller, R.A., and Ruddle, F.H. (1976). Pluripotent teratocarcinoma-thymus somatic cell hybrids. *Cell* 9, 45-55.
- Miller, R.A., and Ruddle, F.H. (1977). Teratocarcinoma X friend erythroleukemia cell hybrids resemble their pluripotent embryonal carcinoma parent. *Dev Biol* 56, 157-173.
- Mishra, P., and Chan, D.C. (2016). Metabolic regulation of mitochondrial dynamics. *J Cell Biol* 212, 379-387.
- Mitra, K., Wunder, C., Roysam, B., Lin, G., and Lippincott-Schwartz, J. (2009). A hyperfused mitochondrial state achieved at G1-S regulates cyclin E buildup and entry into S phase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 11960-11965.
- Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M., and Yamanaka, S. (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 113, 631-642.
- Miura, K., Okada, Y., Aoi, T., Okada, A., Takahashi, K., Okita, K., Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Ohnuki, M., *et al.* (2009). Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *Nat Biotechnol* 27, 743-745.
- Mohyeldin, A., Garzon-Muvdi, T., and Quinones-Hinojosa, A. (2010). Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. *Cell Stem Cell* 7, 150-161.
- Montal, E.D., Dewi, R., Bhalla, K., Ou, L., Hwang, B.J., Ropell, A.E., Gordon, C., Liu, W.J., DeBerardinis, R.J., Sudderth, J., *et al.* (2015). PEPCK Coordinates the Regulation of Central Carbon Metabolism to Promote Cancer Cell Growth. *Mol Cell* 60, 571-583.
- Morikawa, M., Koinuma, D., Mizutani, A., Kawasaki, N., Holmborn, K., Sundqvist, A., Tsutsumi, S., Watabe, T., Aburatani, H., Heldin, C.H., *et al.* (2016). BMP Sustains Embryonic Stem Cell Self-Renewal through Distinct Functions of Different Kruppel-like Factors. *Stem Cell Reports* 6, 64-73.
- Morita, S., Kojima, T., and Kitamura, T. (2000). Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. *Gene Ther* 7, 1063-1066.
- Morrish, F., Neretti, N., Sedivy, J.M., and Hockenbery, D.M. (2008). The oncogene c-Myc coordinates regulation of metabolic networks to enable rapid cell cycle entry. *Cell Cycle* 7, 1054-1066.

- Morrison, S.J., Shah, N.M., and Anderson, D.J. (1997). Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell* **88**, 287-298.
- Moussaieff, A., Rouleau, M., Kitsberg, D., Cohen, M., Levy, G., Barasch, D., Nemirovski, A., Shen-Orr, S., Laevsky, I., Amit, M., *et al.* (2015). Glycolysis-mediated changes in acetyl-CoA and histone acetylation control the early differentiation of embryonic stem cells. *Cell Metab* **21**, 392-402.
- Mozdy, A.D., McCaffery, J.M., and Shaw, J.M. (2000). Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fission is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fis1p. *J Cell Biol* **151**, 367-380.
- Mullen, A.R., Wheaton, W.W., Jin, E.S., Chen, P.H., Sullivan, L.B., Cheng, T., Yang, Y., Linehan, W.M., Chandel, N.S., and DeBerardinis, R.J. (2011). Reductive carboxylation supports growth in tumour cells with defective mitochondria. *Nature* **481**, 385-388.
- Munsie, M.J., Michalska, A.E., O'Brien, C.M., Trounson, A.O., Pera, M.F., and Mountford, P.S. (2000). Isolation of pluripotent embryonic stem cells from reprogrammed adult mouse somatic cell nuclei. *Curr Biol* **10**, 989-992.
- Nagy, A., Gocza, E., Diaz, E.M., Prideaux, V.R., Ivanyi, E., Markkula, M., and Rossant, J. (1990). Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse. *Development* **110**, 815-821.
- Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Okita, K., Mochiduki, Y., Takizawa, N., and Yamanaka, S. (2008). Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* **26**, 101-106.
- Nakagawa, M., Takizawa, N., Narita, M., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2010). Promotion of direct reprogramming by transformation-deficient Myc. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 14152-14157.
- Nakamura, N., Kimura, Y., Tokuda, M., Honda, S., and Hirose, S. (2006). MARCH-V is a novel mitofusin 2- and Drp1-binding protein able to change mitochondrial morphology. *EMBO Rep* **7**, 1019-1022.
- Navarro, P., Festuccia, N., Colby, D., Gagliardi, A., Mullin, N.P., Zhang, W., Karwacki-Neisius, V., Osorno, R., Kelly, D., Robertson, M., *et al.* (2012). OCT4/SOX2-independent Nanog autorepression modulates heterogeneous Nanog gene expression in mouse ES cells. *EMBO J* **31**, 4547-4562.
- Nelis, E., Erdem, S., Van Den Bergh, P.Y., Belpaire-Dethiou, M.C., Ceuterick, C., Van Gerwen, V., Cuesta, A., Pedrola, L., Palau, F., Gabreels-Festen, A.A., *et al.* (2002). Mutations in GDAP1: autosomal recessive CMT with demyelination and axonopathy. *Neurology* **59**, 1865-1872.
- Newman, A.M., and Cooper, J.B. (2010). Lab-specific gene expression signatures in pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* **7**, 258-262.
- Nicholas, C.R., and Kriegstein, A.R. (2010). Regenerative medicine: Cell reprogramming gets direct. *Nature* **463**, 1031-1032.
- Nichols, J., Jones, K., Phillips, J.M., Newland, S.A., Roode, M., Mansfield, W., Smith, A., and Cooke, A. (2009a). Validated germline-competent embryonic stem cell lines from nonobese diabetic mice. *Nat Med* **15**, 814-818.

- Nichols, J., Silva, J., Roode, M., and Smith, A. (2009b). Suppression of Erk signalling promotes ground state pluripotency in the mouse embryo. *Development* **136**, 3215-3222.
- Nichols, J., and Smith, A. (2009). Naive and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell* **4**, 487-492.
- Nichols, J., and Smith, A. (2012). Pluripotency in the embryo and in culture. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**, a008128.
- Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Scholer, H., and Smith, A. (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* **95**, 379-391.
- Niemann, A., Ruegg, M., La Padula, V., Schenone, A., and Suter, U. (2005). Ganglioside-induced differentiation associated protein 1 is a regulator of the mitochondrial network: new implications for Charcot-Marie-Tooth disease. *J Cell Biol* **170**, 1067-1078.
- Niemann, A., Wagner, K.M., Ruegg, M., and Suter, U. (2009). GDAP1 mutations differ in their effects on mitochondrial dynamics and apoptosis depending on the mode of inheritance. *Neurobiol Dis* **36**, 509-520.
- Niwa, H., Burdon, T., Chambers, I., and Smith, A. (1998). Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev* **12**, 2048-2060.
- Niwa, H., Miyazaki, J., and Smith, A.G. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* **24**, 372-376.
- Niwa, H., Ogawa, K., Shimosato, D., and Adachi, K. (2009). A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. *Nature* **460**, 118-122.
- Nunes-Xavier, C.E., Martin-Perez, J., Elson, A., and Pulido, R. (2013). Protein tyrosine phosphatases as novel targets in breast cancer therapy. *Biochim Biophys Acta* **1836**, 211-226.
- O'Malley, J., Skylaki, S., Iwabuchi, K.A., Chantzoura, E., Ruetz, T., Johnsson, A., Tomlinson, S.R., Linnarsson, S., and Kaji, K. (2013). High-resolution analysis with novel cell-surface markers identifies routes to iPS cells. *Nature* **499**, 88-91.
- Odorico, J.S., Kaufman, D.S., and Thomson, J.A. (2001). Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells* **19**, 193-204.
- Ohi, Y., Qin, H., Hong, C., Blouin, L., Polo, J.M., Guo, T., Qi, Z., Downey, S.L., Manos, P.D., Rossi, D.J., *et al.* (2011). Incomplete DNA methylation underlies a transcriptional memory of somatic cells in human iPS cells. *Nat Cell Biol* **13**, 541-549.
- Ohnishi, K., Semi, K., Yamamoto, T., Shimizu, M., Tanaka, A., Mitsunaga, K., Okita, K., Osafune, K., Arioka, Y., Maeda, T., *et al.* (2014). Premature termination of reprogramming in vivo leads to cancer development through altered epigenetic regulation. *Cell* **156**, 663-677.

- Ohtsuka, S., Nakai-Futatsugi, Y., and Niwa, H. (2015). LIF signal in mouse embryonic stem cells. *JAKSTAT* 4, e1086520.
- Okamoto, K., Okazawa, H., Okuda, A., Sakai, M., Muramatsu, M., and Hamada, H. (1990). A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells. *Cell* 60, 461-472.
- Okita, K., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2007). Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448, 313-317.
- Okita, K., Nakagawa, M., Hyenjong, H., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2008). Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* 322, 949-953.
- Olichon, A., Baricault, L., Gas, N., Guillou, E., Valette, A., Belenguer, P., and Lenaers, G. (2003). Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem* 278, 7743-7746.
- Osellame, L.D., Singh, A.P., Stroud, D.A., Palmer, C.S., Stojanovski, D., Ramachandran, R., and Ryan, M.T. (2016). Cooperative and independent roles of the Drp1 adaptors Mff, MiD49 and MiD51 in mitochondrial fission. *J Cell Sci* 129, 2170-2181.
- Osorno, R., Tsakiridis, A., Wong, F., Cambray, N., Economou, C., Wilkie, R., Blin, G., Scotting, P.J., Chambers, I., and Wilson, V. (2012). The developmental dismantling of pluripotency is reversed by ectopic Oct4 expression. *Development* 139, 2288-2298.
- Otera, H., Ishihara, N., and Mihara, K. (2013). New insights into the function and regulation of mitochondrial fission. *Biochim Biophys Acta* 1833, 1256-1268.
- Otera, H., Wang, C., Cleland, M.M., Setoguchi, K., Yokota, S., Youle, R.J., and Mihara, K. (2010). Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. *J Cell Biol* 191, 1141-1158.
- Otsuga, D., Keegan, B.R., Brisch, E., Thatcher, J.W., Hermann, G.J., Bleazard, W., and Shaw, J.M. (1998). The dynamin-related GTPase, Dnm1p, controls mitochondrial morphology in yeast. *J Cell Biol* 143, 333-349.
- Paling, N.R., Wheadon, H., Bone, H.K., and Welham, M.J. (2004). Regulation of embryonic stem cell self-renewal by phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling. *J Biol Chem* 279, 48063-48070.
- Palmer, C.S., Elgass, K.D., Parton, R.G., Osellame, L.D., Stojanovski, D., and Ryan, M.T. (2013). Adaptor proteins MiD49 and MiD51 can act independently of Mff and Fis1 in Drp1 recruitment and are specific for mitochondrial fission. *J Biol Chem* 288, 27584-27593.
- Palmer, C.S., Osellame, L.D., Laine, D., Koutsopoulos, O.S., Frazier, A.E., and Ryan, M.T. (2011). MiD49 and MiD51, new components of the mitochondrial fission machinery. *EMBO Rep* 12, 565-573.
- Pan, H., Cai, N., Li, M., Liu, G.H., and Izpisua Belmonte, J.C. (2013). Autophagic control of cell 'stemness'. *EMBO Mol Med* 5, 327-331.
- Panopoulos, A.D., Yanes, O., Ruiz, S., Kida, Y.S., Diep, D., Tautenhahn, R., Herrerias, A., Batchelder, E.M., Plongthongkum, N., Lutz, M., *et al.* (2012). The metabolome

- of induced pluripotent stem cells reveals metabolic changes occurring in somatic cell reprogramming. *Cell Res* 22, 168-177.
- Park, I.H., Lerou, P.H., Zhao, R., Huo, H., and Daley, G.Q. (2008). Generation of human-induced pluripotent stem cells. *Nat Protoc* 3, 1180-1186.
- Pattabiraman, D.R., Bierie, B., Kober, K.I., Thiru, P., Krall, J.A., Zill, C., Reinhardt, F., Tam, W.L., and Weinberg, R.A. (2016). Activation of PKA leads to mesenchymal-to-epithelial transition and loss of tumor-initiating ability. *Science* 351, aad3680.
- Perna, D., Faga, G., Verrecchia, A., Gorski, M.M., Barozzi, I., Narang, V., Khng, J., Lim, K.C., Sung, W.K., Sanges, R., *et al.* (2012). Genome-wide mapping of Myc binding and gene regulation in serum-stimulated fibroblasts. *Oncogene* 31, 1695-1709.
- Phoenix, K.N., Devarakonda, C.V., Fox, M.M., Stevens, L.E., and Claffey, K.P. (2012). AMPK α 2 Suppresses Murine Embryonic Fibroblast Transformation and Tumorigenesis. *Genes Cancer* 3, 51-62.
- Pineda, C.T., Ramanathan, S., Fon Tacer, K., Weon, J.L., Potts, M.B., Ou, Y.H., White, M.A., and Potts, P.R. (2015). Degradation of AMPK by a cancer-specific ubiquitin ligase. *Cell* 160, 715-728.
- Pla-Martin, D., Rueda, C.B., Estela, A., Sanchez-Piris, M., Gonzalez-Sanchez, P., Traba, J., de la Fuente, S., Scorrano, L., Renau-Piqueras, J., Alvarez, J., *et al.* (2013). Silencing of the Charcot-Marie-Tooth disease-associated gene GDAP1 induces abnormal mitochondrial distribution and affects Ca²⁺ homeostasis by reducing store-operated Ca²⁺ entry. *Neurobiol Dis* 55, 140-151.
- Polo, J.M., Anderssen, E., Walsh, R.M., Schwarz, B.A., Nefzger, C.M., Lim, S.M., Borkent, M., Apostolou, E., Alaei, S., Cloutier, J., *et al.* (2012). A molecular roadmap of reprogramming somatic cells into iPS cells. *Cell* 151, 1617-1632.
- Polo, J.M., Liu, S., Figueroa, M.E., Kulalart, W., Eminli, S., Tan, K.Y., Apostolou, E., Stadtfeld, M., Li, Y., Shioda, T., *et al.* (2010). Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 28, 848-855.
- Poole, A.C., Thomas, R.E., Yu, S., Vincow, E.S., and Pallanck, L. (2010). The mitochondrial fusion-promoting factor mitofusin is a substrate of the PINK1/parkin pathway. *PLoS One* 5, e10054.
- Potten, C.S., and Loeffler, M. (1990). Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* 110, 1001-1020.
- Praefcke, G.J., and McMahon, H.T. (2004). The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 133-147.
- Prigione, A., and Adjaye, J. (2010). Modulation of mitochondrial biogenesis and bioenergetic metabolism upon in vitro and in vivo differentiation of human ES and iPS cells. *Int J Dev Biol* 54, 1729-1741.
- Prigione, A., Fauler, B., Lurz, R., Lehrach, H., and Adjaye, J. (2010). The senescence-related mitochondrial/oxidative stress pathway is repressed in human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 28, 721-733.
- Prigione, A., Lichtner, B., Kuhl, H., Struys, E.A., Wamelink, M., Lehrach, H., Ralser, M., Timmermann, B., and Adjaye, J. (2011). Human induced pluripotent stem cells

harbor homoplasmic and heteroplasmic mitochondrial DNA mutations while maintaining human embryonic stem cell-like metabolic reprogramming. *Stem Cells* 29, 1338-1348.

- Prigione, A., Rohwer, N., Hoffmann, S., Mlody, B., Drews, K., Bukowiecki, R., Blumlein, K., Wanker, E.E., Ralser, M., Cramer, T., *et al.* (2014). HIF1 α modulates cell fate reprogramming through early glycolytic shift and upregulation of PDK1-3 and PKM2. *Stem Cells* 32, 364-376.
- Pullman, M.E., and Monroy, G.C. (1963). A Naturally Occurring Inhibitor of Mitochondrial Adenosine Triphosphatase. *J Biol Chem* 238, 3762-3769.
- Pyakurel, A., Savoia, C., Hess, D., and Scorrano, L. (2015). Extracellular regulated kinase phosphorylates mitofusin 1 to control mitochondrial morphology and apoptosis. *Mol Cell* 58, 244-254.
- Qi, X., Disatnik, M.H., Shen, N., Sobel, R.A., and Mochly-Rosen, D. (2011). Aberrant mitochondrial fission in neurons induced by protein kinase C $\{\delta\}$ under oxidative stress conditions in vivo. *Mol Biol Cell* 22, 256-265.
- Qian, W., Choi, S., Gibson, G.A., Watkins, S.C., Bakkenist, C.J., and Van Houten, B. (2012). Mitochondrial hyperfusion induced by loss of the fission protein Drp1 causes ATM-dependent G2/M arrest and aneuploidy through DNA replication stress. *J Cell Sci* 125, 5745-5757.
- Rambold, A.S., Kostecky, B., Elia, N., and Lippincott-Schwartz, J. (2011). Tubular network formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrient starvation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 10190-10195.
- Rehman, J., Zhang, H.J., Toth, P.T., Zhang, Y., Marsboom, G., Hong, Z., Salgia, R., Husain, A.N., Wietholt, C., and Archer, S.L. (2012). Inhibition of mitochondrial fission prevents cell cycle progression in lung cancer. *FASEB J* 26, 2175-2186.
- Resnick, J.L., Bixler, L.S., Cheng, L., and Donovan, P.J. (1992). Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature* 359, 550-551.
- Rizzuto, R., Brini, M., De Giorgi, F., Rossi, R., Heim, R., Tsien, R.Y., and Pozzan, T. (1996). Double labelling of subcellular structures with organelle-targeted GFP mutants in vivo. *Curr Biol* 6, 183-188.
- Robertson, E., Bradley, A., Kuehn, M., and Evans, M. (1986). Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector. *Nature* 323, 445-448.
- Rodriguez-Enriquez, S., He, L., and Lemasters, J.J. (2004). Role of mitochondrial permeability transition pores in mitochondrial autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 2463-2472.
- Roskoski, R., Jr. (2012). ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res* 66, 105-143.
- Rowland, B.D., Bernards, R., and Peeper, D.S. (2005). The KLF4 tumour suppressor is a transcriptional repressor of p53 that acts as a context-dependent oncogene. *Nat Cell Biol* 7, 1074-1082.
- Ruiz, S., Panopoulos, A.D., Herrerias, A., Bissig, K.D., Lutz, M., Berggren, W.T., Verma, I.M., and Izpisua Belmonte, J.C. (2011). A high proliferation rate is required for

- cell reprogramming and maintenance of human embryonic stem cell identity. *Curr Biol* 21, 45-52.
- Ryall, J.G., Cliff, T., Dalton, S., and Sartorelli, V. (2015). Metabolic Reprogramming of Stem Cell Epigenetics. *Cell Stem Cell* 17, 651-662.
- Sagan, L. (1967). On the origin of mitosing cells. *J Theor Biol* 14, 255-274.
- Samavarchi-Tehrani, P., Golipour, A., David, L., Sung, H.K., Beyer, T.A., Datti, A., Woltjen, K., Nagy, A., and Wrana, J.L. (2010). Functional genomics reveals a BMP-driven mesenchymal-to-epithelial transition in the initiation of somatic cell reprogramming. *Cell Stem Cell* 7, 64-77.
- Sanchez-Arago, M., Formentini, L., Garcia-Bermudez, J., and Cuezva, J.M. (2012). IF1 reprograms energy metabolism and signals the oncogenic phenotype in cancer. *Cell Cycle* 11, 2963-2964.
- Sanchez-Arago, M., Formentini, L., Martinez-Reyes, I., Garcia-Bermudez, J., Santacatterina, F., Sanchez-Cenizo, L., Willers, I.M., Aldea, M., Najera, L., Juarranz, A., *et al.* (2013). Expression, regulation and clinical relevance of the ATPase inhibitory factor 1 in human cancers. *Oncogenesis* 2, e46.
- Sanchez-Cenizo, L., Formentini, L., Aldea, M., Ortega, A.D., Garcia-Huerta, P., Sanchez-Arago, M., and Cuezva, J.M. (2010). Up-regulation of the ATPase inhibitory factor 1 (IF1) of the mitochondrial H⁺-ATP synthase in human tumors mediates the metabolic shift of cancer cells to a Warburg phenotype. *J Biol Chem* 285, 25308-25313.
- Sancho, M., Di-Gregorio, A., George, N., Pozzi, S., Sanchez, J.M., Pernaute, B., and Rodriguez, T.A. (2013). Competitive interactions eliminate unfit embryonic stem cells at the onset of differentiation. *Dev Cell* 26, 19-30.
- Santacatterina, F., Sanchez-Cenizo, L., Formentini, L., Mobasher, M.A., Casas, E., Rueda, C.B., Martinez-Reyes, I., Nunez de Arenas, C., Garcia-Bermudez, J., Zapata, J.M., *et al.* (2016). Down-regulation of oxidative phosphorylation in the liver by expression of the ATPase inhibitory factor 1 induces a tumor-promoter metabolic state. *Oncotarget* 7, 490-508.
- Santamaria, G., Martinez-Diez, M., Fabregat, I., and Cuezva, J.M. (2006). Efficient execution of cell death in non-glycolytic cells requires the generation of ROS controlled by the activity of mitochondrial H⁺-ATP synthase. *Carcinogenesis* 27, 925-935.
- Sato, A., Sunayama, J., Okada, M., Watanabe, E., Seino, S., Shibuya, K., Suzuki, K., Narita, Y., Shibui, S., Kayama, T., *et al.* (2012). Glioma-initiating cell elimination by metformin activation of FOXO3 via AMPK. *Stem Cells Transl Med* 1, 811-824.
- Sato, N., Meijer, L., Skaltsounis, L., Greengard, P., and Brivanlou, A.H. (2004). Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat Med* 10, 55-63.
- Schieke, S.M., Ma, M., Cao, L., McCoy, J.P., Jr., Liu, C., Hensel, N.F., Barrett, A.J., Boehm, M., and Finkel, T. (2008). Mitochondrial metabolism modulates differentiation and teratoma formation capacity in mouse embryonic stem cells. *J Biol Chem* 283, 28506-28512.

- Schlosser, I., Holzel, M., Hoffmann, R., Burtscher, H., Kohlhuber, F., Schuhmacher, M., Chapman, R., Weidle, U.H., and Eick, D. (2005). Dissection of transcriptional programmes in response to serum and c-Myc in a human B-cell line. *Oncogene* 24, 520-524.
- Scholer, H.R., Dressler, G.R., Balling, R., Rohdewohld, H., and Gruss, P. (1990). Oct-4: a germline-specific transcription factor mapping to the mouse t-complex. *EMBO J* 9, 2185-2195.
- Schrode, N., Saiz, N., Di Talia, S., and Hadjantonakis, A.K. (2014). GATA6 levels modulate primitive endoderm cell fate choice and timing in the mouse blastocyst. *Dev Cell* 29, 454-467.
- Schuhmacher, M., and Eick, D. (2013). Dose-dependent regulation of target gene expression and cell proliferation by c-Myc levels. *Transcription* 4, 192-197.
- Schuhmacher, M., Staeger, M.S., Pajic, A., Polack, A., Weidle, U.H., Bornkamm, G.W., Eick, D., and Kohlhuber, F. (1999). Control of cell growth by c-Myc in the absence of cell division. *Curr Biol* 9, 1255-1258.
- Scognamiglio, R., Cabezas-Wallscheid, N., Thier, M.C., Altamura, S., Reyes, A., Prendergast, A.M., Baumgartner, D., Carnevalli, L.S., Atzberger, A., Haas, S., *et al.* (2016). Myc Depletion Induces a Pluripotent Dormant State Mimicking Diapause. *Cell* 164, 668-680.
- Semenza, G.L. (2012). Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci* 33, 207-214.
- Seo, H.R., Kim, J., Bae, S., Soh, J.W., and Lee, Y.S. (2008). Cdk5-mediated phosphorylation of c-Myc on Ser-62 is essential in transcriptional activation of cyclin B1 by cyclin G1. *J Biol Chem* 283, 15601-15610.
- Seoane, J., Le, H.V., and Massague, J. (2002). Myc suppression of the p21(Cip1) Cdk inhibitor influences the outcome of the p53 response to DNA damage. *Nature* 419, 729-734.
- Serasinghe, M.N., Wieder, S.Y., Renault, T.T., Elkholi, R., Ascioffa, J.J., Yao, J.L., Jabado, O., Hoehn, K., Kageyama, Y., Sesaki, H., *et al.* (2015). Mitochondrial division is requisite to RAS-induced transformation and targeted by oncogenic MAPK pathway inhibitors. *Mol Cell* 57, 521-536.
- Shyh-Chang, N., Daley, G.Q., and Cantley, L.C. (2013). Stem cell metabolism in tissue development and aging. *Development* 140, 2535-2547.
- Silva, J., Barrandon, O., Nichols, J., Kawaguchi, J., Theunissen, T.W., and Smith, A. (2008). Promotion of reprogramming to ground state pluripotency by signal inhibition. *PLoS Biol* 6, e253.
- Silva, J., Nichols, J., Theunissen, T.W., Guo, G., van Oosten, A.L., Barrandon, O., Wray, J., Yamanaka, S., Chambers, I., and Smith, A. (2009). Nanog is the gateway to the pluripotent ground state. *Cell* 138, 722-737.
- Silva, J., and Smith, A. (2008). Capturing pluripotency. *Cell* 132, 532-536.
- Smirnova, E., Griparic, L., Shurland, D.L., and van der Bliek, A.M. (2001). Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 12, 2245-2256.

- Smirnova, E., Shurland, D.L., Ryazantsev, S.N., and van der Blik, A.M. (1998). A human dynamin-related protein controls the distribution of mitochondria. *J Cell Biol* 143, 351-358.
- Smith, A.G., Heath, J.K., Donaldson, D.D., Wong, G.G., Moreau, J., Stahl, M., and Rogers, D. (1988). Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 336, 688-690.
- Smith, A.G., and Hooper, M.L. (1987). Buffalo rat liver cells produce a diffusible activity which inhibits the differentiation of murine embryonal carcinoma and embryonic stem cells. *Dev Biol* 121, 1-9.
- Son, M.J., Jeong, B.R., Kwon, Y., and Cho, Y.S. (2013a). Interference with the mitochondrial bioenergetics fuels reprogramming to pluripotency via facilitation of the glycolytic transition. *Int J Biochem Cell Biol* 45, 2512-2518.
- Son, M.J., Kwon, Y., Son, M.Y., Seol, B., Choi, H.S., Ryu, S.W., Choi, C., and Cho, Y.S. (2015). Mitofusins deficiency elicits mitochondrial metabolic reprogramming to pluripotency. *Cell Death Differ* 22, 1957-1969.
- Son, M.Y., Choi, H., Han, Y.M., and Cho, Y.S. (2013b). Unveiling the critical role of REX1 in the regulation of human stem cell pluripotency. *Stem Cells* 31, 2374-2387.
- Soufi, A., Donahue, G., and Zaret, K.S. (2012). Facilitators and impediments of the pluripotency reprogramming factors' initial engagement with the genome. *Cell* 151, 994-1004.
- Spagnoli, F.M., and Hemmati-Brivanlou, A. (2006). Guiding embryonic stem cells towards differentiation: lessons from molecular embryology. *Curr Opin Genet Dev* 16, 469-475.
- Spikings, E.C., Alderson, J., and St John, J.C. (2007). Regulated mitochondrial DNA replication during oocyte maturation is essential for successful porcine embryonic development. *Biol Reprod* 76, 327-335.
- Sridharan, R., Tchieu, J., Mason, M.J., Yachechko, R., Kuoy, E., Horvath, S., Zhou, Q., and Plath, K. (2009). Role of the murine reprogramming factors in the induction of pluripotency. *Cell* 136, 364-377.
- St John, J.C., Ramalho-Santos, J., Gray, H.L., Petrosko, P., Rawe, V.Y., Navara, C.S., Simerly, C.R., and Schatten, G.P. (2005). The expression of mitochondrial DNA transcription factors during early cardiomyocyte in vitro differentiation from human embryonic stem cells. *Cloning Stem Cells* 7, 141-153.
- Stadtfeld, M., Brennand, K., and Hochedlinger, K. (2008a). Reprogramming of pancreatic beta cells into induced pluripotent stem cells. *Curr Biol* 18, 890-894.
- Stadtfeld, M., and Hochedlinger, K. (2010). Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. *Genes Dev* 24, 2239-2263.
- Stadtfeld, M., Maherli, N., Breault, D.T., and Hochedlinger, K. (2008b). Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse. *Cell Stem Cell* 2, 230-240.
- Stadtfeld, M., Nagaya, M., Utikal, J., Weir, G., and Hochedlinger, K. (2008c). Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* 322, 945-949.

- Stehling, O., Wilbrecht, C., and Lill, R. (2014). Mitochondrial iron-sulfur protein biogenesis and human disease. *Biochimie* 100, 61-77.
- Stevens, L.C. (1968). The development of teratomas from intratesticular grafts of tubal mouse eggs. *J Embryol Exp Morphol* 20, 329-341.
- Stevens, L.C., and Little, C.C. (1954). Spontaneous Testicular Teratomas in an Inbred Strain of Mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 40, 1080-1087.
- Subramanyam, D., Lamouille, S., Judson, R.L., Liu, J.Y., Bucay, N., Derynck, R., and Belloch, R. (2011). Multiple targets of miR-302 and miR-372 promote reprogramming of human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 29, 443-448.
- Suhr, S.T., Chang, E.A., Tjong, J., Alcasid, N., Perkins, G.A., Goissis, M.D., Ellisman, M.H., Perez, G.I., and Cibelli, J.B. (2010). Mitochondrial rejuvenation after induced pluripotency. *PLoS One* 5, e14095.
- Swinnen, J.V., Beckers, A., Brusselmans, K., Organe, S., Segers, J., Timmermans, L., Vanderhoydonc, F., Deboel, L., Derua, R., Waelkens, E., *et al.* (2005). Mimicry of a cellular low energy status blocks tumor cell anabolism and suppresses the malignant phenotype. *Cancer Res* 65, 2441-2448.
- Tada, M., Takahama, Y., Abe, K., Nakatsuji, N., and Tada, T. (2001). Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Curr Biol* 11, 1553-1558.
- Taguchi, N., Ishihara, N., Jofuku, A., Oka, T., and Mihara, K. (2007). Mitotic phosphorylation of dynamin-related GTPase Drp1 participates in mitochondrial fission. *J Biol Chem* 282, 11521-11529.
- Tait, S.W., and Green, D.R. (2010). Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 621-632.
- Takagi, N., Yoshida, M.A., Sugawara, O., and Sasaki, M. (1983). Reversal of X-inactivation in female mouse somatic cells hybridized with murine teratocarcinoma stem cells in vitro. *Cell* 34, 1053-1062.
- Takahashi, K., Okita, K., Nakagawa, M., and Yamanaka, S. (2007a). Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nat Protoc* 2, 3081-3089.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007b). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861-872.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Sasaki, A., Yamamoto, M., Nakamura, M., Sutou, K., Osafune, K., and Yamanaka, S. (2014). Induction of pluripotency in human somatic cells via a transient state resembling primitive streak-like mesendoderm. *Nat Commun* 5, 3678.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2016). A decade of transcription factor-mediated reprogramming to pluripotency. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17, 183-193.

- Tanaka, A., Cleland, M.M., Xu, S., Narendra, D.P., Suen, D.F., Karbowski, M., and Youle, R.J. (2010). Proteasome and p97 mediate mitophagy and degradation of mitofusins induced by Parkin. *J Cell Biol* *191*, 1367-1380.
- Tee, W.W., Shen, S.S., Oksuz, O., Narendra, V., and Reinberg, D. (2014). Erk1/2 activity promotes chromatin features and RNAPII phosphorylation at developmental promoters in mouse ESCs. *Cell* *156*, 678-690.
- Tesar, P.J., Chenoweth, J.G., Brook, F.A., Davies, T.J., Evans, E.P., Mack, D.L., Gardner, R.L., and McKay, R.D. (2007). New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* *448*, 196-199.
- Teslaa, T., and Teitell, M.A. (2015). Pluripotent stem cell energy metabolism: an update. *EMBO J* *34*, 138-153.
- Theunissen, T.W., van Oosten, A.L., Castelo-Branco, G., Hall, J., Smith, A., and Silva, J.C. (2011). Nanog overcomes reprogramming barriers and induces pluripotency in minimal conditions. *Curr Biol* *21*, 65-71.
- Thompson, S., Clarke, A.R., Pow, A.M., Hooper, M.L., and Melton, D.W. (1989). Germ line transmission and expression of a corrected HPRT gene produced by gene targeting in embryonic stem cells. *Cell* *56*, 313-321.
- Thomson, M., Liu, S.J., Zou, L.N., Smith, Z., Meissner, A., and Ramanathan, S. (2011). Pluripotency factors in embryonic stem cells regulate differentiation into germ layers. *Cell* *145*, 875-889.
- Tieu, Q., and Nunnari, J. (2000). Mdv1p is a WD repeat protein that interacts with the dynamin-related GTPase, Dnm1p, to trigger mitochondrial division. *J Cell Biol* *151*, 353-366.
- Todd, L.R., Damin, M.N., Gomathinayagam, R., Horn, S.R., Means, A.R., and Sankar, U. (2010). Growth factor erv1-like modulates Drp1 to preserve mitochondrial dynamics and function in mouse embryonic stem cells. *Mol Biol Cell* *21*, 1225-1236.
- Tohyama, S., Fujita, J., Hishiki, T., Matsuura, T., Hattori, F., Ohno, R., Kanazawa, H., Seki, T., Nakajima, K., Kishino, Y., *et al.* (2016). Glutamine Oxidation Is Indispensable for Survival of Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Metab* *23*, 663-674.
- Tormos, K.V., Anso, E., Hamanaka, R.B., Eisenbart, J., Joseph, J., Kalyanaraman, B., and Chandel, N.S. (2011). Mitochondrial complex III ROS regulate adipocyte differentiation. *Cell Metab* *14*, 537-544.
- Torres, J., Prieto, J., Durupt, F.C., Broad, S., and Watt, F.M. (2012). Efficient differentiation of embryonic stem cells into mesodermal precursors by BMP, retinoic acid and Notch signalling. *PLoS One* *7*, e36405.
- Torres, J., and Watt, F.M. (2008). Nanog maintains pluripotency of mouse embryonic stem cells by inhibiting NFkappaB and cooperating with Stat3. *Nat Cell Biol* *10*, 194-201.
- Toyama, E.Q., Herzig, S., Courchet, J., Lewis, T.L., Jr., Loson, O.C., Hellberg, K., Young, N.P., Chen, H., Polleux, F., Chan, D.C., *et al.* (2016). Metabolism. AMP-activated protein kinase mediates mitochondrial fission in response to energy stress. *Science* *351*, 275-281.

- Tsouko, E., Khan, A.S., White, M.A., Han, J.J., Shi, Y., Merchant, F.A., Sharpe, M.A., Xin, L., and Frigo, D.E. (2014). Regulation of the pentose phosphate pathway by an androgen receptor-mTOR-mediated mechanism and its role in prostate cancer cell growth. *Oncogenesis* 3, e103.
- Twig, G., Elorza, A., Molina, A.J., Mohamed, H., Wikstrom, J.D., Walzer, G., Stiles, L., Haigh, S.E., Katz, S., Las, G., *et al.* (2008). Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J* 27, 433-446.
- Twig, G., and Shirihai, O.S. (2011). The interplay between mitochondrial dynamics and mitophagy. *Antioxid Redox Signal* 14, 1939-1951.
- Utikal, J., Maherali, N., Kulalert, W., and Hochedlinger, K. (2009a). Sox2 is dispensable for the reprogramming of melanocytes and melanoma cells into induced pluripotent stem cells. *J Cell Sci* 122, 3502-3510.
- Utikal, J., Polo, J.M., Stadtfeld, M., Maherali, N., Kulalert, W., Walsh, R.M., Khalil, A., Rheinwald, J.G., and Hochedlinger, K. (2009b). Immortalization eliminates a roadblock during cellular reprogramming into iPS cells. *Nature* 460, 1145-1148.
- Van Blerkom, J. (2009). Mitochondria in early mammalian development. *Semin Cell Dev Biol* 20, 354-364.
- Van Blerkom, J., Davis, P., and Alexander, S. (2000). Differential mitochondrial distribution in human pronuclear embryos leads to disproportionate inheritance between blastomeres: relationship to microtubular organization, ATP content and competence. *Hum Reprod* 15, 2621-2633.
- van der Blik, A.M., and Payne, G.S. (2010). Dynamin subunit interactions revealed. *Dev Cell* 18, 687-688.
- van der Blik, A.M., Shen, Q., and Kawajiri, S. (2013). Mechanisms of mitochondrial fission and fusion. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5.
- Varum, S., Momcilovic, O., Castro, C., Ben-Yehudah, A., Ramalho-Santos, J., and Navara, C.S. (2009). Enhancement of human embryonic stem cell pluripotency through inhibition of the mitochondrial respiratory chain. *Stem Cell Res* 3, 142-156.
- Varum, S., Rodrigues, A.S., Moura, M.B., Momcilovic, O., Easley, C.A.t., Ramalho-Santos, J., Van Houten, B., and Schatten, G. (2011). Energy metabolism in human pluripotent stem cells and their differentiated counterparts. *PLoS One* 6, e20914.
- Vazquez-Martin, A., Corominas-Faja, B., Cufi, S., Vellon, L., Oliveras-Ferraros, C., Menendez, O.J., Joven, J., Lupu, R., and Menendez, J.A. (2013). The mitochondrial H(+)-ATP synthase and the lipogenic switch: new core components of metabolic reprogramming in induced pluripotent stem (iPS) cells. *Cell Cycle* 12, 207-218.
- Vazquez-Martin, A., Cufi, S., Corominas-Faja, B., Oliveras-Ferraros, C., Vellon, L., and Menendez, J.A. (2012a). Mitochondrial fusion by pharmacological manipulation impedes somatic cell reprogramming to pluripotency: new insight into the role of mitophagy in cell stemness. *Aging (Albany NY)* 4, 393-401.
- Vazquez-Martin, A., Vellon, L., Quiros, P.M., Cufi, S., Ruiz de Galarreta, E., Oliveras-Ferraros, C., Martin, A.G., Martin-Castillo, B., Lopez-Otin, C., and Menendez, J.A.

- (2012b). Activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) provides a metabolic barrier to reprogramming somatic cells into stem cells. *Cell Cycle* *11*, 974-989.
- Vessoni, A.T., Muotri, A.R., and Okamoto, O.K. (2012). Autophagy in stem cell maintenance and differentiation. *Stem Cells Dev* *21*, 513-520.
- Viswanathan, S.R., and Daley, G.Q. (2010). Lin28: A microRNA regulator with a macro role. *Cell* *140*, 445-449.
- Voza, A., Parisi, G., De Leonardi, F., Lasorsa, F.M., Castegna, A., Amorese, D., Marmo, R., Calcagnile, V.M., Palmieri, L., Ricquier, D., *et al.* (2014). UCP2 transports C4 metabolites out of mitochondria, regulating glucose and glutamine oxidation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *111*, 960-965.
- Waddington, C.H. (1957). *The strategy of the genes; a discussion of some aspects of theoretical biology* (London: Allen & Unwin).
- Wakabayashi, J., Zhang, Z., Wakabayashi, N., Tamura, Y., Fukaya, M., Kensler, T.W., Iijima, M., and Sesaki, H. (2009). The dynamin-related GTPase Drp1 is required for embryonic and brain development in mice. *J Cell Biol* *186*, 805-816.
- Wakayama, T., Perry, A.C., Zuccotti, M., Johnson, K.R., and Yanagimachi, R. (1998). Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* *394*, 369-374.
- Wakayama, T., Tabar, V., Rodriguez, I., Perry, A.C., Studer, L., and Mombaerts, P. (2001). Differentiation of embryonic stem cell lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer. *Science* *292*, 740-743.
- Walther, T.C., and Farese, R.V., Jr. (2012). Lipid droplets and cellular lipid metabolism. *Annu Rev Biochem* *81*, 687-714.
- Wang, H., Song, P., Du, L., Tian, W., Yue, W., Liu, M., Li, D., Wang, B., Zhu, Y., Cao, C., *et al.* (2011a). Parkin ubiquitinates Drp1 for proteasome-dependent degradation: implication of dysregulated mitochondrial dynamics in Parkinson disease. *J Biol Chem* *286*, 11649-11658.
- Wang, J., Rao, S., Chu, J., Shen, X., Levasseur, D.N., Theunissen, T.W., and Orkin, S.H. (2006). A protein interaction network for pluripotency of embryonic stem cells. *Nature* *444*, 364-368.
- Wang, L., Ye, X., Zhao, Q., Zhou, Z., Dan, J., Zhu, Y., Chen, Q., and Liu, L. (2014). Drp1 is dispensable for mitochondria biogenesis in induction to pluripotency but required for differentiation of embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* *23*, 2422-2434.
- Wang, S., Xia, P., Ye, B., Huang, G., Liu, J., and 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*, 617-625.
- Wang, T., Chen, K., Zeng, X., Yang, J., Wu, Y., Shi, X., Qin, B., Zeng, L., Esteban, M.A., Pan, G., *et al.* (2011b). The histone demethylases Jhdm1a/1b enhance somatic cell reprogramming in a vitamin-C-dependent manner. *Cell Stem Cell* *9*, 575-587.
- Wang, W., Wang, Y., Long, J., Wang, J., Haudek, S.B., Overbeek, P., Chang, B.H., Schumacker, P.T., and Danesh, F.R. (2012). Mitochondrial fission triggered by hyperglycemia is mediated by ROCK1 activation in podocytes and endothelial cells. *Cell Metab* *15*, 186-200.

- Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science* 123, 309-314.
- Wasiak, S., Zunino, R., and McBride, H.M. (2007). Bax/Bak promote sumoylation of DRP1 and its stable association with mitochondria during apoptotic cell death. *J Cell Biol* 177, 439-450.
- Weismann, A. (1893). *The germ-plasm; a theory of heredity* (New York,: Scribner's).
- Wernig, M., Lengner, C.J., Hanna, J., Lodato, M.A., Steine, E., Foreman, R., Staerk, J., Markoulaki, S., and Jaenisch, R. (2008a). A drug-inducible transgenic system for direct reprogramming of multiple somatic cell types. *Nat Biotechnol* 26, 916-924.
- Wernig, M., Meissner, A., Cassady, J.P., and Jaenisch, R. (2008b). c-Myc is dispensable for direct reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell* 2, 10-12.
- Wernig, M., Meissner, A., Foreman, R., Brambrink, T., Ku, M., Hochedlinger, K., Bernstein, B.E., and Jaenisch, R. (2007). In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 448, 318-324.
- Wickstrom, E.L., Bacon, T.A., Gonzalez, A., Freeman, D.L., Lyman, G.H., and Wickstrom, E. (1988). Human promyelocytic leukemia HL-60 cell proliferation and c-myc protein expression are inhibited by an antisense pentadecadeoxynucleotide targeted against c-myc mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 1028-1032.
- Wikstrom, J.D., Israeli, T., Bachar-Wikstrom, E., Swisa, A., Ariav, Y., Weiss, M., Kaganovich, D., Dor, Y., Cerasi, E., and Leibowitz, G. (2013). AMPK regulates ER morphology and function in stressed pancreatic beta-cells via phosphorylation of DRP1. *Mol Endocrinol* 27, 1706-1723.
- Wiles, M.V., and Johansson, B.M. (1999). Embryonic stem cell development in a chemically defined medium. *Exp Cell Res* 247, 241-248.
- Williams, R.L., Hilton, D.J., Pease, S., Willson, T.A., Stewart, C.L., Gearing, D.P., Wagner, E.F., Metcalf, D., Nicola, N.A., and Gough, N.M. (1988). Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 336, 684-687.
- Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J., and Campbell, K.H. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385, 810-813.
- Wise, D.R., DeBerardinis, R.J., Mancuso, A., Sayed, N., Zhang, X.Y., Pfeiffer, H.K., Nissim, I., Daikhin, E., Yudkoff, M., McMahon, S.B., *et al.* (2008). Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 18782-18787.
- Woltjen, K., Michael, I.P., Mohseni, P., Desai, R., Mileikovsky, M., Hamalainen, R., Cowling, R., Wang, W., Liu, P., Gertsenstein, M., *et al.* (2009). piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* 458, 766-770.
- Worringer, K.A., Rand, T.A., Hayashi, Y., Sami, S., Takahashi, K., Tanabe, K., Narita, M., Srivastava, D., and Yamanaka, S. (2014). The let-7/LIN-41 pathway regulates reprogramming to human induced pluripotent stem cells by controlling expression of prodifferentiation genes. *Cell Stem Cell* 14, 40-52.

- Wray, J., Kalkan, T., Gomez-Lopez, S., Eckardt, D., Cook, A., Kemler, R., and Smith, A. (2011). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 alleviates Tcf3 repression of the pluripotency network and increases embryonic stem cell resistance to differentiation. *Nat Cell Biol* *13*, 838-845.
- Wu, J., Ocampo, A., and Izpisua Belmonte, J.C. (2016). Cellular Metabolism and Induced Pluripotency. *Cell* *166*, 1371-1385.
- Wu, Y., Li, Y., Zhang, H., Huang, Y., Zhao, P., Tang, Y., Qiu, X., Ying, Y., Li, W., Ni, S., *et al.* (2015). Autophagy and mTORC1 regulate the stochastic phase of somatic cell reprogramming. *Nat Cell Biol* *17*, 715-725.
- Xie, H., Ye, M., Feng, R., and Graf, T. (2004). Stepwise reprogramming of B cells into macrophages. *Cell* *117*, 663-676.
- Xie, Q., Wu, Q., Horbinski, C.M., Flavahan, W.A., Yang, K., Zhou, W., Dombrowski, S.M., Huang, Z., Fang, X., Shi, Y., *et al.* (2015). Mitochondrial control by DRP1 in brain tumor initiating cells. *Nat Neurosci* *18*, 501-510.
- Xu, Y., Wei, X., Wang, M., Zhang, R., Fu, Y., Xing, M., Hua, Q., and Xie, X. (2013). Proliferation rate of somatic cells affects reprogramming efficiency. *J Biol Chem* *288*, 9767-9778.
- Yamanaka, S. (2007). Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* *1*, 39-49.
- Yamanaka, S. (2009). Elite and stochastic models for induced pluripotent stem cell generation. *Nature* *460*, 49-52.
- Yang, S.H., Kalkan, T., Morrisroe, C., Smith, A., and Sharrocks, A.D. (2012). A genome-wide RNAi screen reveals MAP kinase phosphatases as key ERK pathway regulators during embryonic stem cell differentiation. *PLoS Genet* *8*, e1003112.
- Ye, X.Q., Li, Q., Wang, G.H., Sun, F.F., Huang, G.J., Bian, X.W., Yu, S.C., and Qian, G.S. (2011). Mitochondrial and energy metabolism-related properties as novel indicators of lung cancer stem cells. *Int J Cancer* *129*, 820-831.
- Yin, X.Y., Grove, L., Datta, N.S., Katula, K., Long, M.W., and Prochownik, E.V. (2001). Inverse regulation of cyclin B1 by c-Myc and p53 and induction of tetraploidy by cyclin B1 overexpression. *Cancer Res* *61*, 6487-6493.
- Ying, Q.L., Nichols, J., Chambers, I., and Smith, A. (2003a). BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell* *115*, 281-292.
- Ying, Q.L., Nichols, J., Evans, E.P., and Smith, A.G. (2002). Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* *416*, 545-548.
- Ying, Q.L., Stavridis, M., Griffiths, D., Li, M., and Smith, A. (2003b). Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. *Nat Biotechnol* *21*, 183-186.
- Ying, Q.L., Wray, J., Nichols, J., Batlle-Morera, L., Doble, B., Woodgett, J., Cohen, P., and Smith, A. (2008). The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* *453*, 519-523.

- Yokota, M., Hatakeyama, H., Okabe, S., Ono, Y., and Goto, Y. (2015). Mitochondrial respiratory dysfunction caused by a heteroplasmic mitochondrial DNA mutation blocks cellular reprogramming. *Hum Mol Genet* 24, 4698-4709.
- Yonashiro, R., Ishido, S., Kyo, S., Fukuda, T., Goto, E., Matsuki, Y., Ohmura-Hoshino, M., Sada, K., Hotta, H., Yamamura, H., *et al.* (2006). A novel mitochondrial ubiquitin ligase plays a critical role in mitochondrial dynamics. *EMBO J* 25, 3618-3626.
- Yoon, Y., Krueger, E.W., Oswald, B.J., and McNiven, M.A. (2003). The mitochondrial protein hFis1 regulates mitochondrial fission in mammalian cells through an interaction with the dynamin-like protein DLP1. *Mol Cell Biol* 23, 5409-5420.
- Yoshida, Y., Takahashi, K., Okita, K., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2009). Hypoxia enhances the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 5, 237-241.
- Young, R.A. (2011). Control of the embryonic stem cell state. *Cell* 144, 940-954.
- Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., *et al.* (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318, 1917-1920.
- Yuneva, M., Zamboni, N., Oefner, P., Sachidanandam, R., and Lazebnik, Y. (2007). Deficiency in glutamine but not glucose induces MYC-dependent apoptosis in human cells. *J Cell Biol* 178, 93-105.
- Zhang, J., Khvorostov, I., Hong, J.S., Oktay, Y., Vergnes, L., Nuebel, E., Wahjudi, P.N., Setoguchi, K., Wang, G., Do, A., *et al.* (2011). UCP2 regulates energy metabolism and differentiation potential of human pluripotent stem cells. *EMBO J* 30, 4860-4873.
- Zhang, J., Nomura, J., Maruyama, M., Nishimoto, M., Muramatsu, M., and Okuda, A. (2009). Identification of an ES cell pluripotent state-specific DUSP6 enhancer. *Biochem Biophys Res Commun* 378, 319-323.
- Zhang, J., Ratanasirintrao, S., Chandrasekaran, S., Wu, Z., Ficarro, S.B., Yu, C., Ross, C.A., Cacchiarelli, D., Xia, Q., Seligson, M., *et al.* (2016). LIN28 Regulates Stem Cell Metabolism and Conversion to Primed Pluripotency. *Cell Stem Cell* 19, 66-80.
- Zhao, J., Liu, T., Jin, S., Wang, X., Qu, M., Uhlen, P., Tomilin, N., Shupliakov, O., Lendahl, U., and Nister, M. (2011). Human MIEF1 recruits Drp1 to mitochondrial outer membranes and promotes mitochondrial fusion rather than fission. *EMBO J* 30, 2762-2778.
- Zhao, J., Zhang, J., Yu, M., Xie, Y., Huang, Y., Wolff, D.W., Abel, P.W., and Tu, Y. (2013). Mitochondrial dynamics regulates migration and invasion of breast cancer cells. *Oncogene* 32, 4814-4824.
- Zhao, S., Nichols, J., Smith, A.G., and Li, M. (2004). SoxB transcription factors specify neuroectodermal lineage choice in ES cells. *Mol Cell Neurosci* 27, 332-342.
- Zhao, Y., Zhao, T., Guan, J., Zhang, X., Fu, Y., Ye, J., Zhu, J., Meng, G., Ge, J., Yang, S., *et al.* (2015). A XEN-like State Bridges Somatic Cells to Pluripotency during Chemical Reprogramming. *Cell* 163, 1678-1691.

- Zhou, G., Meng, S., Li, Y., Ghebre, Y.T., and Cooke, J.P. (2016). Optimal ROS Signaling Is Critical for Nuclear Reprogramming. *Cell Rep* 15, 919-925.
- Zhou, H., Wu, S., Joo, J.Y., Zhu, S., Han, D.W., Lin, T., Trauger, S., Bien, G., Yao, S., Zhu, Y., *et al.* (2009). Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* 4, 381-384.
- Zhou, W., Choi, M., Margineantu, D., Margaretha, L., Hesson, J., Cavanaugh, C., Blau, C.A., Horwitz, M.S., Hockenbery, D., Ware, C., *et al.* (2012). HIF1alpha induced switch from bivalent to exclusively glycolytic metabolism during ESC-to-EpiSC/hESC transition. *EMBO J* 31, 2103-2116.
- Zhou, W., and Freed, C.R. (2009). Adenoviral gene delivery can reprogram human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 27, 2667-2674.
- Zhu, H., Shyh-Chang, N., Segre, A.V., Shinoda, G., Shah, S.P., Einhorn, W.S., Takeuchi, A., Engreitz, J.M., Hagan, J.P., Kharas, M.G., *et al.* (2011). The Lin28/let-7 axis regulates glucose metabolism. *Cell* 147, 81-94.
- Zhu, S., Li, W., Zhou, H., Wei, W., Ambasadhan, R., Lin, T., Kim, J., Zhang, K., and Ding, S. (2010). Reprogramming of human primary somatic cells by OCT4 and chemical compounds. *Cell Stem Cell* 7, 651-655.
- Zirath, H., Frenzel, A., Oliynyk, G., Segerstrom, L., Westermark, U.K., Larsson, K., Munksgaard Persson, M., Hultenby, K., Lehtio, J., Einvik, C., *et al.* (2013). MYC inhibition induces metabolic changes leading to accumulation of lipid droplets in tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 10258-10263.
- Ziviani, E., Tao, R.N., and Whitworth, A.J. (2010). Drosophila parkin requires PINK1 for mitochondrial translocation and ubiquitinates mitofusin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 5018-5023.
- Zu, X.L., and Guppy, M. (2004). Cancer metabolism: facts, fantasy, and fiction. *Biochem Biophys Res Commun* 313, 459-465.
- Zuchner, S., Mersiyanova, I.V., Muglia, M., Bissar-Tadmouri, N., Rochelle, J., Dadali, E.L., Zappia, M., Nelis, E., Patitucci, A., Senderek, J., *et al.* (2004). Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet* 36, 449-451.

Anexo

Publicaciones científicas derivadas de esta tesis doctoral:

Prieto, J., León, M., Ponsoda, X., Sendra, R., Bort, R., Ferrer-Lorente, R., Raya, A., López-García, C. and Torres, J. (2016). Early ERK1/2 activation promotes DRP1-dependent mitochondrial fission necessary for cell reprogramming. *Nat Commun* 7, 11124. DOI: 10.1038/ncomms11124.

Prieto, J., León, M., Ponsoda, X., García-García, F., Bort, R., Serna, E., Barneo-Muñoz, M., Palau, F., Dopazo, J., López-García, C. and Torres, J. (2016). Dysfunctional mitochondrial fission impairs cell reprogramming. *Cell Cycle* 15 (23), 3240-3250. DOI: 10.1080/15384101.2016.1241930.

ARTICLE

Received 7 Jul 2015 | Accepted 23 Feb 2016 | Published 31 Mar 2016

DOI: 10.1038/ncomms11124

OPEN

Early ERK1/2 activation promotes DRP1-dependent mitochondrial fission necessary for cell reprogramming

Javier Prieto¹, Marian León¹, Xavier Ponsoda¹, Ramón Sendra², Roque Bort³, Raquel Ferrer-Lorente^{4,5,6}, Angel Raya^{4,5,6}, Carlos López-García¹ & Josema Torres¹

During the process of reprogramming to induced pluripotent stem (iPS) cells, somatic cells switch from oxidative to glycolytic metabolism, a transition associated with profound mitochondrial reorganization. Neither the importance of mitochondrial remodelling for cell reprogramming, nor the molecular mechanisms controlling this process are well understood. Here, we show that an early wave of mitochondrial fragmentation occurs upon expression of reprogramming factors. Reprogramming-induced mitochondrial fission is associated with a minor decrease in mitochondrial mass but not with mitophagy. The pro-fission factor Drp1 is phosphorylated early in reprogramming, and its knockdown and inhibition impairs both mitochondrial fragmentation and generation of iPS cell colonies. Drp1 phosphorylation depends on Erk activation in early reprogramming, which occurs, at least in part, due to downregulation of the MAP kinase phosphatase Dusp6. Taken together, our data indicate that mitochondrial fission controlled by an Erk-Drp1 axis constitutes an early and necessary step in the reprogramming process to pluripotency.

¹Departamento de Biología Celular, Universidad de Valencia, Burjassot 46100, Spain. ²Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Valencia, Burjassot 46100, Spain. ³Unidad de Hepatología Experimental, CIBERehd, Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, Valencia 46026, Spain. ⁴Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona, Barcelona 08003, Spain. ⁵Centro de Investigación Biomédica en Red en Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina, Madrid 28029, Spain. ⁶Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats, Barcelona 08010, Spain. Correspondence and requests for materials should be addressed to J.T. (email: josema.torres@uv.es).

Somatic cells can be reprogrammed to induced pluripotent stem (iPS) cells by forced expression of Oct4 (also known as Pou5f1), Sox2, Klf4 and c-Myc^{1,2} (named as OSKM hereinafter). Reprogramming of somatic cells is a stepwise process and cells must overcome several barriers before reaching the pluripotent state^{3,4}. These barriers include the downregulation of somatic gene expression, senescence and acquisition of epithelial-like features during the early and middle steps, and stabilization of the pluripotent state by inducing a robust activation of the gene expression network characteristic of undifferentiated embryonic stem (ES) cells in later stages. Epigenetic remodelling of the somatic genomic landscape occurs throughout the reprogramming process leading to the bivalent state of chromatin representative of ES cells⁵.

Mitochondria are key organelles for cellular homeostasis that join by fusion and divide by fission⁶. Fusion is mediated by Mitofusin-1 and -2 (Mfn1 and Mfn2) and optic atrophy 1 (Opa1) proteins located at the outer and inner mitochondrial membranes, respectively. Fission is mediated by dynamin-related protein 1 (Drp1) (ref. 7), a cytosolic protein that, on activation, is recruited to the surface of mitochondria with the collaboration of accessory proteins, such as mitochondrial fission factor (Mff), mitochondrial fission protein 1 (Fis1) or mitochondrial elongation factor 1 and 2 (Mief1/MiD51 and Mief2/MiD49, respectively)^{8–14}. Mitochondrial fission starts by the formation of an initial constriction in the mitochondria at contact sites with the endoplasmic reticulum^{15,16}. Activated Drp1 is then recruited to the constricted mitochondrial membrane, forming a ring that eventually fragments mitochondria in a GTPase-dependent manner¹⁷.

Drp1 undergoes post-translational modifications that regulate its recruitment to mitochondria in different settings, including phosphorylation, S-nitrosylation, ubiquitination and sumoylation^{6,18}. For instance, mitochondrial association is promoted by phosphorylation of human DRP1 at serine 616 (S616) by CDK1 during mitosis or by PKC δ in neuronal cells under oxidative stress^{19,20}. On another hand, phosphorylation of serine 637 in human DRP1 by PKA impairs its recruitment to mitochondria, whereas dephosphorylation of this residue by PP2A or calcineurin favours its recruitment to these organelles^{21–23}. In addition, ROCK1-, CaMKI α - and AMPK-mediated phosphorylation of serine 637, and GSK3 β phosphorylation of serine 693 in DRP1 play important roles in the regulation of DRP1 recruitment to the mitochondria in different cellular contexts^{24–27}.

Recently, it was shown that phosphorylation of DRP1-S616 by ERK2 promotes mitochondrial fission and mitogen-activated protein kinase (MAPK)-driven tumour growth^{28,29}. MAPKs are a highly relevant family of protein kinases, which play a major role in maintaining cellular homeostasis in response to external and intracellular cues as well as in the regulation of a wide range of physiological processes. The activation status of MAPKs reflects the balance of their phosphorylation by specific MAPK-kinases and their dephosphorylation by inactivating serine/threonine phosphatases, dual specificity protein phosphatases (DUSPs) and/or protein tyrosine phosphatases (PTPs). Among these, the DUSP family of protein phosphatases is dedicated to the specific regulation of MAPKs in mammalian cells, with DUSP6, DUSP7 and DUSP9 being the major cytoplasmic phosphatases that dephosphorylate and inactivate ERK1/2 (refs 30,31).

Although recent reports have highlighted the importance of mitochondria in cell reprogramming from a metabolic perspective^{32–34}, the role of the dynamics of these organelles in this process remains unexplored. Here we show that expression of reprogramming factors downregulates *Dusp6* gene expression to activate ERK signalling and promote a Drp1-dependent mitochondrial fission pathway that is necessary for cell reprogramming to pluripotency.

Results

Cell reprogramming induces mitochondrial fission. We sought to investigate mitochondrial dynamics during cell reprogramming. Mitochondrial morphology was assessed in mouse embryonic fibroblasts (MEFs), before or after transduction with retroviruses encoding the OSKM reprogramming factors for the indicated times, by immunofluorescence (IF) with anti-Tom20 antibody (Fig. 1a). We classified cells according to their mitochondrial morphology as tubular, fragmented or mixed (Supplementary Fig. 1a). Before expression of the reprogramming factors, cells largely displayed tubular mitochondrial morphology (Fig. 1a, graphic and right panels). Interestingly, mitochondrial fission ensued when cells were transduced with OSKM-encoding retroviruses, peaking at day 3.5 with 55% of the cells presenting fragmented mitochondria. Conversely, the percentage of cells with tubular mitochondrial morphology decreased to 15% at day 3.5. From this day onwards, mitochondrial fragmentation decreased steadily to ~15% at day 8 of the process and cells slowly regained a tubular mitochondrial morphology that reached a plateau at day 7, with 50% of the cells displaying a networked mitochondrial structure. Altogether, these results indicate that OSKM expression induced mitochondrial fission early in reprogramming.

During reprogramming cells undergo mesenchymal to epithelial transition^{35,36}. Alexa Fluor 488-Phalloidin staining of cultures from day 6 following OSKM transduction of MEFs showed scattered cells displaying thick, parallel bundles of F-actin characteristic of mesenchymal cells (Fig. 1b, leftmost panels) and isolated epithelial-like colonies displaying thin cortical bundles of F-actin (Fig. 1b, middle and right). Mesenchymal cells presented a mitochondrial morphology distribution similar to that found at day 0 (compare graph in Fig. 1b left bar to that in Fig. 1a), whereas over 80% of epithelial-like cells displayed fragmented mitochondria (Fig. 1b, right bar). Ultrastructural analysis of the cultures by transmission electron microscopy at different days of reprogramming showed a gradual reduction in mitochondrial size ranging from ~1 μ m on day 0 to 0.5 μ m in cells constituting the epithelial-like colonies on day 8 of reprogramming (graph in Fig. 1c). Other than in size, we did not observe any further differences in the internal structure of the mitochondria between cells at different stages of reprogramming (Fig. 1c, left). Interestingly, epithelial-like colonies displayed a mitochondrial morphology similar to that found in pluripotent cells, where all cells presented fragmented mitochondria (Fig. 1d), indicating that a mitochondrial morphology characteristic of the pluripotent state is established during the early phases of reprogramming, before acquiring or just after achieving epithelial-like morphology. These results also suggest that mitochondrial fission early in reprogramming is critical for initiating the transit to pluripotency.

Reprogramming intermediates contain fragmented mitochondria.

Somatic cells prone to undergo cell reprogramming downregulate the somatic Thy1 surface marker (Supplementary Fig. 1b,c) very early upon expression of reprogramming factors^{37,38}. We next sought to investigate whether these first cellular intermediates of cell reprogramming underwent mitochondrial fission. For this, we first analysed mitochondrial morphology in Thy1-positive and -negative cells during the early stages of reprogramming by IF. Expression of OSKM in MEFs caused a small change in the proportion of Thy1-positive cells that displayed fissioned mitochondria during the first days of reprogramming. Remarkably, the percentage of Thy1-negative cells displaying fragmented mitochondria greatly increased during the first 4 days reprogramming (Fig. 2a). These results suggest that mitochondrial fragmentation is associated with cells prone to undergo full cell reprogramming. To test this further, we

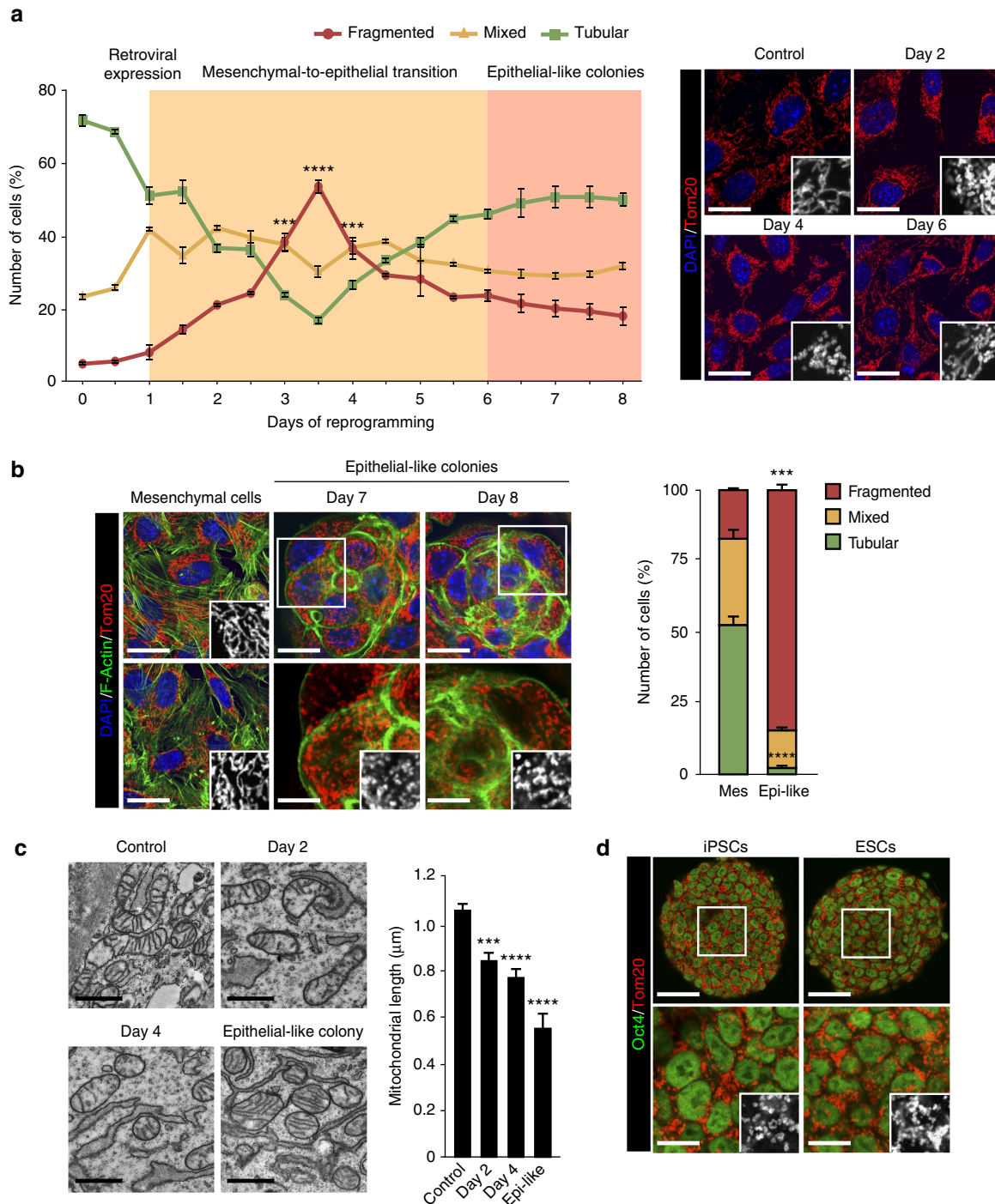


Figure 1 | Cell reprogramming induces mitochondrial fission. (a) MEFs were mock-infected (day 0, control) or OSKM-transduced. At the indicated days, cells were fixed and mitochondrial morphology assessed by IF. (right) IF images of MEFs stained with anti-Tom20 antibody (red) before (control) or after expressing the OSKM factors for the indicated days. Insets show a black and white magnification of the pictures. DAPI (blue) was used as a nuclear counterstaining. Scale bar, 24 μm . Graph on the left, quantification of the different mitochondrial morphologies observed in MEFs before (day 0) or at the indicated days after OSKM expression ($n=3$). Shaded areas depict the timing for MET (orange) and the appearing of epithelial-like colonies (pink). (b) IF images of mesenchymal cells (scale bar, 24 μm (leftmost)) or epithelial-like colonies (scale bar, 16 μm (middle); scale bar, 16 μm (right)) found in the cultures at the indicated days of reprogramming showing F-actin and mitochondria stainings. Middle and right lower images are a magnification of the indicated area in the respective upper panels. Scale bar, 8 μm . Insets show a black and white magnification of the pictures. DAPI (blue) was used as a nuclear counterstaining. Graph on the right, quantification of the indicated mitochondrial morphologies observed in the mesenchymal cells (Mes) or epithelial-like colonies (Epi-like) at day 8 of reprogramming ($n=3$). (c) TEM micrographs of MEFs before (control) or at the indicated days after OSKM expression, or epithelial-like colony (Epi-like) at day eight of reprogramming, displaying the ultrastructural characteristics of their mitochondria. Scale bar, 800 nm. Graph on the right, quantification of the mitochondrial length observed in the indicated cells ($n \geq 800$). (d) IF images of pluripotent cells stained with anti-Oct4 (green) and anti-Tom20 antibodies (red). Insets below are a black and white magnification of the pictures illustrating mitochondrial morphologies. Scale bar, 40 μm (upper); scale bar, 16 μm (lower), respectively. Data are represented as mean \pm s.e.m. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$). One-tailed unpaired Student's t -test was used to compare data sets.

sorted cells at day 4 of reprogramming based on Thy1 expression and followed the Thy1-positive and -negative cell populations along the cell reprogramming path. Strikingly and in contrast to the Thy1-positive population, we observed that the Thy1-negative cell population gave rise to about 4-fold more epithelial-like and SSEA1-positive colonies than the Thy1-positive counterparts at days 12 and 18 of reprogramming, respectively (Fig. 2b). Cells in both epithelial-like and SSEA1-positive colonies displayed fragmented mitochondria (Fig. 2c). Altogether, these results support the hypothesis that mitochondrial fission is intimately linked to successful cell reprogramming to pluripotency.

Although we detected a minor decrease in mitochondrial mass by flow cytometry or Tom40 immunoblotting, we neither observed an induction of LC3B-dependent autophagy, nor mitophagy early in cell reprogramming (Supplementary Figs 1d–f and 2a–c). In fact, we detected an inhibition of LC3B-mediated autophagy during the early stages of the cell reprogramming process in a

time-dependent manner, as measured by the amount of recombinant GFP-LC3B puncta and processing of endogenous LC3B in the cultures (Supplementary Fig. 1d,e). Genes involved in mitochondrial biogenesis showed increased expression at later stages of reprogramming (Supplementary Fig. 2d). Altogether, these results indicate that OSKM-induced mitochondrial fission was not associated with mitophagy.

OSKM-induced mitochondrial fission is Drp1-dependent. To gain insight into the gene network controlling mitochondrial dynamics during reprogramming, we examined the expression of factors, known to play a role in the regulation of this process¹⁸, in MEFs, OSKM-expressing cells and pluripotent cells. Relative to their expression at day 0 in MEFs, the expression of the pro-fission factors *Gdap1*, *Fis1*, *Mff*, *MiD49* and *MiD51* (Supplementary Fig. 3a), with the exception of *Drp1* that increased threefold

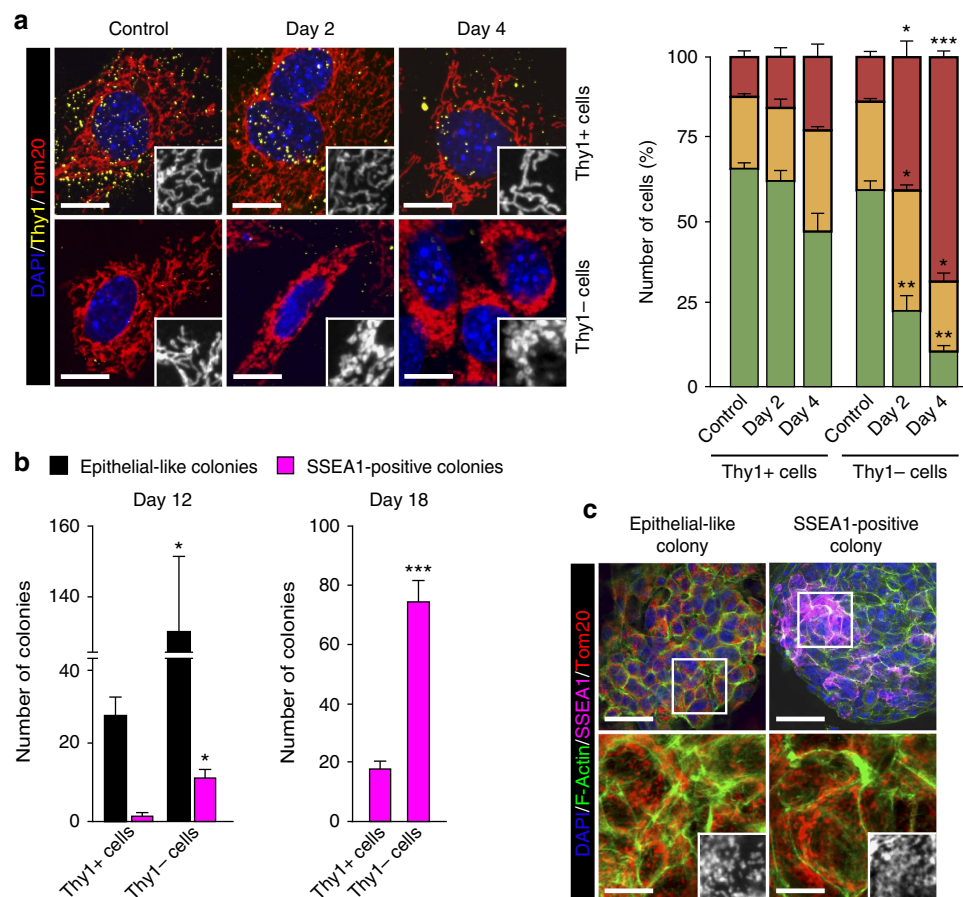


Figure 2 | Mitochondrial fission is associated with cells undergoing reprogramming. (a) MEFs were mock-infected (control) or transduced with the reprogramming factors. At the indicated days, cells were fixed and Thy1 expression and mitochondrial morphology assessed by IF. (left) Representative confocal images of MEFs stained with anti-Thy1 (yellow) and anti-Tom20 (red) antibodies before (control) or after expressing the OSKM factors for the indicated days. Insets show a black and white magnification of the pictures. DAPI (blue) was used as a nuclear counterstaining. Scale bar, 16 μ m. Graph on the right shows the quantification of the different mitochondrial morphologies observed in MEFs before (control) or at the indicated days after OSKM expression in the Thy1-positive and -negative cells ($n = 3$). (b) MEFs were mock-infected (control) or transduced with the reprogramming factors. At day 4, cells were sorted as Thy1-positive and -negative. Sorted Thy1-positive and -negative cell populations were further cultured for 8 or 14 days, and epithelial-like and SSEA1-positive colonies were identified by IF analysis using Alexa Fluor 488-Phalloidin and anti-SSEA1 antibody. Graph shows the quantification of epithelial-like and SSEA1-positive colonies found at the indicated days of reprogramming (sorted at day 4) ($n = 3$). (c) Representative confocal images of epithelial-like and SSEA1-positive colonies found in OSKM-transduced MEFs at days 12 and 18 of reprogramming stained with Alexa Fluor 488-Phalloidin (green, to stain F-actin), anti-Tom20 (red, to label mitochondria) and anti-SSEA1 (violet, to label pluripotent colonies) antibodies. (lower) Higher magnifications of the indicated area in the respective upper images. Insets in the lower images are a black and white magnification of the pictures to illustrate mitochondrial morphology in colonies. Scale bar, 24 μ m (upper); scale bar, 8 μ m (lower), respectively. Data are represented as mean \pm s.e.m. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). One-tailed unpaired Student's *t*-test was used to compare data sets.

(Fig. 3a), was lower in pluripotent cells. In the assessment of pro-fusion factors we found that, compared with day 0, the mRNA levels of *Opa1* did not change in pluripotent cells (Supplementary Fig. 3a and see below), while the expression of *Mfn1* and *Mfn2* was either comparable to the levels found in control MEFs (*Mfn1*) or decreased by more than 75% (*Mfn2*) in pluripotent cells (Supplementary Fig. 3a and see below). Interestingly, the expression of the majority of the factors involved in mitochondrial dynamics increased during reprogramming (Fig. 3a and Supplementary Fig. 3a), reflecting the early adjustment of mitochondrial shape and function induced upon expression of reprogramming factors.

As Drp1 was the only pro-fission factor showing an increase in its expression during reprogramming and in pluripotent cells, we hypothesized that OSKM-induced mitochondrial fission could

follow a pathway dependent on the activity of this dynamin-related protein. To address the importance of Drp1 in this process, we carried out reprogramming assays in which Drp1 function was targeted by three different experimental approaches: RNA interference (Fig. 3b,c), overexpression of a dominant negative Drp1 mutation (Fig. 3d,e) and chemical inhibition of Drp1 GTPase enzymatic activity (Fig. 3f and Supplementary Fig. 3c). We then evaluated reprogramming efficiency by scoring colonies positive for Alkaline Phosphatase (AP) 25 days after OSKM expression. Inhibition of Drp1 function by either reduction of *Drp1* mRNA and protein levels by endoribonuclease-prepared small interference RNAs (esiRNAs) targeting Drp1 (Supplementary Fig. 3b), overexpression of the Drp1^{K38A} dominant negative mutation or treatment of the cells with the Drp1 inhibitor Mdivi-1 reduced the appearance of AP-positive

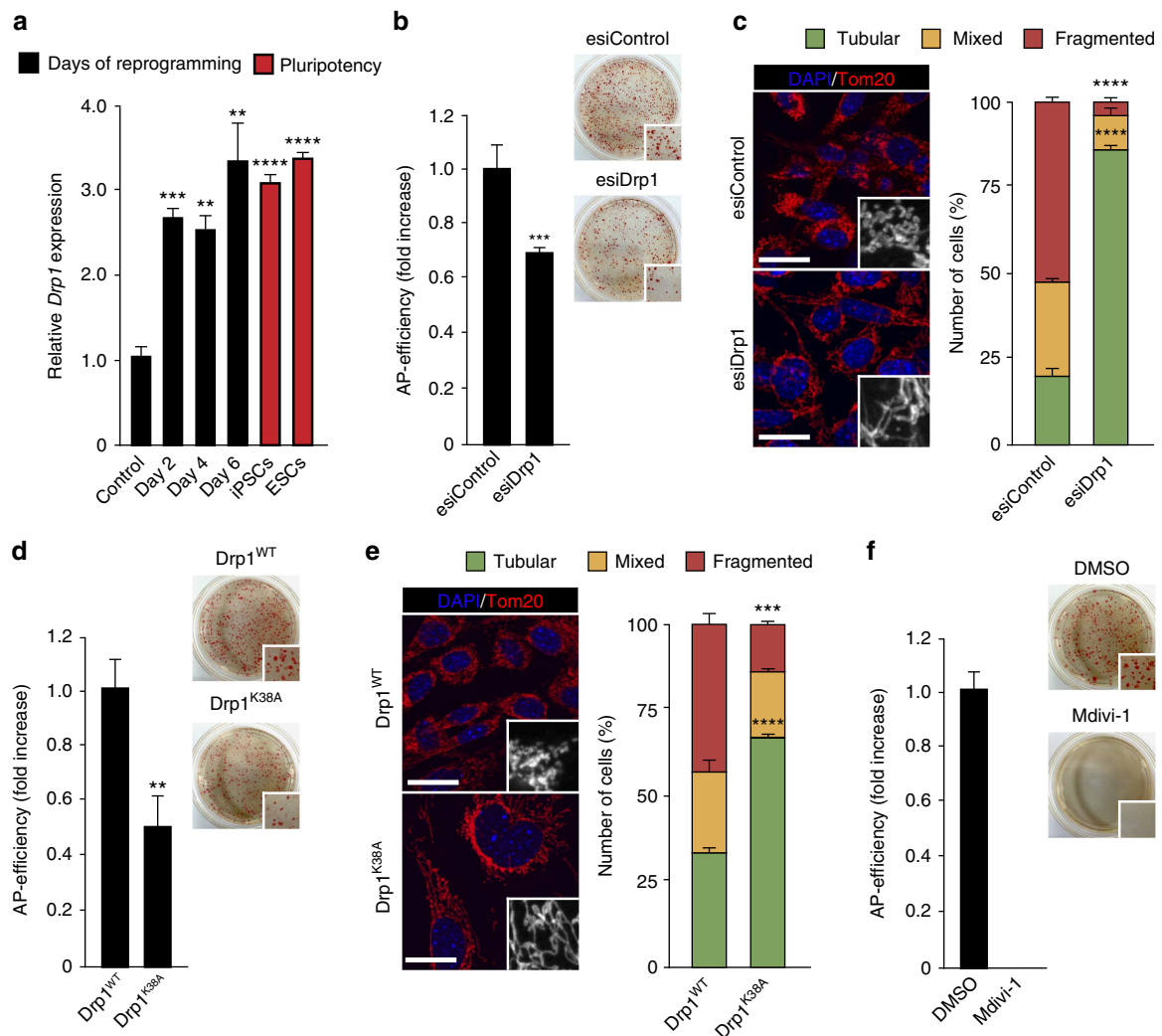


Figure 3 | Reprogramming-induced mitochondrial fission follows a Drp1-dependent pathway. (a) Total RNA was extracted from wild-type MEFs left untreated (control) or OSKM-infected for the indicated days (black bars), or from the indicated pluripotent cells (red bars). The expression of *Drp1* gene was then assessed by qPCR and represented as relative gene expression normalized to control MEFs ($n = 3$). (b,d,f) Graphs showing the number of AP-positive colonies obtained after 25 days of retroviral delivery of the OSKM factors in the presence of (b) esiRNA control (esiControl) or esiRNA targeting *Drp1* (esiDrp1), (d) Drp1 wild-type (Drp1^{WT}) or the catalytically inactive K38A mutation (Drp1^{K38A}) or (f) the Drp1 inhibitor Mdivi-1 (50 μ M) ($n = 6$). (right) Representative bright-field images from the plates of the indicated cultures after AP-staining. Insets show a magnification of a selected area from the AP-stained plates. (c,e) Representative confocal images of MEFs expressing the reprogramming factors during 4 days in the presence of the indicated (c) esiRNAs or (e) Drp1 constructs and stained with anti-Tom20 antibody (red) to assess the indicated mitochondrial morphologies. Insets show a black and white magnification of the pictures. DAPI (blue) was used as a nuclear counterstaining. Scale bars, 24 μ m. Graphs on the right of the images show the quantification of the indicated mitochondrial morphologies observed in cells treated as above ($n = 3$). Data are represented as mean \pm s.e.m. (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$). One-tailed unpaired Student's *t*-test was used to compare data sets. qPCR, quantitative PCR.

colonies by 35% (Fig. 3b), 50% (Fig. 3d) or 100% (Fig. 3f), respectively, compared with their corresponding controls. Furthermore, targeting the function of this dynamin-related protein as described above impaired OSKM-induced mitochondrial fission (Fig. 3c,e and Supplementary Fig. 3c). Altogether, these results suggest that reprogramming-induced mitochondrial fission follows a Drp1-dependent pathway.

OSKM expression induces Drp1-S579 phosphorylation.

Analysis by liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) of mitochondria-associated and cytosolic Drp1 in ES cells showed that phospho-Drp1-S579 is the only phosphorylated form of Drp1 associated with these organelles, whereas cytosolic Drp1 showed a wide variety of phosphorylated residues (Fig. 4a and Supplementary Fig. 4a). Indeed, many of the phosphorylation modifications found in cytosolic Drp1 have not been previously described and warrant further investigation into their regulatory role and cell-type specificity. We then examined whether the phosphorylation of serine 579 in mouse Drp1 (Drp1-S579), known to favour its recruitment to mitochondria in response to proliferative signals¹⁹, played a role in reprogramming-induced mitochondrial fragmentation. Remarkably, during reprogramming and compared with mock-transduced MEFs, immunoblotting analysis showed that Drp1-S579 phosphorylation increased both in a time-dependent manner upon OSKM expression and in pluripotent cells (Fig. 4b and Supplementary Fig. 4b). In agreement with the mRNA expression data showed above, Drp1 and Opa1 proteins also increased during reprogramming and in pluripotent cells, whereas Mfn2 protein levels increased during reprogramming and markedly decreased in pluripotent cells (Fig. 4b and Supplementary Fig. 4b). Overall, our findings suggest that mitochondrial fission triggered by the reprogramming factors uses a similar set of proteins to that found in somatic cells and that the dynamics of these organelles in pluripotent cells could rely on high levels of active Drp1 and low expression of Mfn2.

Strikingly, IF and subcellular fractionation analysis showed that Drp1 increased the colocalization with mitochondrial markers during cell reprogramming, compared with proliferating MEFs (Fig. 4c–e). Interestingly, Drp1 showed a marked colocalization with mitochondria in self-renewing ES cells (Fig. 4c, graph on the right). These results overall suggest that OSKM expression stimulates the recruitment of Drp1 to mitochondria during reprogramming by inducing the phosphorylation of Drp1-S579.

OSKM-induced mitochondrial fission depends on ERK signalling.

It has recently been shown that ERK2 phosphorylated DRP1-S616 in human cells (the equivalent to S579 in mouse Drp1) (refs 28,29). We next investigated the possibility that Erk1/2-mediated Drp1-S579 phosphorylation could play a role in reprogramming-induced mitochondrial fission. Indeed, immunoblotting analysis showed that Erk1/2 phosphorylation during the first 4 days of reprogramming paralleled that of phospho-S579-Drp1 (Fig. 5a). In addition, 16 h incubation of OSKM-transduced cells with the specific MEK1/2 inhibitor PD0325901 decreased Erk1/2 activation by 50% and phospho-Drp1-S579/total Drp1 protein ratio by 35% relative to mock-treated controls (Fig. 5b). Moreover, IF analysis showed that inhibition of Erk1/2 activity by the MEK1/2 inhibitor decreased mitochondrial fragmentation compared with mock-treated control (Fig. 5c). Treatment with the MEK inhibitor did not affect Opa1 or Mfn2 protein levels (Fig. 5b), suggesting that the inhibition of OSKM-induced mitochondrial fission was due to the decrease in the Erk1/2-mediated Drp1-S579 phosphorylation. Supporting this, expression of Drp1 containing the

phosphomimetic S579D mutation (Drp1^{S579D}) rescued OSKM-induced mitochondrial fragmentation in cells incubated with the MEK inhibitor, whereas expression of the Drp1^{WT} did not (Fig. 5d). Although a contribution of Cdk1 to the phosphorylation of Drp1-S579 cannot be completely ruled out¹⁹, our results indicate that the activation of the MAP-kinases Erk1/2 by the reprogramming factors is required for OSKM-induced mitochondrial fission.

OSKM expression activates Erk1/2 by reducing Dusp6 levels.

Members of the DUSP family of protein phosphatases control intracellular MAP-kinase activity, and the expression level of DUSP phosphatases is inversely proportional to levels of MAP-kinase activity^{30,31}. Interestingly, we observed that the mRNA levels of one the major Erk cytosolic phosphatases, *Dusp6*, decreased early during reprogramming in a time-dependent manner (Fig. 6a). This suggests that the observed decrease in *Dusp6* expression could lead to ERK signalling activation early in reprogramming. In fact, expression of recombinant *Dusp6* decreased both Erk1/2 activation and Drp1-S579 phosphorylation induced by OSKM expression (Fig. 6b). In line with these findings, *Dusp6* overexpression decreased OSKM-induced mitochondrial fission by about 50% compared with the control cells (Fig. 6c), without affecting Opa1 or Mfn2 protein levels (Fig. 6b). Remarkably, expression of Drp1^{S579D} together with OSKM rescued reprogramming-induced mitochondrial fission, whereas Drp1^{WT} did not (Fig. 6d). Furthermore and relative to control MEFs co-transduced with empty vector and OSKM-encoding retroviruses, the addition of *Dusp6* to the reprogramming cocktail reduced the appearance of AP-positive colonies by 60% (Fig. 6e, graph on the left). A similar effect was observed when reprogramming was carried out in the presence of a MEK1/2-inhibitor (Fig. 6e, graph on the right). Taken together, these results propose a role for *Dusp6* downregulation in the early activation of Erk1/2 to drive the Drp1-dependent mitochondrial fragmentation necessary for cell reprogramming (Fig. 7).

Discussion

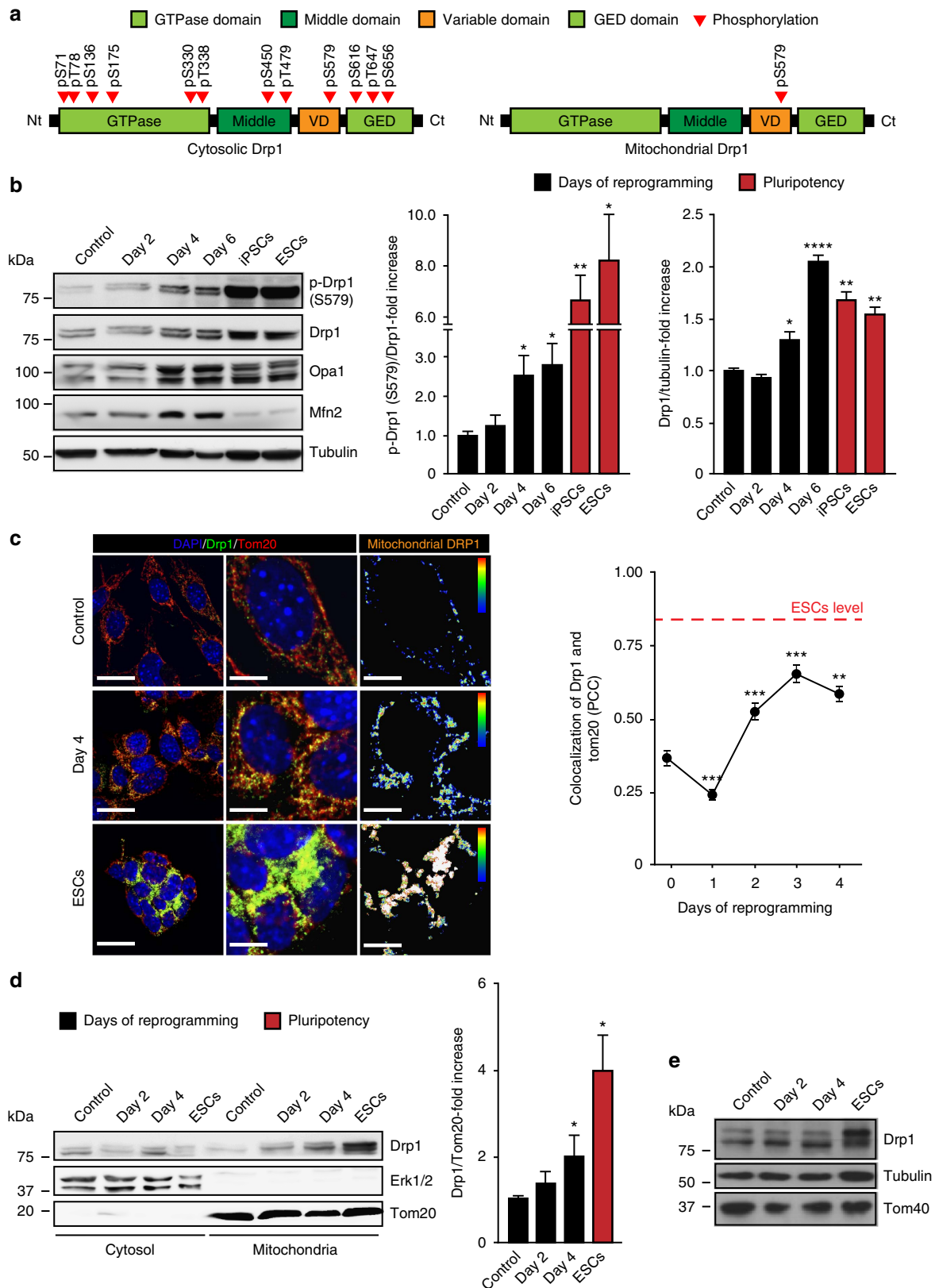
During cell reprogramming, somatic cells undergo a profound reorganization in the number and shape of mitochondria that reflects the transition from a somatic oxidative- into a pluripotent glycolytic-based metabolism³⁹. In this study, we uncovered a mitochondrial fission process, orchestrated by ERK signalling to activate Drp1, that constitutes an early and necessary step for efficient cell reprogramming to pluripotency.

The bioenergetics switch observed during reprogramming takes place during the mid-to-late stages of the process³² and our data indicate that reprogramming-induced mitochondrial fission precedes this metabolic change. Notably, mitochondrial fission promotes a shift to aerobic glycolysis in different cells types, including neuroblastoma⁴⁰, vascular smooth muscle cells⁴¹ and cancer-associated myofibroblasts⁴². Furthermore, a number of studies have proposed a pro-tumourigenic role for mitochondrial fission^{28,29,40,43–49}. Thus, it is possible that reprogramming-induced mitochondrial fission could be one of the first events promoting a metabolic rewiring during this process, favouring the transition towards a glycolytic-based metabolism necessary to support the rapid proliferation of pluripotent cells.

Compared with their somatic counterparts, iPSC cells show a reduction in the number and complexity of mitochondria. Although mitochondrial fission is part of the quality-control mechanism whereby damaged mitochondria are eliminated by mitophagy¹⁸, our results indicate that this specific form of autophagy was not activated during the early steps of

reprogramming. In contrast, transient activation of autophagy was shown to reduce mitochondrial number very early in reprogramming⁵⁰. It is possible that the activation peak of this degradative process observed by Wang *et al.* went unnoticed in our experimental settings due to its rapid and

transient nature. On another hand and in agreement with our results, it has recently been shown that LC3/Atg5-dependent autophagy is not responsible for mitochondrial remodelling during reprogramming^{51,52}. These observations altogether suggest that the reduction in the quantity and complexity of



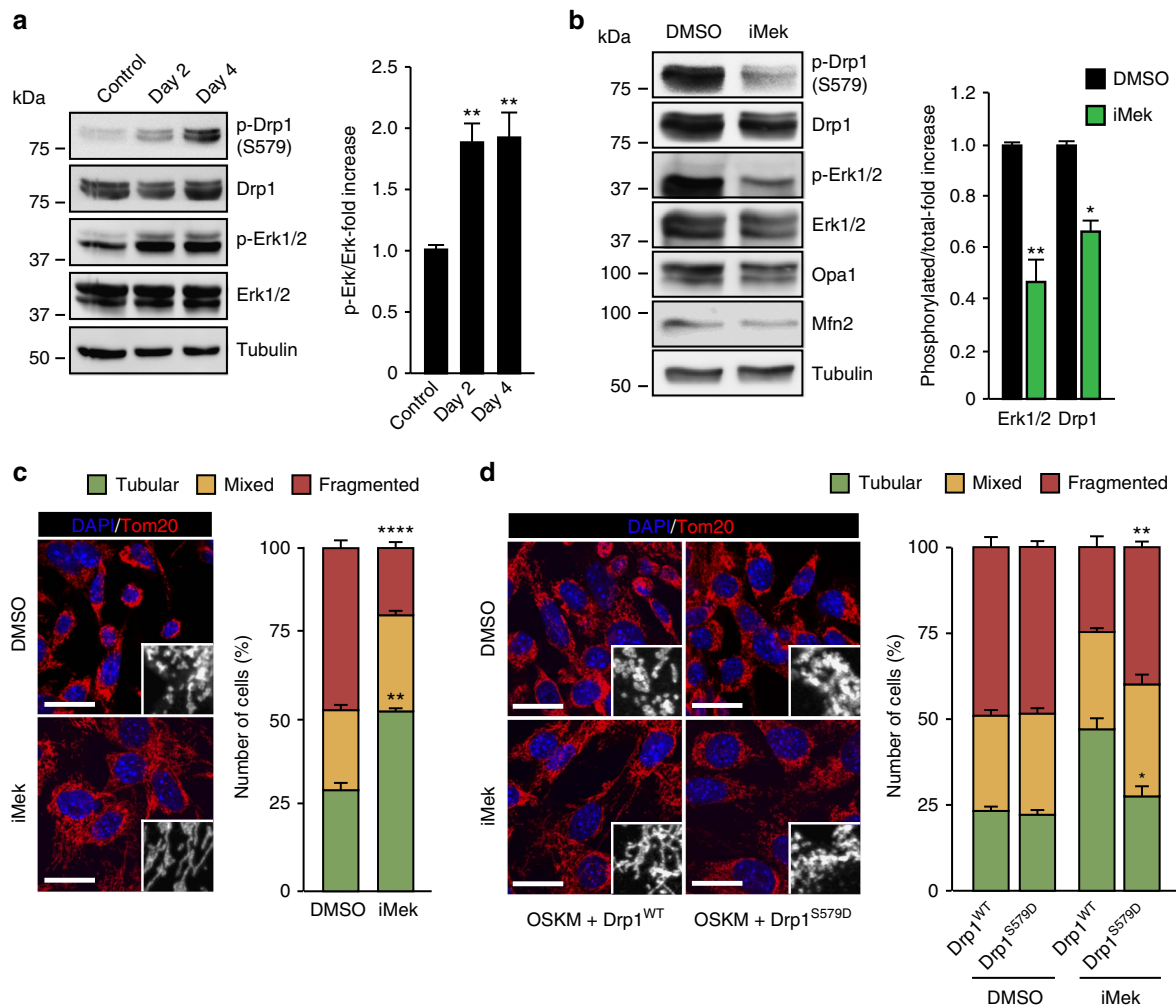


Figure 5 | Reprogramming-induced mitochondrial fission depends on Erk1/2 phosphorylation of Drp1. (a) Lysates of mock- or OSKM-transduced MEFs for the indicated days were analysed by immunoblotting using the indicated antibodies. Graphs on the right show the quantification of the indicated ratios ($n = 3$). (b) MEFs were OSKM-transduced and 3 days post-infection cells were treated with DMSO (black bars), as vehicle control, or the MEK1/2 inhibitor PD0325901 (1 μ M) (iMek, green bars) for 16 h. Then, cell lysates were prepared and analysed by immunoblotting using the indicated antibodies (left). Graphs on the right show the quantification of the indicated ratios ($n = 3$). (c) (left) Representative confocal images of OSKM-expressing MEFs for 3 days, treated as in b and stained with anti-Tom20 antibody (red) to assess the different mitochondrial morphologies. Insets show a black and white magnification of the pictures. DAPI (blue) was used as a nuclear counterstaining. Scale bars, 24 μ m. Graph on the right shows the quantification of the indicated mitochondrial morphologies observed in the cells treated as indicated ($n = 3$). (d) (left) Representative confocal images of MEFs expressing the reprogramming factors, together with Drp1 wild type (Drp1^{WT}) or the phosphomimetic S579D mutation (Drp1^{S579D}), during 4 days. Cells were then treated, fixed and stained as in c. Insets show a black and white magnification of the pictures. DAPI (blue) was used as a nuclear counterstaining. Scale bars, 24 μ m. Graph on the right shows the quantification of the indicated mitochondrial morphologies observed in the cells treated as indicated ($n = 3$). Data are represented as mean \pm s.e.m. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$). One-tailed unpaired Student's t -test was used to compare data sets.

Figure 4 | OSKM-induced Drp1 phosphorylation at serine 579. (a) Diagram depicting the identified phosphorylated residues in cytosolic- (left) or mitochondria- (right) associated Drp1 in self-renewing ES cells by LC-MS/MS. (b) Lysates of mock- or OSKM-transduced MEFs for the indicated days, or the specified pluripotent cells were analysed by immunoblotting using the indicated antibodies. Graphs on the right show the quantification of the indicated ratios ($n = 3$). (c) Representative confocal images of MEFs before (control, upper) or 4 days after OSKM expression (day 4, middle), or ES cells (ESCs, lower) stained with anti-Drp1 (green) or anti-Tom20 (red) antibodies. DAPI (blue) was used as a nuclear counterstaining. (middle) Magnification of the pictures on the left. Rightmost pictures are colour map representations of the pictures in the middle panels to display colocalized pixels between both fluorophores according to the displayed colour bar. Warm colours depict pixels with highly correlated intensity and spatial overlap while cold colours are indicative of random or anti-correlation. Scale bars, 24 μ m (left); scale bar, 12 μ m (middle); and scale bar, 12 μ m (right). Graph on the right shows the quantification of the PCC to display the degree of colocalization between Drp1 and Tom20 at the indicated days of reprogramming. Red dashed line indicates the levels of Drp1 and Tom20 colocalization found in ES cells ($n = 3$). (d) Cells treated as in b were lysed at the indicated days and fractionated into cytosolic or mitochondrial subcellular fractions. Then, subcellular fractions were subjected to immunoblotting analysis using the indicated antibodies. Graph shows the quantification of the Drp1/Tom20 co-fractionation ratio in the mitochondrial fraction ($n = 3$). (e) Immunoblot showing the amount of the indicated proteins in total lysates from cells used for subcellular fractionation as control. Data are represented as mean \pm s.e.m. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$). One-tailed unpaired Student's t -test was used to compare data sets. LC-MS/MS, liquid chromatography with tandem mass spectrometry.

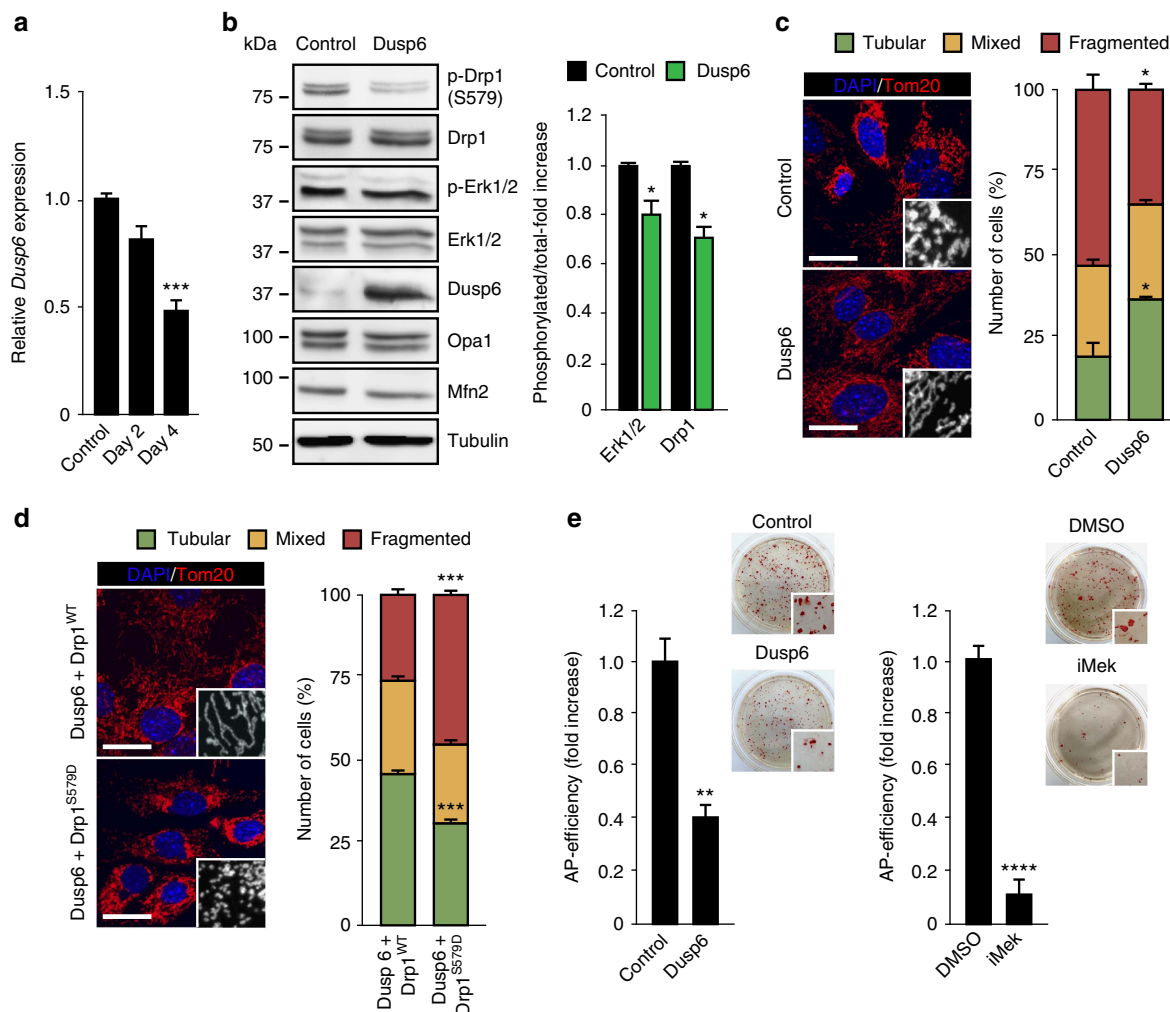


Figure 6 | Effect of Dusp6 in cell reprogramming. (a) *Dusp6* gene expression in untreated (control) or OSKM-infected MEFs was assessed by qPCR ($n = 3$). (b) MEFs were transfected with OSKM together with empty vector- or Dusp6-encoding retroviruses. Four days after, cell lysates were prepared and analysed by immunoblotting using the indicated antibodies. Graphs on the right show the quantification of the data ($n = 3$). (c) (left) IF images of MEFs transfected as in b and stained with anti-Tom20 antibody (red) 4 days post infection to assess the different mitochondrial morphologies. Insets show a black and white magnification of the pictures. DAPI (blue) was used as a nuclear counterstaining. Scale bars, 24 μ m. Graph on the right shows the quantification of the observed mitochondrial morphologies in the cells ($n = 3$). (d) (left) IF images of MEFs co-expressing the reprogramming factors and Dusp6 together with Drp1 wild type (Drp1^{WT}) or the phosphomimetic S579D mutation (Drp1^{S579D}) during 4 days. Cells were then fixed and stained as in c. Insets show a black and white magnification of the pictures. DAPI (blue) was used as a nuclear counterstaining. Scale bars, 24 μ m. Graph on the right, quantification of the indicated mitochondrial morphologies observed in the cells ($n = 3$). (e) Graphs showing the number of AP-positive colonies obtained in MEFs after 25 days of retroviral delivery of the OSKM factors either together with empty vector- (control) or Dusp6-encoding retroviruses (Dusp6) (left) or in the presence of DMSO (as vehicle control) or the MEK1/2 inhibitor PD0325901 (1 μ M) (iMek) (right) ($n = 3$). Panels in the right, bright-field images from the plates of the indicated cultures after AP-staining. Insets show a magnification of a selected area from the AP-stained plates. Data are represented as mean \pm s.e.m. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$). One-tailed unpaired Student's *t*-test was used to compare data sets. qPCR, quantitative PCR.

mitochondria occurs at later during reprogramming, possibly through an adaptive process to the growth conditions required for maintaining self-renewal of highly proliferative pluripotent cells and/or through an Atg5-independent autophagy pathway⁵². Surprisingly, Drp1 was recently reported to be dispensable for cell reprogramming⁵³. Conversely and in agreement with our results, inhibition of Drp1 function by either pharmacological inhibition or short-hairpin RNA-mediated knockdown impaired reprogramming in human cells^{54,55}. These paradoxical results could be explained by the incomplete knockdown of Drp1 achieved by Wang *et al.*⁵³ in their experiments.

Inhibition of ERK signalling has been a key finding to define a unique ground state of pluripotency in ES cells, and the

supplementation of culture media with MEK1/2 inhibitors to impair ERK signalling has been instrumental in the derivation of ES cells from certain mouse strains or other species^{56–58}. Accordingly, inhibition of ERK signalling during late stages of reprogramming favoured the acquisition of pluripotency, while early inhibition of these kinases impaired the process of cell reprogramming⁵⁹. Thus, ERK signalling plays opposing roles at different phases of cell reprogramming. ERK signalling favours ES cell differentiation by destabilizing the pluripotency network and targeting poised chromatin to developmental genes and, by doing so, sensitizing pluripotent cells to instructive differentiation signals^{60,61}. Therefore, this effect may explain the positive effect of ERK inhibition in stabilizing the pluripotent state throughout

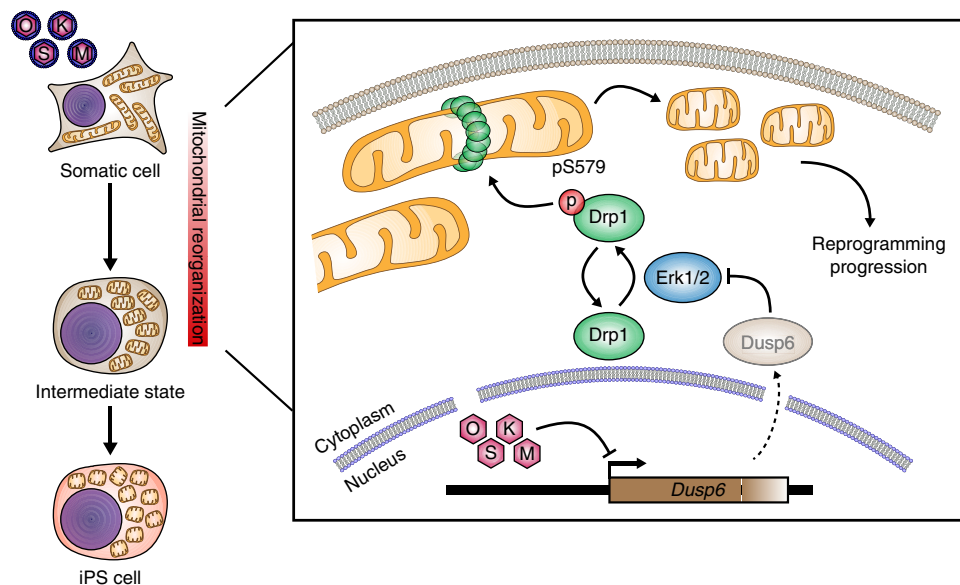


Figure 7 | Model. The illustration depicts the role of ERK signalling in activating Drp1 through its phosphorylation at S579 during early reprogramming. The role of *Dusp6* downregulation by reprogramming factors in activating ERK signalling during early reprogramming is also displayed.

the late stages of reprogramming. On the other hand, and given the importance of ERK signalling in maintaining cellular homeostasis, these kinases may play a key role during the initial phase of cell reprogramming by orchestrating a coordinated response in somatic cells to undertake the dramatic changes elicited by reprogramming factors, before the pluripotent network is induced. In this regard, activation of ERK signalling by constitutive expression of a constitutively active K-Ras mutation confers on cells a large degree of phenotypic plasticity that promotes their neoplastic transformation and acquisition of stem cell characteristics⁶². Thus, it is likely that ERK signalling could play significant roles during the initial stages of cell reprogramming, which may pave the way for initiating the transit to the pluripotent state. We propose that one of these critical functions carried out by ERK signalling in this early phase of OSKM-induced cell reprogramming is promoting Drp1-dependent mitochondrial fission. Interestingly, OSKM-dependent repression of several members of the DUSP family very early in cell reprogramming has been shown^{63,64}. Thus and although the participation of alternative mechanisms cannot be completely ruled out, we propose a role for *Dusp6* downregulation in the activation of ERK signalling early in OSKM-induced cell reprogramming. In contrast, induction of *Dusp2* and *Dusp7* gene expression controls ERK signalling activation and pluripotency in mouse ES cells⁶⁵. And knockdown of *Dusp7* impairs mouse ES cell self-renewal⁶⁶. Therefore, transcriptional modulation of different DUSP family members is likely to act as a common mechanism for regulating ERK signalling, which plays opposing roles in somatic or pluripotent cellular states. On another hand, DRP1 phosphorylation by ERK has been shown to play an important role in cellular transformation elicited by oncogenic RAS or BRAF mutations in pancreatic cancer^{28,29}. Interestingly, activation of ERKs in pancreatic cancer and cell reprogramming takes place at different levels of the pathway: upstream by RAS or BRAF mutations and at the level of MAP-kinases by *Dusp6* downregulation, respectively. Thus, although DRP1 activation by ERK signalling is necessary for both processes, additional cascades activated by the upstream ERK activators, which may play a role in cellular transformation, may not be involved in the process of cell reprogramming.

Although iPS cells can be obtained from any cell type, cell reprogramming is a very inefficient process³. Both deterministic and stochastic models for cell reprogramming have been proposed⁶⁷. However, the distinctive outcome upon expression of reprogramming factors may reflect the differential cellular responses to the forced expression of these factors, which could largely depend on particular physiological conditions, including cellular organization, cell cycle phase or metabolic dependence. In this regard, cells undergoing reprogramming constitute a privileged subset of cells with an ultrafast cell cycle⁶⁸. Research on the cytoarchitecture, gene expression and metabolic profiles of rapidly cycling cells could both shed light into the advantages of these cells over the normal cell population and help to understand the processes that normal cycling cells must undertake to initiate their transit to pluripotency upon expression of reprogramming factors. Finally, as cell reprogramming and tumourigenesis are gradually showing many parallels^{69,70}, our findings may also be relevant for understanding the initial events leading to human malignancies⁷¹.

Methods

Cell culture, reprogramming assays, reagents and plasmids. E14Tg2a and CCE1.19 ES cells were cultured on gelatinized plates in ES cell medium supplemented with 10% FBS (Hyclone) in the presence of LIF⁷². When indicated, ES and iPSCs were grown on gelatinized plates in 2i medium⁵⁷ ((1:1) mixture of Neurobasal:DMEMF12 (both from Life Technologies) supplemented with $0.5 \times N2$, $0.5 \times B27$ (both from Life Technologies), $3 \mu\text{M}$ CHIR99021 and $1 \mu\text{M}$ PD0325901 (both from Calbiochem)) in the presence of LIF, PlatE and SNL cells¹ were grown in DMEM containing 10% FBS. When indicated, SNL cells were mitotically inactivated by treatment with $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ Mitomycin-C (Sigma-Aldrich) for 2.5 h at 37°C . Wild-type MEFs (homogenous C57BL/6 background) were prepared from E13.5 pooled embryos and cultured in DMEM supplemented with 10% FBS and penicillin/streptomycin. Chloroquine (Sigma-Aldrich) was used as indicated. All cells have been routinely tested for mycoplasma contamination using the Lookout Mycoplasma PCR detection kit (Sigma-Aldrich). The retroviral vectors pMX-Oct4, pMX-Sox2, pMX-Klf4 and pMX-c-Myc¹, pcDNA3.1(+) encoding mouse *Drp1* wild type from Dr David Chan's laboratory and pMXs-IP-EGFP-LC3B (ref. 73) were from Addgene. Flag-tagged *Drp1* was subcloned into pPYCAG-IP by PCR following standard procedures. *Drp1*^{K38A} and *Drp1*^{S579D} cDNA was obtained by site-directed mutagenesis using PCR, followed by DNA sequencing. The cDNAs encoding rat *Dusp6* was a gift from Dr Rafael Pulido. *Drp1*^{WT}, *Drp1*^{K38A}, *Drp1*^{S579D} and *Dusp6* cDNAs were subcloned into pMXIE retroviral vector by PCR using standard procedures. esiRNAs targeting GFP (as negative control) or *Drp1* were from Sigma-Aldrich.

Reprogramming was carried out by transduction of MEFs with retroviruses encoding Oct4, Sox2, Klf4 and c-Myc as previously described¹. Ecotropic retroviruses were produced in PlatE cells transfected using Polyethylenimine (PEI) 'Max' (Mw 40,000) (Polysciences) exactly as described¹. For reprogramming, 8×10^5 MEFs were plated per p100 mm the day before the assay. Next day (day 0), MEFs were incubated overnight with a 1:1:1:1 mixture of mouse Oct4, Sox2, Klf4 and c-Myc retroviral supernatants supplemented with $4 \mu\text{g ml}^{-1}$ Polybrene. Next day, the supernatants were replaced with fresh media and cells were incubated for 3 more days (day 4). Then, 5×10^4 cells were plated on a confluent layer of mitotically inactivated SNL feeders seeded the day before on gelatine-coated p60 mm at 2.5×10^6 cells per dish. Next day (day 5), media was changed to ES cell growth media containing 15% FBS and LIF. Media was changed every other day. When indicated cell reprogramming was conducted in the presence of DMSO (as control), $1 \mu\text{M}$ of the MEK1/2 inhibitor PD0325901 or $50 \mu\text{M}$ of the Drp1 inhibitor Mdiv1 (Millipore). For reprogramming in the presence of esiRNAs, 3×10^4 MEFs in p24 multi-well plates were transfected as before with OSKM. Infected MEFs were then transfected overnight with 0.6 μg of the indicated esiRNAs at days 1 and 3 post infection, using lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies). Reprogramming was assessed 25 days after transduction of MEFs with OSKM-encoding retroviruses by scoring all the alkaline phosphatase positive colonies per p60 mm. Alkaline phosphatase staining was performed according to the manufacturer's instructions (Alkaline Phosphatase Detection Kit, SCR004, Millipore).

For iPSC generation, colonies were handpicked at day 25 of reprogramming, transferred to a 1.5 ml tube containing 50 μl of Trypsin-EDTA solution and incubated for 10 min at 37°C . Then, cells were disaggregated with a pipette by adding 200 μl of ES cell media containing 10% FBS and LIF. Cells were then plated on SNL feeders in p24 multi-well plates (1 clone per well) in ES cell media supplemented with 10% FBS and LIF. When colonies were macroscopically visible, the media was changed to 2i medium with LIF. Surviving clones were further expanded in 2i media with LIF and analysed as indicated. More than 80% of the pluripotent cells per clone were shown to contain 20 chromosomes. Chromosome counting was carried out exactly as described⁷⁴ using DAPI for staining DNA. At least 20 spreads per sample were analysed. Pluripotent cells that passed all the quality tests (Supplementary Fig. 5) were selected and used as described in the text.

Immunofluorescence and flow cytometry. For IF analysis all cells were plated on gelatine-coated coverslips. Cells, untreated or transfected with the indicated viruses, were plated at 1.5×10^4 cells cm^{-2} the day before processing. Then, cells were fixed for 20 min at room temperature with 4% paraformaldehyde in PBS, permeabilized for 10 min with 0.5% Triton X-100 in PBS, blocked for 30 min with blocking buffer (3% Bovine Serum Albumin, BSA, in PBS containing 0.025% Tween-20) and incubated overnight with primary antibodies in blocking buffer. After washing with PBS supplemented with 0.025% Tween-20, cells were incubated for 1 h with the appropriate secondary antibodies in blocking buffer containing $2 \mu\text{g ml}^{-1}$ of DAPI (Invitrogen), washed overnight with PBS, mounted with MOWIOL and analysed using confocal microscopy. Confocal IF images were taken using a Fluoview FV10i confocal microscope equipped with 405-, 488- and 633-nm lasers (Olympus). Three-dimensional reconstructions of z-stacks and colour map representations of the images were performed using FV10-ASW 2.1 viewer software. All images were compiled using Adobe Illustrator CS5.

Colocalization of Tom20 and GFP-LC3B or Tom20 and Drp1 stainings was evaluated by calculating the Pearson Correlation Coefficient (PCC) using the freely available JACoP plug-in (<http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/track/jacop.html>) for ImageJ analysis software, as previously described⁷⁵.

For detection of Filamentous (F)-Actin cells were incubated with Alexa Fluor 488- or Alexa Fluor 555-conjugated Phalloidin (# A12379 or #A22283, respectively; Life technologies; used at 1:50 dilutions).

For mitochondrial mass assessment by flow cytometry, cells were trypsinized and resuspended in media containing $25 \mu\text{g ml}^{-1}$ of the membrane potential-independent mitochondrial dye MitoTracker Green FM (M7514, Life technologies), incubated at room temperature for 10 min and then processed for flow cytometry. All measurements were taken using a BD FACSCanto II or FACS Verse flow cytometers (both from BD Biosciences) and analysed using FlowJo software (Tree Star Inc.). At least 10,000 events from each sample were recorded. Cell sorting was performed exactly as described⁷², using the indicated antibodies. Briefly, cells were trypsinized, filtered through a $30 \mu\text{m}$ cell strainer and counted. Cells were spun down at 250 g for 5 min and resuspended at $10\text{--}20 \times 10^6$ cells per ml in blocking buffer (2% FCS in PBS). A total of 100 μl of the cell suspension ($1\text{--}2 \times 10^6$ cells) was added to round-bottom 5 ml tubes and incubated for 15 min on ice. Then, 100 μl of a $2 \times$ solution containing the primary antibodies in blocking buffer was added to the tubes and incubated on ice for 45 min. Tubes were filled with ice-cold PBS, contents mixed by inverting the tubes and cells spun down at 250 g for 5 min. Cell pellets were then resuspended in 200 μl of a solution containing the secondary antibodies diluted in blocking buffer and incubated for 30 min on ice. Cells were spun down as before, resuspended in 300 μl of blocking buffer containing 1% FBS and kept on ice. Just before sorting, propidium iodide was added to the tubes at $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ final concentration to exclude dead cells. Cell sorting was carried out using a FACS Aria cell sorter (Becton Dickinson) equipped with 407, 488 and 633 nm lasers. Details about the antibodies used in this study for IF and Flow cytometry are provided in Supplementary Tables 1 and 2.

Transmission electron microscopy. Cell monolayers were fixed for 30 min at 4°C in 0.1 M phosphate buffer pH 7.4, containing 2% glutaraldehyde, followed by their postfixation with 1% osmium-1% potassium ferrocyanide mixture in water for 30 min. Samples were then dehydrated with ethanol and propylene oxide and embedded in TAAB resin (T002, Taab Laboratories). Resin blocks were sectioned at $2 \mu\text{m}$ and stained with toluidine blue to identify mesenchymal cells and epithelial-like colonies in the samples. Selected semi-thin sections were then re-embedded and trimmed for ultra-thin sectioning. Ultra-thin sections were stained with lead citrate and examined in a Jeol JEM-1010 electron microscope. All images were further processed using Adobe Photoshop CS6 and compiled using Adobe Illustrator CS5.

Immunoblotting, cell fractionation and immunoprecipitation. Cells were lysed in RIPA buffer (50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 100 mM NaF, 2 mM Na_3VO_4 , 20 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ and $1 \times$ complete proteinase inhibitor cocktail from Roche). Cellular lysates were used for immunoblotting with the indicated antibodies using standard procedures. Signals in western blots were detected using ECL prime (Amersham) and images automatically captured in an ImageQuant LAS 4000 digital imaging system equipped with FUJIFILM F0.85 lenses and a Fujifilm super CCD area type chip (GE). Acquired images were processed using Adobe Photoshop CS6 and analysed with ImageJ software. Details of the antibodies used in this study for WB are provided in Supplementary Tables 1 and 2. Full scans of the blots are shown in Supplementary Fig. 6.

For cell fractionation, MEFs, E14Tg2a or CCE1.19 ES cells stably expressing Flag-Drp1 or GFP (as control) were washed with ice-cold PBS, detached with a cell scraper and resuspended in hypotonic buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.3 M saccharose, 1 mM EDTA and 5 mM DTT) supplemented with protease (Roche) and phosphatase inhibitors (20 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ and 2 mM Na_3VO_4). Samples were then homogenized on ice using a glass Dounce pestle (three times, 30 strokes). Cellular suspension was centrifuged twice at 1,000g, 4°C during 10 min to eliminate nuclei and large cellular ghosts. Supernatant was centrifuged at 13,000g, 4°C for 10 min to precipitate mitochondria, supernatants were considered as the cytoplasmic fractions. Pellets containing mitochondria were subjected to two rounds of washing by resuspending the pellet in 1 ml of ice-cold hypotonic buffer followed by centrifugation at 13,000g, 4°C for 10 min to precipitate mitochondria. Pellets were then resuspended in RIPA buffer as above. Cytoplasmic and mitochondrial fractions were subjected to either immunoblot analysis or immunoprecipitation with anti-Flag antibody covalently bound to magnetic beads (Sigma-Aldrich, M8823, 50 μl of slurry per ml of lysate) during 4 h at 4°C . Beads were washed four times with ice-cold RIPA buffer followed by boiling in $1 \times$ Laemmli sample buffer for 5 min to dissociate the antigens from the beads. Samples were then separated in 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis gels. After electrophoresis, gels were stained with QC Colloidal Coomassie (Bio-Rad) and bands containing Flag-Drp1, identified based on both their migration in the gels and comparison with control wells ran in parallel, were excised, subjected to digestion with trypsin and stored at -80°C until their analysis by mass spectrometry as indicated underneath.

LC-MS/MS. The proteomic analysis was performed in the proteomics facility of SCSIE University of Valencia, which belongs to ProteoRed, PRB2-ISCIII, and is supported by grant PT13/0001. For LC-MS/MS, 5 μl of each sample were loaded onto a trap column (NanoLC Column, $3 \mu\text{m}$ C18-CL, $350 \mu\text{m} \times 0.5 \text{mm}$; Eksigen) and desalted with 0.1% TFA at $3 \mu\text{l min}^{-1}$ during 5 min. The peptides were then loaded onto an analytical column (LC Column, $3 \mu\text{m}$ C18-CL, $75 \mu\text{m} \times 12 \text{cm}$, Nikkyo) equilibrated in 5% acetonitrile 0.1% formic acid (FA). Peptide elution was carried out with a linear 5–35% gradient of B in A for 30 min (A: 0.1% FA; B: ACN, 0.1% FA) at a flow rate of 300 nl per min. Peptides were analysed in a nano ESI qTOF mass spectrometer (6600 TripleTOF, AB Sciex). TripleTOF was operated in information-dependent acquisition mode, in which a 0.26 s TOF MS scan from $350\text{--}1250/mz$ was performed, followed by 0.05 s product ion scans from $100\text{--}1600/mz$ on the 50 most intense 2–5 charged ions. MS/MS information was sent to MASCOT v 2.3.02 or to PARAGON via v 4.5 (AB Sciex). The system sensitivity was controlled with 2 fmol of 6 proteins (LC Packings).

ProteinPilot v4.5. search engine (ABSciex). ProteinPilot default parameters were used to generate peak list directly from 6600 Triple TOFwiff files. The PARAGON algorithm of ProteinPilot v5.0 was used to search Expaty protein database (616,203 sequences; 181,334,896 residues) with the following parameters: trypsin specificity, cys-alkylation, no taxonomy restriction, and the search effort set to 'through'. The special factor: protein phosphorylation was set and biological modifications were searched. To avoid using the same spectral evidence in more than one protein, the identified proteins were grouped based on MS/MS spectra by the Protein-Pilot Progroup algorithm. Thus, proteins sharing MS/MS spectra were grouped, regardless of the peptide sequence assigned. The protein within each group that explained more spectral data with confidence was shown as the primary protein of the group. Only the proteins of the group for which there was individual evidence (unique peptides with enough confidence) were listed, usually towards the end of the protein list.

Nucleic acid purification and quantitative PCR analysis. Total RNA was extracted using TRIzol reagent and cDNA synthesized using SuperScript III reverse transcriptase kit (both from Invitrogen). cDNA products were amplified using and Applied Biosystems StepOne plus Fast Real-Time PCR System. Where indicated, Taqman probes were from Applied Biosystems. Sequences of the primers and Taqman probes used in this study are listed in Supplementary Tables 3 and 4, respectively.

Statistical methods. The Student's *t*-test was used to estimate statistical significance between categories. Relative values (percentages) were normalized using arcsine transformation before carrying out their statistical comparison. Results are presented as mean \pm s.e.m. (standard error of the mean). At least three independent experiments (*n*) were carried out for statistical comparison. In addition, each quantitative PCR experiment (*n*) was carried out in triplicate.

References

- Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663–676 (2006).
- Okita, K., Ichisaka, T. & Yamanaka, S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* **448**, 313–317 (2007).
- Stadtfeld, M. & Hochedlinger, K. Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. *Genes Dev.* **24**, 2239–2263 (2010).
- Plath, K. & Lowry, W. E. Progress in understanding reprogramming to the induced pluripotent state. *Nat. Rev. Genet.* **12**, 253–265 (2011).
- Apostolou, E. & Hochedlinger, K. Chromatin dynamics during cellular reprogramming. *Nature* **502**, 462–471 (2013).
- Chan, D. C. Fusion and fission: interlinked processes critical for mitochondrial health. *Annu. Rev. Genet.* **46**, 265–287 (2012).
- Smirnova, E., Griparic, L., Shurland, D. L. & van der Bliek, A. M. Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell* **12**, 2245–2256 (2001).
- Yoon, Y., Krueger, E. W., Oswald, B. J. & McNiven, M. A. The mitochondrial protein hFis1 regulates mitochondrial fission in mammalian cells through an interaction with the dynamin-like protein DLP1. *Mol. Cell Biol.* **23**, 5409–5420 (2003).
- Lee, Y. J., Jeong, S. Y., Karbowski, M., Smith, C. L. & Youle, R. J. Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in apoptosis. *Mol. Biol. Cell* **15**, 5001–5011 (2004).
- Griffin, E. E., Graumann, J. & Chan, D. C. The WD40 protein Caf4p is a component of the mitochondrial fission machinery and recruits Dnm1p to mitochondria. *J. Cell Biol.* **170**, 237–248 (2005).
- Wells, R. C., Picton, L. K., Williams, S. C., Tan, F. J. & Hill, R. B. Direct binding of the dynamin-like GTPase, Dnm1, to mitochondrial dynamics protein Fis1 is negatively regulated by the Fis1 N-terminal arm. *J. Biol. Chem.* **282**, 33769–33775 (2007).
- Otera, H. *et al.* Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. *J. Cell. Biol.* **191**, 1141–1158 (2010).
- Palmer, C. S. *et al.* MiD49 and MiD51, new components of the mitochondrial fission machinery. *EMBO Rep.* **12**, 565–573 (2011).
- Zhao, J. *et al.* Human MIEF1 recruits Drp1 to mitochondrial outer membranes and promotes mitochondrial fusion rather than fission. *EMBO J.* **30**, 2762–2778 (2011).
- Korobova, F., Ramabhadran, V. & Higgs, H. N. An actin-dependent step in mitochondrial fission mediated by the ER-associated formin INF2. *Science* **339**, 464–467 (2013).
- Friedman, J. R. *et al.* ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science* **334**, 358–362 (2011).
- Mears, J. A. *et al.* Conformational changes in Dnm1 support a contractile mechanism for mitochondrial fission. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18**, 20–26 (2011).
- Otera, H., Ishihara, N. & Mihara, K. New insights into the function and regulation of mitochondrial fission. *Biochim. Biophys. Acta* **1833**, 1256–1268 (2013).
- Taguchi, N., Ishihara, N., Jofuku, A., Oka, T. & Mihara, K. Mitotic phosphorylation of dynamin-related GTPase Drp1 participates in mitochondrial fission. *J. Biol. Chem.* **282**, 11521–11529 (2007).
- Qi, X., Disatnik, M. H., Shen, N., Sobel, R. A. & Mochly-Rosen, D. Aberrant mitochondrial fission in neurons induced by protein kinase C δ under oxidative stress conditions *in vivo*. *Mol. Biol. Cell* **22**, 256–265 (2011).
- Chang, C. R. & Blackstone, C. Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation of Drp1 regulates its GTPase activity and mitochondrial morphology. *J. Biol. Chem.* **282**, 21583–21587 (2007).
- Cribbs, J. T. & Strack, S. Reversible phosphorylation of Drp1 by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcineurin regulates mitochondrial fission and cell death. *EMBO Rep.* **8**, 939–944 (2007).
- Cereghetti, G. M. *et al.* Dephosphorylation by calcineurin regulates translocation of Drp1 to mitochondria. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **105**, 15803–15808 (2008).
- Han, X. J. *et al.* CaM kinase I alpha-induced phosphorylation of Drp1 regulates mitochondrial morphology. *J. Cell. Biol.* **182**, 573–585 (2008).
- Wang, W. *et al.* Mitochondrial fission triggered by hyperglycemia is mediated by ROCK1 activation in podocytes and endothelial cells. *Cell Metab.* **15**, 186–200 (2012).
- Chou, C. H. *et al.* GSK3beta-mediated Drp1 phosphorylation induced elongated mitochondrial morphology against oxidative stress. *PLoS ONE* **7**, e49112 (2012).
- Wikstrom, J. D. *et al.* AMPK regulates ER morphology and function in stressed pancreatic β -cells via phosphorylation of DRP1. *Mol. Endocrinol.* **27**, 1706–1723 (2010).
- Kashatus, J. A. *et al.* Erk2 phosphorylation of Drp1 promotes mitochondrial fission and MAPK-driven tumor growth. *Mol. Cell* **57**, 537–551 (2015).
- Serasinghe, M. N. *et al.* Mitochondrial division is requisite to RAS-induced transformation and targeted by oncogenic MAPK pathway inhibitors. *Mol. Cell.* **57**, 521–536 (2015).
- Caunt, C. J. & Keyse, S. M. Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs): shaping the outcome of MAP kinase signalling. *FEBS J.* **280**, 489–504 (2013).
- Nunes-Xavier, C. E., Martín-Pérez, J., Elson, A. & Pulido, R. Protein tyrosine phosphatases as novel targets in breast cancer therapy. *Biochim. Biophys. Acta* **1836**, 211–226 (2013).
- Folmes, C. D. *et al.* Somatic oxidative bioenergetics transitions into pluripotency-dependent glycolysis to facilitate nuclear reprogramming. *Cell Metab.* **14**, 264–271 (2011).
- Panopoulos, A. D. *et al.* The metabolome of induced pluripotent stem cells reveals metabolic changes occurring in somatic cell reprogramming. *Cell Res.* **22**, 168–177 (2012).
- Xu, X. *et al.* Mitochondrial regulation in pluripotent stem cells. *Cell Metab.* **3**, 325–332 (2013).
- Li, R. *et al.* A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell* **7**, 51–63 (2010).
- Samavarchi-Tehrani, P. *et al.* Functional genomics reveals a BMP-driven mesenchymal-to-epithelial transition in the initiation of somatic cell reprogramming. *Cell Stem Cell* **7**, 64–77 (2010).
- Stadtfeld, M., Maherali, N., Breact, D. T. & Hochedlinger, K. Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse. *Cell Stem Cell.* **2**, 230–240 (2008).
- Polo, J. M. *et al.* A molecular roadmap of reprogramming somatic cells into iPS cells. *Cell* **151**, 1617–1632 (2012).
- Zhang, J., Nuebel, E., Daley, G. Q., Koehler, C. M. & Teitell, M. A. Metabolic regulation in pluripotent stem cells during reprogramming and self-renewal. *Cell Stem Cell* **11**, 589–595 (2012).
- Hagenbuchner, J., Kuznetsov, A. V., Obexer, P. & Ausserlechner, M. J. BIRC5/Survivin enhances aerobic glycolysis and drug resistance by altered regulation of the mitochondrial fusion/fission machinery. *Oncogene* **32**, 4748–4757 (2013).
- Salabei, J. K. & Hill, B. G. Mitochondrial fission induced by platelet-derived growth factor regulates vascular smooth muscle cell bioenergetics and cell proliferation. *Redox Biol.* **1**, 542–551 (2013).
- Guido, C. *et al.* Mitochondrial fission induces glycolytic reprogramming in cancer-associated myofibroblasts, driving stromal lactate production, and early tumor growth. *Oncotarget* **3**, 798–810 (2012).
- Arimendi-Morillo, G. Electron microscopy morphology of the mitochondrial network in human cancer. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41**, 2062–2068 (2009).
- Chen, K. H. *et al.* Role of mitofusin 2 (Mfn2) in controlling cellular proliferation. *FASEB J.* **28**, 382–394 (2014).
- Inoue-Yamauchi, A. & Oda, H. Depletion of mitochondrial fission factor DRP1 causes increased apoptosis in human colon cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **421**, 81–85 (2012).
- Rehman, J. *et al.* Inhibition of mitochondrial fission prevents cell cycle progression in lung cancer. *FASEB J* **26**, 2175–2186 (2012).
- Qian, W. *et al.* Mitochondrial hyperfusion induced by loss of the fission protein Drp1 causes ATM-dependent G2/M arrest and aneuploidy through DNA replication stress. *J. Cell Sci.* **125**, 5745–5757 (2012).
- Zhang, G. E. *et al.* Anti-tumor effects of mfn2 in gastric cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 13005–13021 (2013).
- Zhao, J. *et al.* Mitochondrial dynamics regulates migration and invasion of breast cancer cells. *Oncogene* **32**, 4814–4824 (2013).
- Wang, S. *et al.* Transient activation of autophagy via Sox2-mediated suppression of mTOR is an important early step in reprogramming to pluripotency. *Cell Stem Cell* **13**, 617–625 (2013).
- Wu, Y. *et al.* Autophagy and mTORC1 regulate the stochastic phase of somatic cell reprogramming. *Nat. Cell Biol.* **17**, 715–725 (2015).

52. Ma, T. *et al.* Atg5-independent autophagy regulates mitochondrial clearance and is essential for iPSC reprogramming. *Nat. Cell Biol.* **17**, 1379–1387 (2015).
53. Wang, L. *et al.* Drp1 is dispensable for mitochondria biogenesis in induction to pluripotency but required for differentiation of embryonic stem cells. *Stem Cells Dev.* **23**, 2422–2434 (2014).
54. Vazquez-Martin, A. *et al.* Mitochondrial fusion by pharmacological manipulation impedes somatic cell reprogramming to pluripotency: new insight into the role of mitophagy in cell stemness. *Aging* **4**, 393–401 (2012).
55. Son, M. Y., Choi, H., Han, Y. M. & Cho, Y. S. Unveiling the critical role of REX1 in the regulation of human stem cell pluripotency. *Stem Cells* **31**, 2374–2387 (2013).
56. Buehr, M. *et al.* Capture of authentic embryonic stem cells from rat blastocysts. *Cell* **135**, 1287–1298 (2008).
57. Li, P. *et al.* Germline competent embryonic stem cells derived from rat blastocysts. *Cell* **135**, 1299–1310 (2008).
58. Ying, Q. L. *et al.* The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* **453**, 519–523 (2008).
59. Silva, J. *et al.* Promotion of reprogramming to ground state pluripotency by signal inhibition. *PLoS Biol.* **6**, e253 (2008).
60. Kunath, T. *et al.* FGF stimulation of the Erk1/2 signalling cascade triggers transition of pluripotent embryonic stem cells from self-renewal to lineage commitment. *Development* **134**, 2895–2902 (2007).
61. Tee, W. W., Shen, S. S., Oksuz, O., Narendra, V. & Reinberg, D. Erk1/2 activity promotes chromatin features and RNAPII phosphorylation at developmental promoters in mouse ESCs. *Cell* **156**, 678–690 (2014).
62. Ischenko, I., Zhi, J., Moll, U. M., Nemajerova, A. & Petrenko, O. Direct reprogramming by oncogenic Ras and Myc. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **110**, 3937–3942 (2013).
63. Soufi, A., Donahue, G. & Zaret, K. S. Facilitators and impediments of the pluripotency reprogramming factors' initial engagement with the genome. *Cell* **151**, 994–1004 (2012).
64. Hirsch, C. L. *et al.* Myc and SAGA rewire an alternative splicing network during early somatic cell reprogramming. *Genes Dev.* **29**, 803–816 (2015).
65. Chappell, J., Sun, Y., Singh, A. & Dalton, S. MYC/MAX control ERK signaling and pluripotency by regulation of dual-specificity phosphatases 2 and 7. *Genes Dev.* **27**, 725–733 (2013).
66. Abujarour, R., Efe, J. & Ding, S. Genome-wide gain-of-function screen identifies novel regulators of pluripotency. *Stem Cells* **28**, 1487–1497 (2010).
67. Buganim, Y., Faddah, D. A. & Jaenisch, R. Mechanisms and models of somatic cell reprogramming. *Nat. Rev. Genet.* **14**, 427–439 (2013).
68. Guo, S. *et al.* Nonstochastic reprogramming from a privileged somatic cell state. *Cell* **156**, 649–662 (2014).
69. Ohnishi, K. *et al.* Premature termination of reprogramming in vivo leads to cancer development through altered epigenetic regulation. *Cell* **156**, 663–677 (2014).
70. Hochedlinger, K., Yamada, Y., Beard, C. & Jaenisch, R. Ectopic expression of Oct-4 blocks progenitor-cell differentiation and causes dysplasia in epithelial tissues. *Cell* **121**, 465–477 (2005).
71. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
72. Torres, J. & Watt, F. M. Nanog maintains pluripotency of mouse embryonic stem cells by inhibiting NFkappaB and cooperating with Stat3. *Nat. Cell Biol.* **10**, 194–201 (2008).
73. Hara, T. *et al.* FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells. *J. Cell Biol.* **181**, 497–510 (2008).
74. Robertson, E. J. *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: a Practical Approach* 71–112 (IRL Press, 1987).
75. Bolte, S. & Cordelières, F. P. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J. Microsc.* **224**, 213–232 (2006).

Acknowledgements

We are indebted to Dr Lisa M. Sevilla for critical reading of the manuscript. We thank Dr Rafael Pulido, Dr Austin G. Smith, Dr Mark Gassmann, Dr Jecta Garcia-Palmer and Dr Salvador Aznar-Benitah for sharing reagents. J.P. was funded by a predoctoral fellowship from Generalitat Valenciana Val+d. This study was supported by the Instituto de Salud Carlos III and FEDER funds 'Una manera de hacer Europa', grant PI12/00638 to J.T.

Author contributions

All of the authors designed and discussed the experiments. J.P. conducted most of the experimental work. M.L., R.S. and R.B. prepared MEFs and helped with the reprogramming experiments. X.P. and C.L.-G. carried out the TEM analysis. A.R. and R.F.-L. helped with the characterization of iPS cell clones. J.P. and J.T. conceived the project. J.T. supervised the experiments, provided the funding and wrote the manuscript.

Additional information

Supplementary Information accompanies this paper at <http://www.nature.com/naturecommunications>

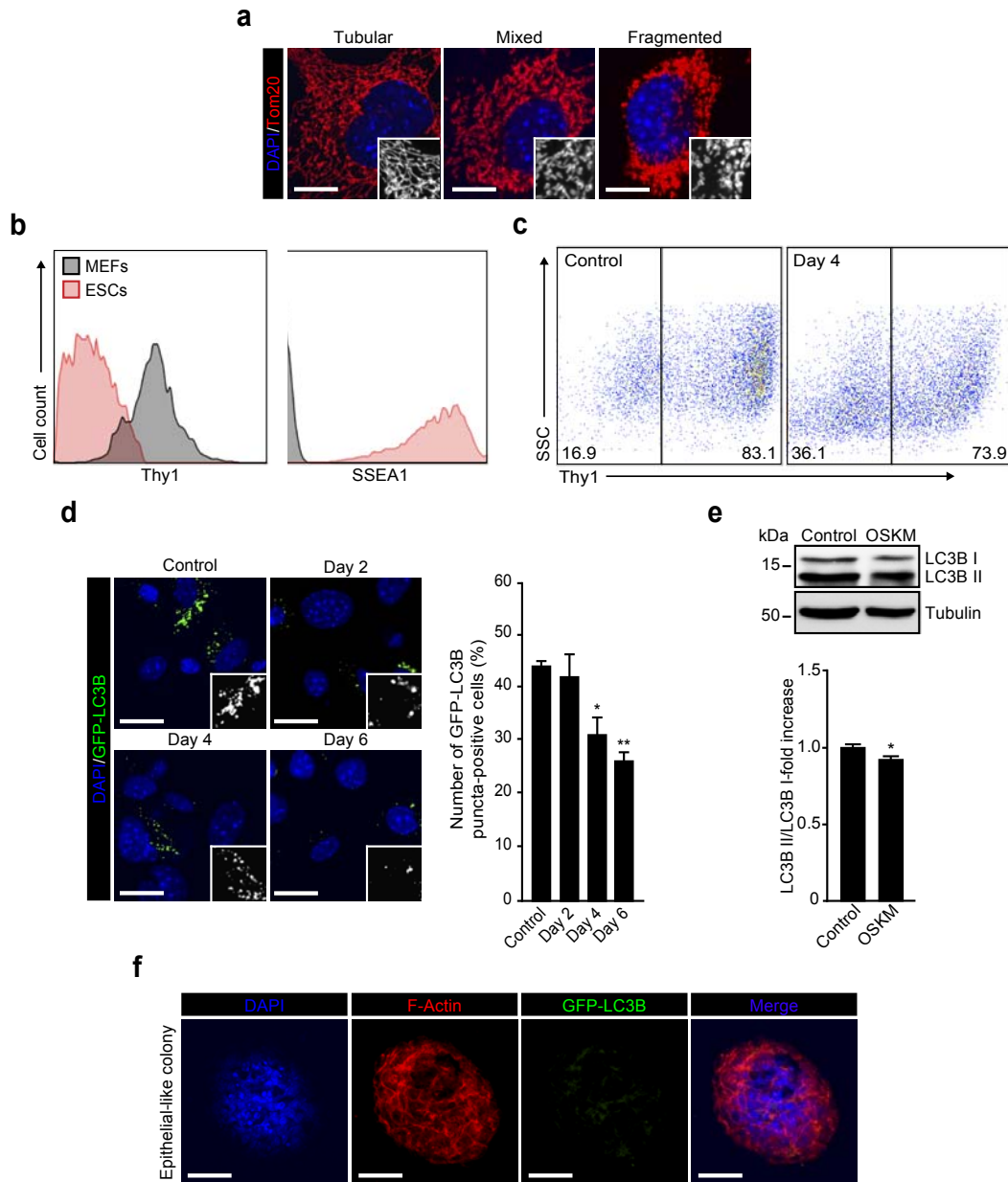
Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

Reprints and permission information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

How to cite this article: Prieto, J. *et al.* Early ERK1/2 activation promotes DRP1-dependent mitochondrial fission necessary for cell reprogramming. *Nat. Commun.* **7**:11124 doi: 10.1038/ncomms11124 (2016).

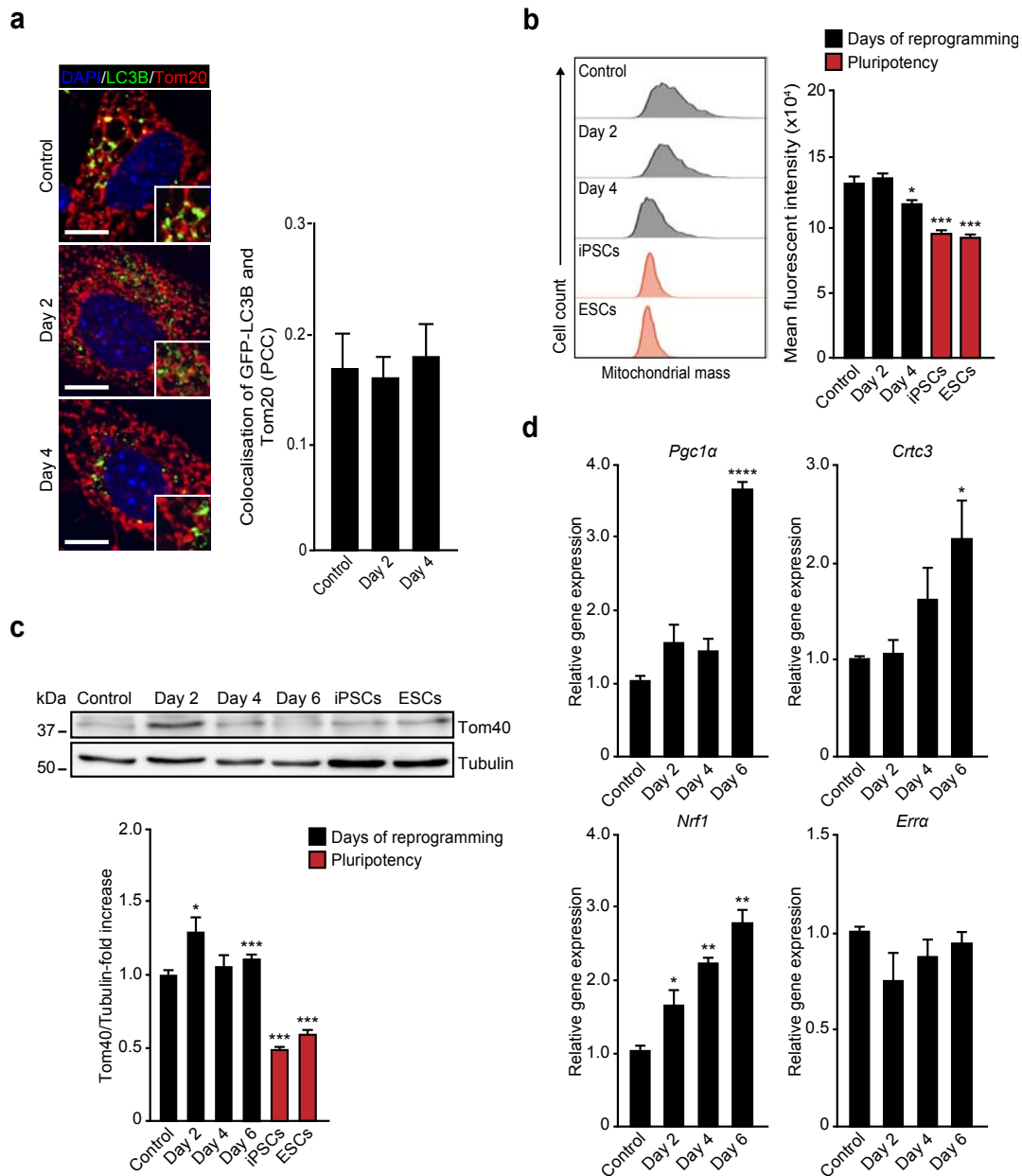


This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



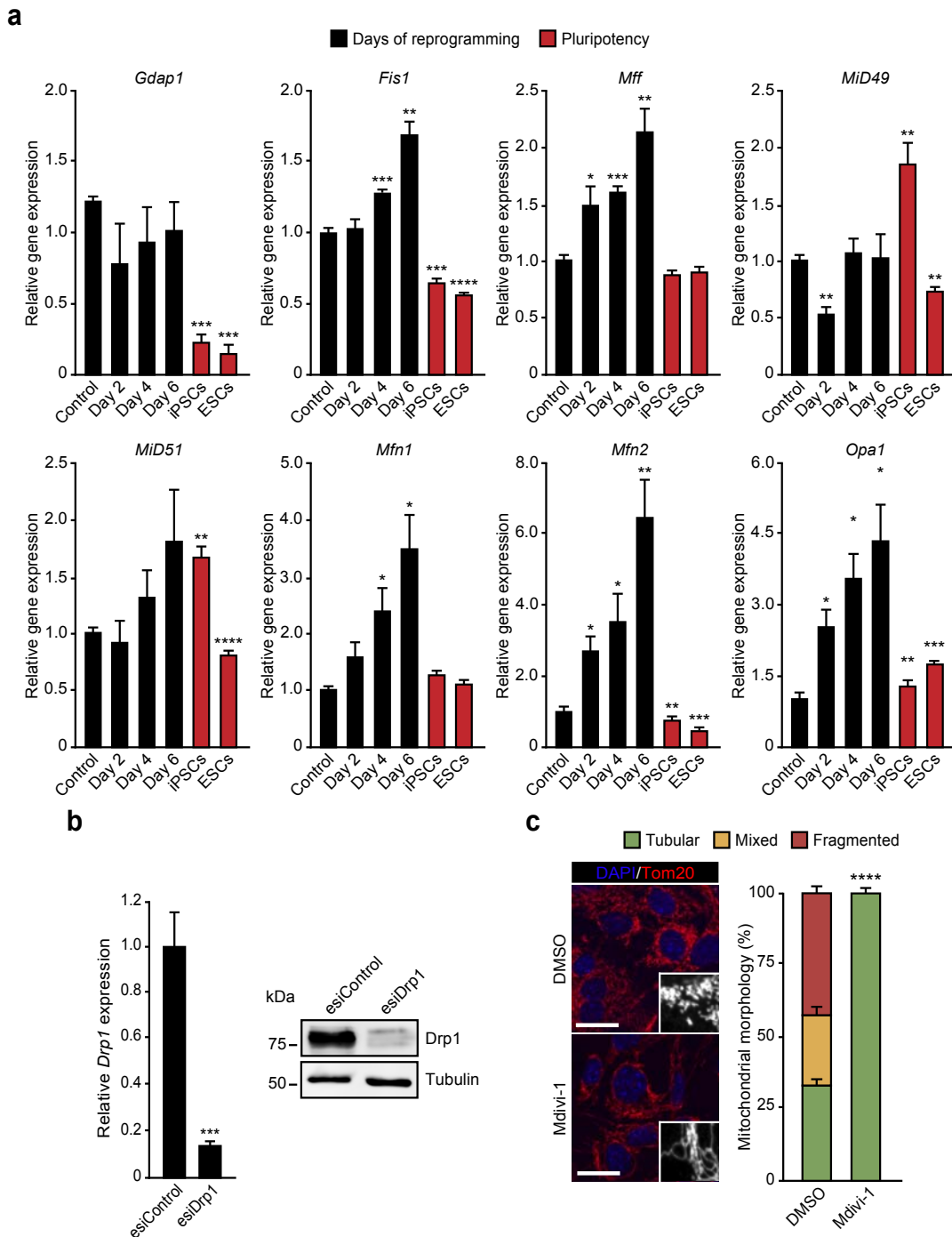
Supplementary Figure 1. Epithelial-like colonies are negative for autophagic markers. (a) Representative confocal images of wild type MEFs stained with anti-Tom20 antibody (red) illustrating the different mitochondrial morphologies observed in the cultures. Insets show a black and white magnification of the pictures. DAPI (blue) was used as a nuclear counterstaining. Scale bar, 12 μ m. (b) Histograms showing the expression of the indicated markers in MEFs (gray) or ES cells (ESCs, red) assessed by flow cytometry. (c) Dot plots showing the expression of Thy1 in MEFs before (Control) or 4 days after OSKM expression. Percentages of the Thy1-negative and -positive are shown at the bottom of the dot plots. SSC, Side Scatter. (d) GFP-LC3B-expressing MEFs were mock- or OSKM-infected. At the

indicated days cells were treated during 4 hours with 50 μ M Chloroquine and then processed for IF. Representative confocal images on the left show cells positive for GFP-LC3B puncta (green). Insets show a black and white magnification of the pictures. DAPI (blue) was used as a nuclear counterstaining. Scale bars, 24 μ m. Graph on the right shows the quantification of cells positive for GFP-LC3B puncta before or at the indicated days after OSKM expression (n = 3). (e) Lysates of MEFs control or OSKM-infected were analysed by immunoblotting using the indicated antibodies. Graph on the right shows the quantification of the data (n = 3). (f) GFP-LC3B-expressing MEFs were mock- or OSKM-infected and eight days post-infection cells were treated during 4 hours with 50 μ M Chloroquine and then processed for immunofluorescence with Alexa Fluor 555-Phalloidin (red). Representative confocal images of an epithelial-like colony showing the absence of GFP-LC3B puncta. DAPI (blue) was used as a nuclear counterstaining. Scale bar, 40 μ m. Data are represented as mean \pm s.e.m., and one-tailed unpaired Student's t-test was used to compare data sets (* P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001; **** P < 0.0001).



Supplementary Figure 2. Mitochondrial fission is not associated with mitophagy. (a) Representative confocal images of MEFs transduced and treated as in Supplementary Fig. 1d that were subjected to immunofluorescence analysis using anti-Tom20 antibody (red) for labelling mitochondria. Insets show a magnification of the pictures. DAPI (blue) was used as a nuclear counterstaining. Scale bars, 12 μ m. Graph on the right shows the colocalisation of GFP-LC3B with Tom20 assessed by the Pearson correlation coefficient (PCC) of both stainings in the cells before (Control) or at the indicated days after OSKM expression (n = 3). (b) Representative flow cytometry histograms of MEFs stained with mitochondrial membrane potential-independent Mitotracker Green FM for assessing mitochondrial mass before (Control) or at the indicated days after transduction

with OSKM-encoding retroviruses. Pluripotent iPS and ES cells are showed as controls. Right graph shows the quantification of the Mean Fluorescence Intensity of the histograms shown in the left (n = 3). (c) Cells were treated as in (b) and total lysates subjected to immunoblotting analysis using the indicated antibodies to assess mitochondrial mass. Graph on the bottom shows the quantification of the data (n = 3). (d) Total RNA was extracted from mock-infected (control) or OSKM-infected wild type MEFs for the indicated days. The expression of the indicated genes implicated in mitochondrial biogenesis was then assessed by qPCR and represented as relative gene expression normalised to control MEFs (n = 3). Data are represented as mean \pm s.e.m., and one-tailed unpaired Student's t-test was used to compare data sets (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$).



Supplementary Figure 3. Expression of mitochondrial dynamics regulatory factors. (a) Total RNA was extracted from mock- (Control) or OSKM-infected wild type MEFs for four days (black bars), or from the indicated pluripotent cells (red bars). The expression of the indicated genes was then assessed by qPCR and represented as relative gene expression normalised to control MEFs (n = 3). (b) Graph on the left shows the expression of *Drp1* assessed by qPCR in MEFs four days after being transduced with the OSKM factors in presence of esiRNAs

targeting GFP as control (esiControl) or mouse *Drp1* (esiDrp1) (n = 3). Panels on the right show the assessment of Drp1 and Tubulin proteins expression by immunoblotting using specific antibodies in cells treated as before. (c) Representative confocal images of MEFs expressing the reprogramming factors during four days in the presence of Mdivi-1 (50 μ M) and stained with anti-Tom20 antibody (red) to assess the indicated mitochondrial morphologies. Insets show a black and white magnification of the pictures. DAPI (blue) was used as a nuclear counterstaining. Scale bars, 24 μ m. Graphs on the right show the quantification of the indicated mitochondrial morphologies observed in cells treated as above (n = 3). Data are represented as mean \pm s.e.m., and one-tailed unpaired Student's t-test was used to compare data sets (* P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001; **** P < 0.0001).

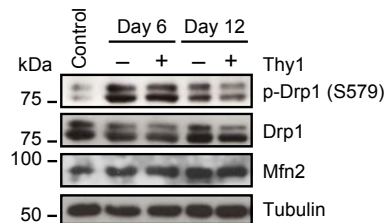
Prieto et al., Supplementary Figure 4

a

Protein identification					
Fraction	Identified protein	Unused	%Cov	%Cov(95)	N° Peptides (95%)
Cytosolic	Dynamin-1-like protein (DNM1L)	405,6	97,8299975	86,8200	823
Mitochondrial	Dynamin-1-like protein (DNM1L)	105,39	81,129998	72,1000	115

Peptide modifications				
Fraction	Modified residue	Sequence	Confidence	dMass
Mitochondrial	pSer579	SKPIPI S PIMPAS P QK	99,00	0,00369
Cytosolic	pSer330, pThr338	DDK S SATLLQLIT T KFATEYCN T IEGTAK	97,94	0,00737
Cytosolic	pSer647	DTLQ S ELVGLYK S SLDDLLTESE D MAQR	90,21	0,05967
Cytosolic	pSer175	FIS N PNSIILAVTAANTDMATSEALK	99,00	0,03330
Cytosolic	pSer136	GVSPEIHLKIF S PNVVNLTLVDLPGMTK	99,00	0,03157
Cytosolic	pSer450	I I QHCSNYSTQELLR	99,00	0,02359
Cytosolic	pThr479	LPV T NEMVHNLVAIELAYINTK	99,00	0,03727
Cytosolic	pSer71, pThr78	QLVHV S QEDK R TTGEENGVEAE E WGK	99,00	-0,01278
Cytosolic	pSer175	RFIS N PNSIILAVTAANTDMATSEALK	99,00	0,03811
Cytosolic	pSer71	RPLILQLVHV S QEDK	99,00	0,00315
Cytosolic	pSer579	SKPIPI S PIMPAS P QKGHAVNLLDVPV P VAR	99,00	0,00072
Cytosolic	pSer579	SKPIPI S PIMPAS P QK	99,00	0,00696
Cytosolic	pSer136	SPEIHLKIF S PNVVNLTLVDLPGMTK	99,00	0,05696
Cytosolic	pSer656	S SLDDLLTESE D MAQR	99,00	0,03261
Cytosolic	pSer616	S YFLIVR	99,00	0,01953
Cytosolic	pSer656, pSer657	VGQLYK S SLDDLLTESE D MAQR	97,38	0,07306

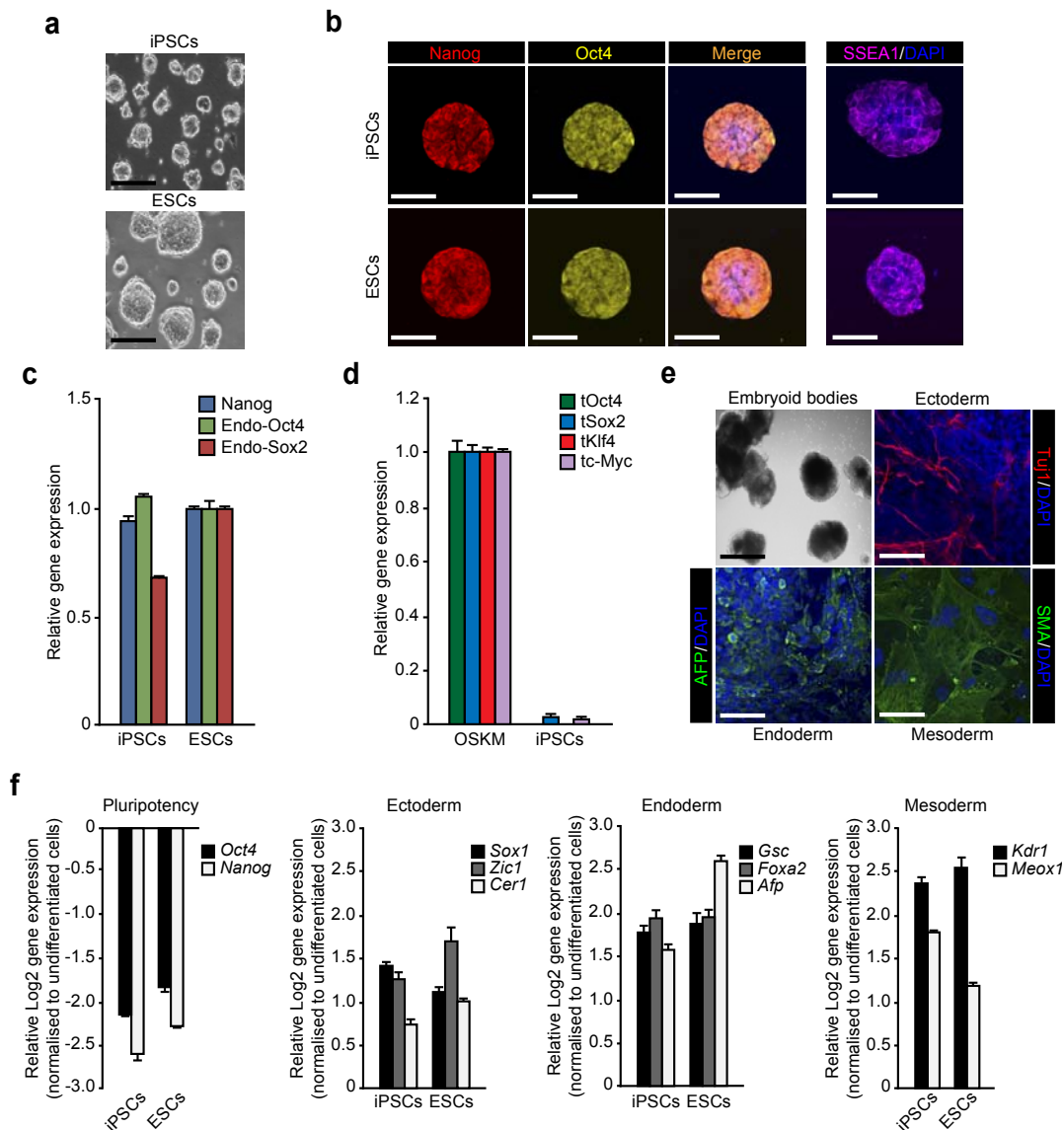
b



Supplementary Figure 4. Drp1 post-translational modifications in ES cells.

(a) Summary of the phosphorylated residues found in cytosolic or mitochondria-associated Drp1 in ES cells by LC-MS/MS. Upper table shows the protein identification in both fractions sorted by Unused ProtScore. Unused, assessment of the protein confidence parameter for the indicated protein, calculated from the peptide confidence for peptides from the spectra that were not completely “used” already by the higher scoring-winning proteins; %Cov (coverage), percentage of matching amino acids from identified peptides, which showed a confidence greater than 0, divided by the total number of amino acids in the sequence; %Cov(95%), the percentage of matching amino acids from identified proteins that showed a

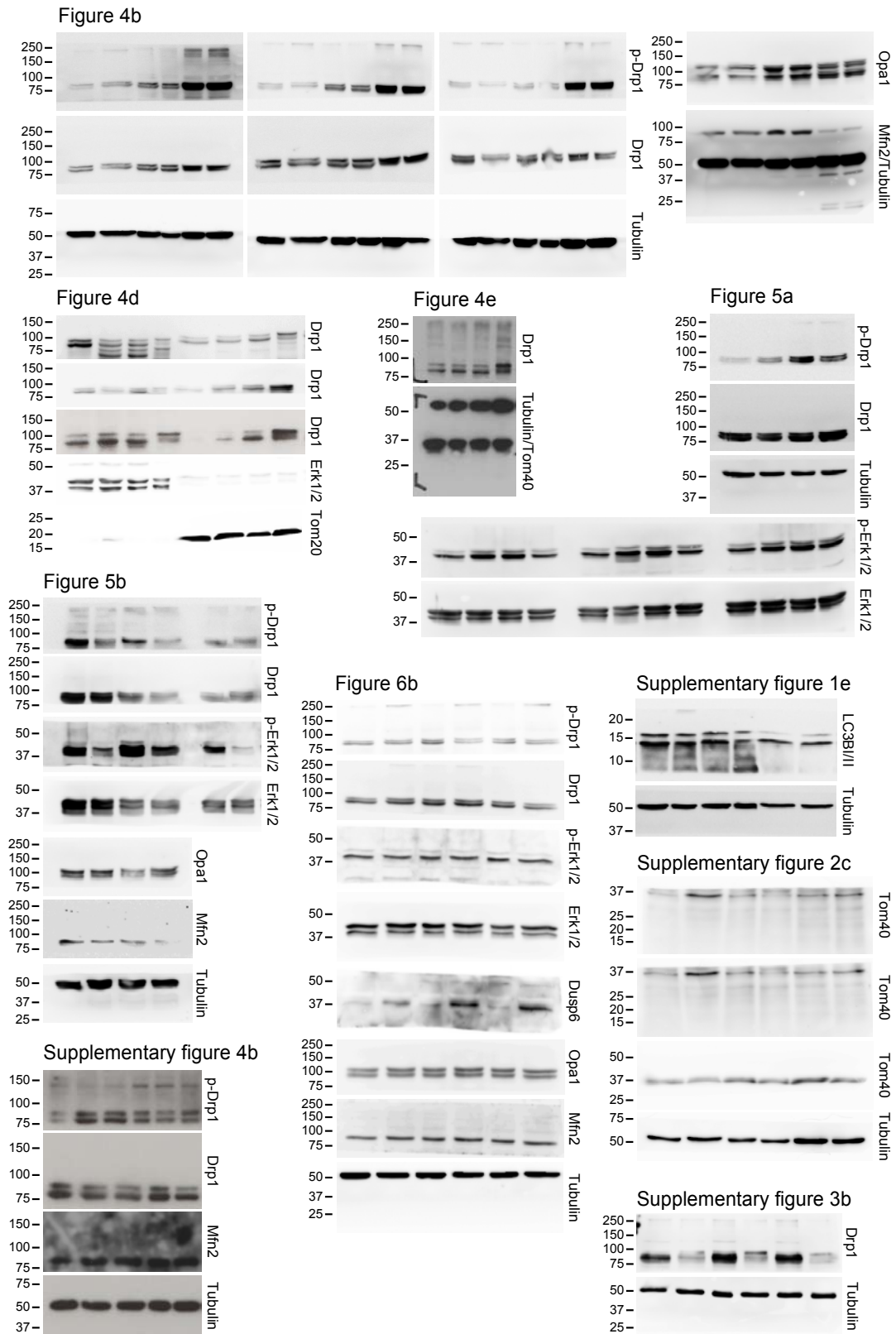
confidence $\geq 95\%$, divided by the total number of amino acids in the sequence. Lower table shows the details of the identified peptides in both subcellular fractions. Confidence, the confidence for the peptide identification, expressed as percentage; dMass, the mass difference between molecular weight of the precursor and the theoretical molecular weight of the matching peptide sequence. **(b)** MEFs were transduced, sorted as in Figure 2b into Thy1-positive and -negative cell populations at day 4 post-transduction and cultured in iPS cell medium. At the indicated days, total lysates from the different cell populations were subjected to immunoblotting analysis using the indicated antibodies. A representative immunoblot out of two independent experiments is shown.



Supplementary Figure 5. Molecular and functional characterisation of wild type iPS cells. (a) A representative iPS cell clone (iPSCs) or the E14Tg2a ES cell line (ESCs) were photographed. Scale bar, 130 μ m. (b) Pluripotent cells were subjected to IF staining with the indicated antibodies, using DAPI (blue) as a nuclear counterstaining. Scale bar, 30 μ m. IF images show different fields compared with phase pictures. (c, d) Total RNA was extracted from the indicated pluripotent cells and expression of (c) pluripotency markers or (d) exogenous OSKM cDNAs was assessed by qPCR and represented as relative gene expression normalised to undifferentiated ES cells in (c) or OSKM-infected cells (OSKM) in (d). (e) iPS cell clone was subjected to EB differentiation and photographed 7 days after (top panel). Scale bar, 500 μ m. EBs were then seeded and 2 days later cells were subjected to IF with the indicated antibodies, using DAPI (blue) as a nuclear counterstaining (lower panels). Scale bar, 40 μ m. (f) Total RNA was extracted from 7 days old EBs and the expression of pluripotency, ectoderm, endoderm or

mesoderm markers was assessed by qPCR and represented as relative gene expression normalised to undifferentiated ES cells. Data are represented as mean \pm s.e.m. (n = 3).

Prieto et al., Supplementary Figure 6



Supplementary Figure 6. Uncropped blots.

SUPPLEMENTARY TABLES

Prieto et al., Supplementary Table 1

Antigen	Host	Company	Reference	Dilution and applications
Alpha-fetoprotein	Rabbit	Abcam	ab46799	1:100 (IF)
α -Tubulin	Mouse	SCBT	sc-32293	1:5000 (WB)
β III-Tubulin (Tuj1)	Rabbit	Covance	MRB-435P	1:1000 (IF)
Drp1	Rabbit	CST	#8570	1:1000 (WB); 1/50 (IF)
p-Drp1 (Ser616)	Rabbit	CST	#3455	1:1000 (WB)
Erk1/2	Rabbit	CST	#9102	1:1000 (WB)
p-Erk1/2	Mouse	CST	#9106	1:2000 (WB)
Dusp6	Rabbit	Dr. R. Pulido Lab	in-house	1:1000 (WB)
LC3B	Rabbit	CST	#2775	1:1000 (WB)
Mfn2	Rabbit	Sigma-Aldrich	AV42420	1:1000 (WB)
Nanog	Rabbit	Cosmo Bio Co.	RCAB0001P	1:100 (IF); 1:1000 (WB)
Oct4	Mouse	SCBT	sc-5279	1:50 (IF)
Opa1	Mouse	BD	# 612606	1:1000 (WB)
Smooth Muscle Actin	Mouse	Abcam	ab7817	1:100 (IF)
SSEA1	Mouse	SCBT	sc-21702	1:10 (IF and FC)
Tom-20	Rabbit	SCBT	sc-11415	1:50 (IF); 1:500 (WB)
Tom-40	Mouse	SCBT	sc-365467	1:500 (WB)
Thy1 (CD90.2)	Rat	eBioescience	14-0903-81	1:400 (IF, FC)
Rat IgG2b K Isotype Control	Rat	eBioescience	16-4031-81	1:400 (FC)

Supplementary Table 1. Primary antibodies used in this study. SCBT, Santa Cruz Biotechnology; CST, Cell Signaling Technologies; BD, BD Biosciences; IF, immunofluorescence; FC, flow cytometry; WB, western blot.

Prieto et al., Supplementary Table 2

Target	Host	Conjugate	Company	References	Dilution and applications
Mouse IgG	Donkey	AF@488	TF	A-21202	1:1000 (IF)
Mouse IgG	Donkey	AF@555	TF	A-31570	1:1000 (IF)
Mouse IgG	Donkey	AF@647	TF	A-31571	1:1000 (IF)
Mouse IgM	Donkey	AF@555	TF	A-21426	1:1000 (IF)
Rabbit IgG	Donkey	AF@488	TF	A-21206	1:1000 (IF)
Rabbit IgG	Donkey	AF@555	TF	A-31572	1:1000 (IF)
Rabbit IgG	Donkey	AF@647	TF	A-31573	1:1000 (IF)
Rat IgG	Donkey	AF@488	TF	A-11006	1:1000 (IF, FC)
Mouse IgG	Goat	HRP	TF	31432	1:5000 (WB)
Rabbit IgG	Goat	HRP	TF	31460	1:5000 (WB)

Supplementary Table 2. Secondary antibodies used in this study. TF, Thermo Fisher Scientific; SCBT, Santa Cruz Biotechnologies; AF@, AlexaFluor®; HRP, horseradish peroxidase; IF, immunofluorescence; WB, western blot; FC, flow cytometry.

Prieto et al., Supplementary Table 3

Gene	Forward primer (5' to 3')	Reverse primer (5' to 3')
<i>Crtc3</i>	TGACTCACCTGGGGATAAGAAC	GTGGCACTTGAGGGACGAG
<i>Drp1</i>	CAGGAATTGTTACGGTTCCTAA	CCTGAATTAAGTGTCCCGTGA
<i>Dusp6</i>	ATGATGAGGTCTTCAGTCTC	CAAAATACCCCTTGAGACAC
<i>Errα</i>	TTCGGCGACTGCAAGCTC	CACAGCCTCAGCATCTTCAATG
<i>Fis1</i>	TGTCCAAGAGCACGCAATTTG	CCTCGCACATACTTTAGAGCCTT
<i>Gapdh</i>	GCACAGTCAAGGCCGAGAAT	GCCTTCTCCATGGTGGTGAA
<i>Gdap1</i>	TCCTTCAGCTCTCAAAAGGTGC	GCGCATAAACCAAGGCTCATT
<i>Mff</i>	ATGCCAGTGTGATAATGCAAGT	CTCGGCTCTCTCGCTTTG
<i>Mid49</i>	AGCCCACGCCATTCATTC	TGGAGCCCGTCGTAGAGAG
<i>Mid51</i>	GGTGAGCGCAAAGGGAAGA	AATGCCCAACATAGCTGCTCC
<i>Mfn1</i>	ATGGCAGAAACGGTATCTCCA	CTCGGATGCTATTCGATCAAGTT
<i>Mfn2</i>	TGACCTGAATTGTGACAAGCTG	AGACTGACTGCCGTATCTGGT
<i>Nrf1</i>	CCACATTACAGGGCGGTGAA	AGTGGCTCCCTGTTGCATCT
<i>Opa1</i>	ACAGCAAATTCAGAGCACGA	TTGCGCTTCTGTTGGGCAT
<i>Pgc1α</i>	CGGAAATCATATCCAACCAG	TGAGGACCGCTAGCAAGTTTG

Supplementary Table 3. Oligonucleotides used in this study.

Prieto et al., Supplementary Table 4

Gene	Catalogue no./Sequence	Assay
<i>Afp</i>	Mm00431715_m1	TaqMan gene expression assay
<i>Cer1</i>	Mm03024044_m1	TaqMan gene expression assay
<i>Foxa2</i>	Mm00839704_mH	TaqMan gene expression assay
<i>Gapdh</i>	Mm99999915_g1	TaqMan gene expression assay
<i>Gsc</i>	Mm00650681_g1	TaqMan gene expression assay
<i>Kdr1</i>	Mm01222421_m1	TaqMan gene expression assay
<i>Meox1</i>	Mm00440285_m1	TaqMan gene expression assay
<i>Nanog</i>	Mm02384862_g1	TaqMan gene expression assay
<i>Oct4</i>	Mm00658129_gH	TaqMan gene expression assay
<i>Sox1</i>	Mm00486299_s1	TaqMan gene expression assay
<i>Sox2</i>	Mm03053810_S1	TaqMan gene expression assay
<i>Zic1</i>	Mm00656094_m1	TaqMan gene expression assay
tOct4-F	TGGTACGGGAAATCACAAGTTTGTA	Custom TaqMan gene expression assay for retroviral transgene ¹
tOct4-R	GGTGAGAAGCGAAGTCTGAAG	
tOct4-probe	FAM-CACCTTCCCATGGCTG-MGB	
tSox2-F	TGGTACGGGAAATCACAAGTTTGTA	Custom TaqMan gene expression assay for retroviral transgene ¹
tSox2-R	GCCCGGCGGCTTCA	
tSox2-probe	FAM-CTCCGTCTCCATCATGTTAT-MGB	
tKlf4-F	TGGTACGGGAAATCACAAGTTTGTA	Custom TaqMan gene expression assay for retroviral transgene ¹
tKlf4-R	GAGCAGAGCGTCGCTGA	
tKlf4-probe	FAM-CCCCTTACCATGGCTG-MGB	
tc-Myc-F	TGGTACGGGAAATCACAAGTTTGTA	Custom TaqMan gene expression assay for retroviral transgene ¹
tc-Myc-R	GGTCATAGTTCCTGTTGGTGAAGTT	
tc-Myc-probe	FAM-CCCTTACCATGCCCC-MGB	

Supplementary Table 4. Taqman probes used in this study. F, forward primer; R, reverse primer; probe, FAM-labelled fluorogenic probe designed for each transgene¹. t-*geneX*, reprogramming factor cloned in pMX retroviral vector.

SUPPLEMENTARY REFERENCES

1. Theunissen T.W. *et al.* Nanog overcomes reprogramming barriers and induces pluripotency in minimal conditions. *Curr. Biol.* **21**, 65-71 (2011).

REPORT

Dysfunctional mitochondrial fission impairs cell reprogramming

Javier Prieto^{a,#}, Marian León^{a,#}, Xavier Ponsoda^a, Francisco García-García^{b,c}, Roque Bort^d, Eva Serna^e,
Manuela Barneo-Muñoz^{c,f}, Francesc Palau^{c,f}, Joaquín Dopazo^{b,c}, Carlos López-García^a, and Josema Torres^a

^aDepartment of Biología Celular, Biología Funcional y Antropología Física, Universitat de València, Burjassot, Spain; ^bComputational Genomics Department, Centro de Investigación Príncipe Felipe, Valencia, Spain; ^cCIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), ISCIII, Valencia, Spain; ^dUnidad de Hepatología Experimental, CIBEREHD, IIS La Fe., Valencia, Spain; ^eUnidad Central de Investigación-INCLIVA, Universidad de Valencia, Valencia, Spain; ^fInstitut de Recerca Pediàtrica Hospital San Joan de Déu, Barcelona, Spain

ABSTRACT

We have recently shown that mitochondrial fission is induced early in reprogramming in a Drp1-dependent manner; however, the identity of the factors controlling Drp1 recruitment to mitochondria was unexplored. To investigate this, we used a panel of RNAi targeting factors involved in the regulation of mitochondrial dynamics and we observed that MiD51, Gdap1 and, to a lesser extent, Mff were found to play key roles in this process. Cells derived from Gdap1-null mice were used to further explore the role of this factor in cell reprogramming. Microarray data revealed a prominent down-regulation of cell cycle pathways in Gdap1-null cells early in reprogramming and cell cycle profiling uncovered a G2/M growth arrest in Gdap1-null cells undergoing reprogramming. High-Content analysis showed that this growth arrest was DNA damage-independent. We propose that lack of efficient mitochondrial fission impairs cell reprogramming by interfering with cell cycle progression in a DNA damage-independent manner.

ARTICLE HISTORY

Received 16 August 2016
Revised 9 September 2016
Accepted 22 September 2016

KEYWORDS

cell reprogramming; Gdap1; iPS cells; mitochondrial fission; pluripotency



Introduction

Mitochondria join by fusion and divide by fission. The balance between mitochondrial fission and fusion determines the shape and function of these organelles. Given the importance of mitochondria for cell homeostasis, these 2 processes play an active role in the regulation of cell growth, survival and cell death. Importantly, mutations in genes encoding for proteins controlling mitochondrial fusion and fission have been linked to a wide range of human diseases, underscoring the importance of understanding the regulation of mitochondrial dynamics in different biological processes.^{1–6}

Mitofusin-1 and -2 (Mfn1 and Mfn2) and Optic atrophy 1 (Opa1) proteins located in the outer and inner mitochondrial membranes, respectively, are known to mediate the fusion of this organelle. The Dynamin related protein-1, Drp1 is a key factor which mediates mitochondrial fission.^{7–11} Mitochondrial fission starts with the formation of an initial constriction in the mitochondria at contact sites with the endoplasmic reticulum.^{12,13} Activated Drp1 is then recruited to the constricted mitochondrial membrane, forming a ring that eventually fragments mitochondria in a GTPase-dependent manner.^{2,6} Recruitment of activated Drp1 to the mitochondrial surface is mediated by accessory proteins located at the external membrane of these organelles and include Mitochondrial fission factor, Mff,^{14,15} Mitochondrial fission protein 1, Fis1^{15,16} and Mitochondrial elongation factor 1 and 2, Mief1/MiD45 and


Mief2/MiD51,^{15,17,18} respectively, though the exact details of the interplay between activated Drp1 and the different factors on the mitochondrial surface are not completely known. The *GDAP1* gene (MIM #606598) is linked to Charcot-Marie-Tooth disease¹⁹ and has been shown to play a role in regulating mitochondrial dynamics in human.²⁰ Although the mechanisms whereby *GDAP1* participates in the regulation of mitochondrial dynamics are not fully understood, its overexpression led to the fragmentation of the mitochondrial network in human cells whereas knockdown of *GDAP1* enhanced the tubular aspect of these organelles in mammalian^{21–23} and insect²⁴ cells.

Somatic cells from mouse or human origin can be reprogrammed to induced-Pluripotent Stem (iPS) cells by forced expression of *Oct4* (also known as *Pou5f1*), *Klf4*, *Sox2* and *cMyc*^{25–27} (named as OSKM herein). Our previous work has uncovered the importance of mitochondrial fission controlled by a Drp1-ERK axis in cell reprogramming.²⁷ Here, we have investigated the importance of the factors involved in Drp1 recruitment to mitochondria in OSKM-induced cell reprogramming using an RNAi approach and found that MiD51 and Gdap1 were the factors whose reduction affected both processes the most. By exploring in detail the role of Gdap1 in cell reprogramming, we found that dysfunctional mitochondrial fission caused by lack of this protein impairs cell reprogramming by interfering with cell cycle progression in a DNA damage-independent manner.

CONTACT Josema Torres  Josema.torres@uv.es  Depto. Biología Celular, Biología Funcional y Antr. Física; Fac. CC Biológicas Ed-B; C/ Dr. Moliner, 50; Burjassot 46100; Valencia; Spain.

Color versions of one or more of the figures in the article can be found online at www.tandfonline.com/kccy.

[#]These authors contributed equally to this work.

 Supplemental data for this article can be accessed on the publisher's website.

Results

Identification of factors involved in OSKM-induced mitochondrial fission

We have observed that OSKM-mediated cell reprogramming induces mitochondrial fission early during the process.²⁸ To investigate the factors involved in the regulation of mitochondrial fission during cell reprogramming, we conducted a reprogramming assay where we knocked down factors known to play a major role in controlling mitochondrial fission by RNA interference.

Early-passage wild type Mouse Embryonic Fibroblasts (MEFs) were transduced with OSKM-encoding retroviruses. Next day, infected cells were transfected with different endoribonuclease-prepared siRNAs (esiRNAs) targeting *enhanced Green Fluorescent Protein (eGFP)*, as control, or the indicated pro-fission factors. Twenty-five days after retroviral delivery of OSKM in the presence of the indicated esiRNAs, we estimated reprogramming efficiency in the cultures using an Alkaline Phosphatase (AP) assay (Fig. 1A). Compared with the control, knockdown of *MiD49* or *Fis1* did not have any effect in the emergence of AP-positive colonies. Knockdown of *Mff* showed a mild reduction in the emergence of AP-positive colonies relative to the control.

Interestingly, a reduction of *MiD51* or *Gdap1* mRNA levels led to a profound decrease in the numbers of AP-positive colonies when compared to control esiRNA. All the transfected esiRNAs reduced the expression levels of the targeted factors by at least 75% (Supplementary Fig. 1A), as assessed by quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) 6 days after OSKM-transduction.

We next examined the effect of knocking down the different factors known to play a role in regulating mitochondrial dynamics in OSKM-induced mitochondrial fission. For this we measured mitochondrial morphology in OSKM-infected MEFs transfected with the indicated esiRNA constructs 6 days after viral transduction by immunofluorescence (IF) staining for the mitochondrial marker Tom20 (Fig. 1B). Six days after OSKM-expression, $31.8 \pm 1.5\%$ of cells transfected with the control esiRNA displayed fragmented mitochondrial morphology (Fig. 1B). Compared to the control, knockdown of *Fis1*, *Mff* or *MiD49* did not have an effect in the mitochondrial morphology of OSKM-infected cells (Fig. 1B), suggesting that these proteins do not play an active role in OSKM-induced mitochondrial fission during early reprogramming. Remarkably, and relative to the control, reduction of *MiD51* or *Gdap1* mRNAs decreased OSKM-induced mitochondrial fragmentation by more than 50% (Fig. 1B). Overall, our findings suggest

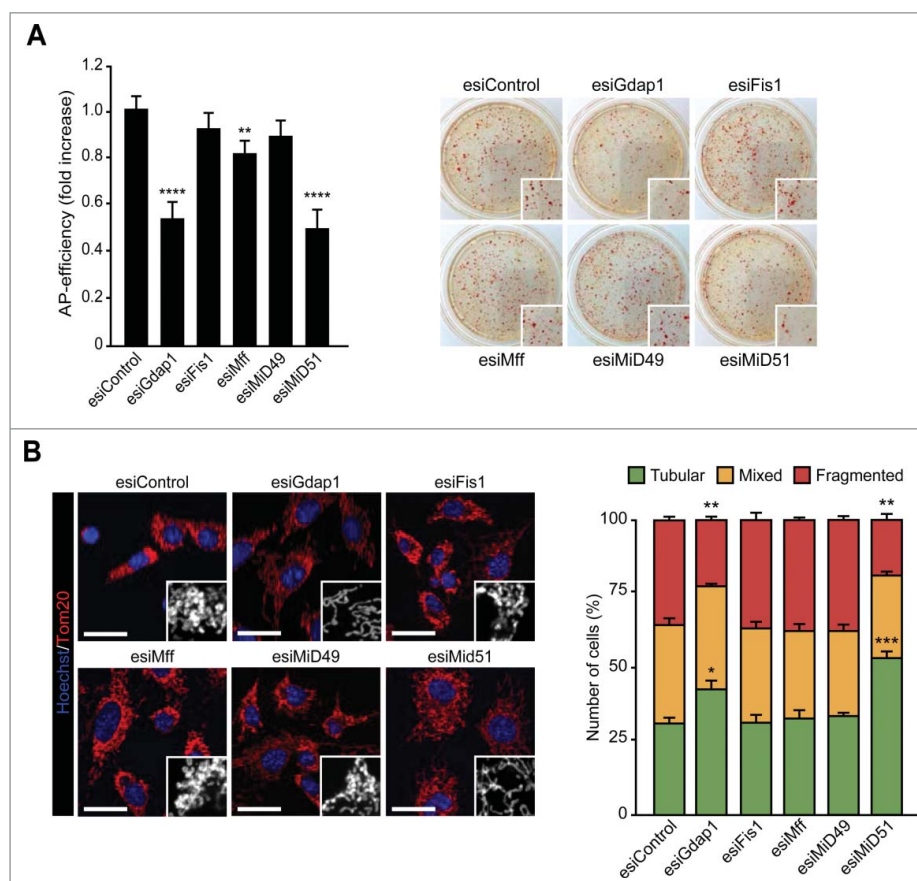


Figure 1. Knockdown of pro-fission factors impairs mitochondrial fission and cell reprogramming. (A) Graph showing the number of Alkaline Phosphatase (AP)-positive colonies obtained in wild type MEFs transfected with the indicated esiRNAs after 25 days of retroviral delivery of the OSKM factors, ($n = 3$; ** $P < 0.01$; **** $P < 0.0001$). Panels in the right show representative bright field images and a magnification (inset) of the plates of the indicated cultures after AP-staining. (B) Left panels, representative confocal images of OSKM-transduced cells transfected with the indicated esiRNAs that were stained with anti-Tom20 antibody (red). Inset shows a magnification of the indicated area in the images of the left. Hoechst (blue) was used as a nuclear counterstaining. Scale bar $24 \mu\text{m}$. Graph on the right shows the quantification of the different mitochondrial morphologies observed in the cells treated as before, ($n = 3$; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$). Data are represented as mean \pm s.e.m. One-tailed unpaired Student's t-test was used to compare data sets.

that OSKM-mediated mitochondrial fission and cell reprogramming depends on the presence of MiD51, Gdap1 and, to a lesser extent, of Mff. These results prompted us to investigate further the role of Gdap1 in the reprogramming process.

Lack of Gdap1 impairs cell reprogramming and OSKM-induced mitochondrial fission

The above results suggested that lack of Gdap1-dependent mitochondrial fission could impair cell reprogramming. To investigate this possibility further, we carried out reprogramming assays with MEFs isolated from *Gdap1* knockout mice.²⁹ Interestingly, we observed a reduction of approximately 75% in the number of AP-positive colonies in Gdap1-null cells subjected to reprogramming when compared to wild type controls (Fig. 2A). No defects in cell proliferation under normal cell growth conditions or viral transduction efficiency were found in Gdap1-null cells when compared to wild type controls (Fig. S1B, C). These results support the notion that lack of Gdap1 impairs cell reprogramming. Nonetheless and albeit with a much lower efficiency than with wild type cells, we were able to isolate iPS-like colonies derived from Gdap1-null MEFs. Molecular and functional analysis showed that the isolated Gdap1-null cell clones were *bona fide* iPS cells (Figs. S2 and S3).

We monitored mitochondrial dynamics in MEFs by IF as above. In agreement with its proposed role in the fission process and the results shown above, at day zero the majority of Gdap1-null cells were classified as tubular (Fig. 2B, right panels and graph). Compared to wild type controls, Gdap1-null MEFs showed a decreased induction of mitochondrial fragmentation during reprogramming and only $22.44 \pm 3.80\%$ of the cells showed fragmented mitochondria 4 days after OSKM expression *versus* $35 \pm 0.5\%$ found in wild type counterparts (Fig. 2B, graph). These results indicate that lack of *Gdap1* interferes with OSKM-induced mitochondrial fragmentation as well as with the fission of these organelles in normal settings.

During reprogramming, cells undergo Mesenchymal-to-Epithelial Transition (MET).^{30,31} In wild type cells, Phalloidin and Tom20 staining of the cultures at day 8 of reprogramming showed mesenchymal cells displaying tubular organization of mitochondria whereas epithelial-like colonies showed a fragmented arrangement of these organelles (Fig. 2C). Interestingly and similar to wild type controls, 85% of the cells in Gdap1-null colonies displayed also fragmented mitochondria (Fig. 2, middle panels, inset and graph). These results support the notion that Gdap1 does not play a role in the regulation of mitochondrial dynamics once cells undergoing reprogramming have achieved the epithelial state to continue their path to pluripotency. In fact, lack of Gdap1 impaired the formation of epithelial-like colonies when compared to wild type MEFs (Fig. 2D). In keeping with this, qPCR analysis of *Gdap1* expression showed that the mRNA levels of this gene decreased at day 4 of reprogramming and were completely absent in pluripotent cells (Fig. 2E). Altogether, these results indicate that Gdap1-dependent mitochondrial fission in MEFs is important for initiating the transit to pluripotency before reaching, or at, the MET barrier to pluripotency.

Lack of Gdap1 does not alter the expression of mitochondrial dynamics regulatory factors

We next sought to investigate whether the observed decrease in OSKM-induced mitochondrial fission associated with the lack of *Gdap1* gene was due to an alteration in the expression and/or activation of known mitochondrial dynamics regulatory factors. For this, we first examined the expression of these factors in MEFs, OSKM-expressing cells and pluripotent cells from both wild type and *Gdap1*-null genotypes, using qPCR (Fig. 3A). As we described previously,²⁸ the expression of the majority of the factors involved in mitochondrial dynamics increased during reprogramming. Interestingly, cells from both genotypes displayed the same profiles of gene (Fig. 3A) and protein (Fig. 3B, C) expression during cell reprogramming and in iPS cells. In addition, we did not find significant differences between cells of both genotypes in the phosphorylation of S579-Drp1, an indication of Drp1 activation,⁷⁻¹¹ neither in response to OSKM expression (Fig. 3D) nor in self-renewing pluripotent stem cells (Fig. 3E). These results indicate that lack of *Gdap1* gene did not alter the expression nor activation of the protein set that regulates mitochondrial dynamics neither in cells undergoing cell reprogramming nor in pluripotent stem cells.

Lack of Gdap1 induces a DNA damage-independent G2/M cell arrest early during reprogramming

We next examined the transcriptional response to OSKM-expression in wild type and Gdap1-null cells using microarrays. Comparative gene expression analysis identified 5,802 differentially expressed genes (DEGs) at day 4 of reprogramming between wild type and Gdap1-null cells (Fig. 4A and Table S1). Gene Ontology analysis revealed that genes related to cell division, protein catabolic processes or RNA processing/modification were highly downregulated in Gdap1-null cells compared to wild type controls (Fig. 4B). Furthermore, functional analysis of microarray data using Gene Map Annotator and Pathway Profiler (GenMAPP) revealed a prominent downregulation of cell cycle pathways in Gdap1-null cells at day 4 of reprogramming (Fig. 4B and Table S1). The results shown above suggested that cell cycle progression was compromised in OSKM-transduced *Gdap1* knockout cells. To validate the results from the microarray analysis on cell cycle, we carried out cell cycle profiling of the cells at day 4 of reprogramming by flow cytometry. No significant differences in the cell cycle profiles between wild type and Gdap1-null cells were found before transduction with OSKM-encoding retroviruses (Fig. 4C). Interestingly, we observed a statistically significant 3-fold increase in the proportion of OSKM-expressing Gdap1-null cells in G2/M when compared with wild type counterparts (Fig. 4C), confirming the results from the functional analysis of microarray data.

The initial regulatory network induced by OSKM expression promotes both reprogramming and apoptosis.³² Although our microarray data showed that Gdap1-null and wild type cells responded differently to OSKM-dependent transcription (Fig. S4A and Table S1), we did not find differences in the induction of apoptosis between both genotypes at day 4 of reprogramming, as measured by AnnexinV-staining using flow

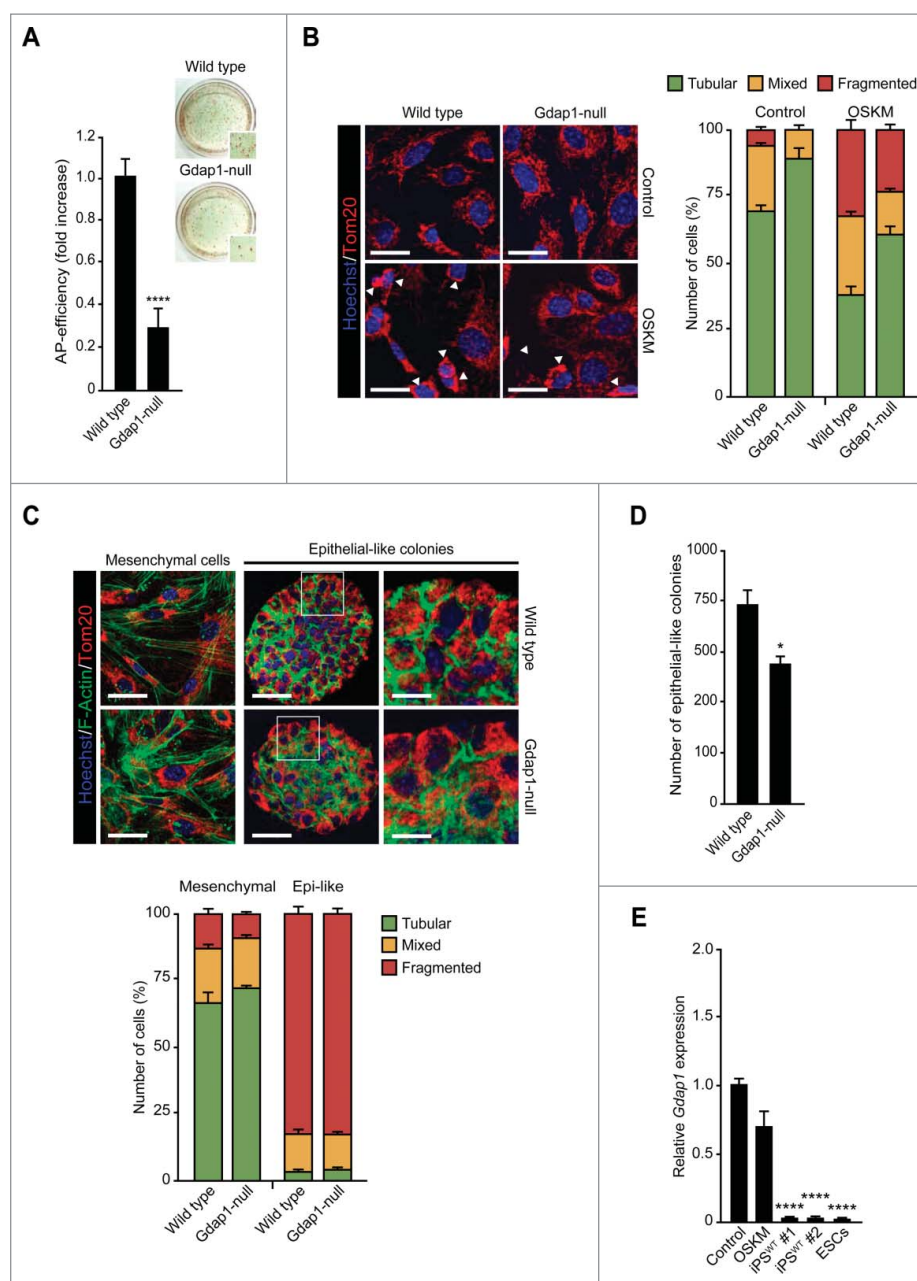


Figure 2. Lack of *Gdap1* gene impairs OSKM-induced mitochondrial fission. (A) Graph showing the number of Alkaline Phosphatase (AP)-positive colonies obtained in wild type or *Gdap1*-null MEFs after 25 days of retroviral delivery of the OSKM factors, ($n = 6$; **** $P < 0.0001$). Panels in the right show representative bright field images and a magnification (inset) of the AP-staining. (B) Left panels, representative confocal images of wild type or *Gdap1*-null cells stained with anti-Tom20 antibody (red) before (control) or after expressing the OSKM factors for 4 days (OSKM). Arrowheads point to cells with fragmented mitochondria. Hoechst (blue) was used as a nuclear counterstaining. Scale bar $24 \mu\text{m}$. Graph on the right shows the quantification of the different mitochondrial morphologies observed in MEFs of the indicated genotypes before (control) or 4 days after OSKM expression (OSKM), ($n = 3$; all differences were found to be statistically significant $P < 0.05$). (C) Representative confocal images of mesenchymal or epithelial-like colonies found in wild type (upper panels) or *Gdap1*-null (lower panels) MEFs, at day 8 of reprogramming, incubated with Phalloidin (green) to stain F-actin and anti-Tom20 antibody (red) to label mitochondria. Scale bars in left panels $24 \mu\text{m}$, middle panels $40 \mu\text{m}$. Rightmost images are a magnification of the indicated area in the middle panels. Scale bar, $15 \mu\text{m}$. Hoechst (blue) was used as a nuclear counterstaining. Graph at the bottom shows the quantification of the indicated mitochondrial morphologies observed in the cultures at day 8 ($n = 3$; all differences were found to be statistically significant $P < 0.05$). (D) Graph showing the number of epithelial-like colonies obtained in wild type or *Gdap1*-null MEFs at day 8 of reprogramming, ($n = 3$; * $P < 0.05$). (E) Total RNA was extracted from wild type MEFs at day 4 of reprogramming (OSKM), wild type iPS or ES cells, and *Gdap1* gene expression was assessed by qPCR and represented as relative gene expression normalized to untreated wild type MEFs (Control). ($n = 3$; **** $P < 0.0001$). Data are represented as mean \pm s.e.m. One-tailed unpaired Student's t-test was used to compare data sets.

cytometry (Fig. 4D). Interference with mitochondrial fission in cancer cells by knocking down FIS1 induced a G2/M cell cycle arrest associated with DNA damage.³³ However, we did not observe differences in the induction of DNA damage between both genotypes after expressing the OSKM factors for 4 days, by either γ H2AX- or p53BP1-stainings using High-Content Analysis (Fig. 4E and Supplementary Fig. 4B). Thus, our results

suggest that the effect on cell cycle progression that we observed in *Gdap1*-null cells undergoing reprogramming is DNA damage-independent and may partially account for the decreased efficiency of reprogramming detected in the absence of the *Gdap1* gene. These results highlight therefore the importance of adjusting mitochondrial dynamics with cell division during cell reprogramming.

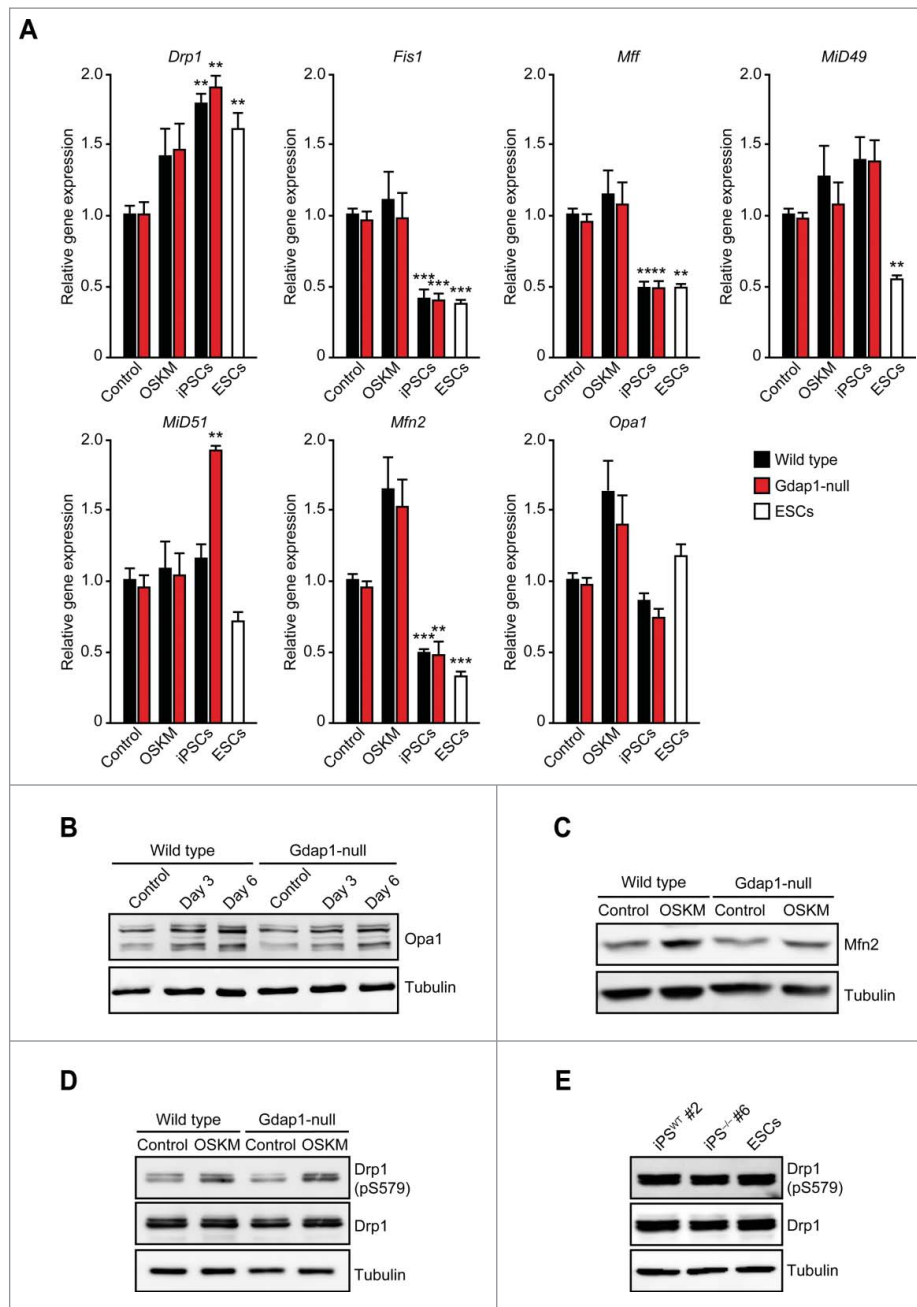


Figure 3. Expression of mitochondrial dynamics regulatory factors in somatic and pluripotent cells. (A) Total RNA was extracted from wild type (black bars) or Gdap1-null (red bars) MEFs left untreated (control) or OSKM-infected for 4 days (OSKM), or from the indicated pluripotent cells (iPSCs). The expression of the indicated genes was then assessed by qPCR and represented as relative gene expression normalized to control wild type MEFs of the corresponding genotype. Gene expression of the indicated genes in E14Tg2a ES cells (ESCs) is included as control (white bars), ($n = 3$; $**P < 0.01$; $***P < 0.001$). (B-E) Pluripotent cells or MEFs of the indicated genotypes, were left untreated (control) or OSKM-infected (OSKM) for the indicated days. Then, cellular lysates were analyzed by immunoblotting using anti-Opa1 (B), anti-Mfn2 (C), or anti-phospho S579S-Drp1 or anti-Drp1 antibodies (D, E), as indicated. Tubulin antibody, shown in the lower panels, was used as a loading control.

Discussion

Mitochondrial fission controlled by a Drp1-ERK axis constitutes an early and necessary step in OSKM-induced reprogramming.^{28,34} Here, we identified MiD51, Mff and Gdap1 as key factors in mediating the remodelling of mitochondria early in reprogramming.

The role of MiD51 in mitochondrial dynamics regulation is controversial,¹⁸ as knockdown of the gene encoding this protein in different labs induced either mitochondrial fragmentation¹⁵ or mitochondrial fusion.¹⁶ Our results showing that

knockdown of *MiD51* induced mitochondrial elongation in MEFs support a role for this protein as a pro-fission factor. In addition, it has been suggested that MiD51 and Mff are part of a common Drp1-dependent regulatory pathway to control mitochondrial morphology³⁵ and MFF overexpression induced mitochondrial fission in immortalized fibroblasts.³⁶ As *Mff* knockdown had little effect in cell reprogramming in our system, we postulate that MiD51 could function independently of Mff to mediate mitochondrial fragmentation in response to OSKM expression. Interestingly, knockdown of *Gdap1* impaired mitochondrial fission in response to OSKM

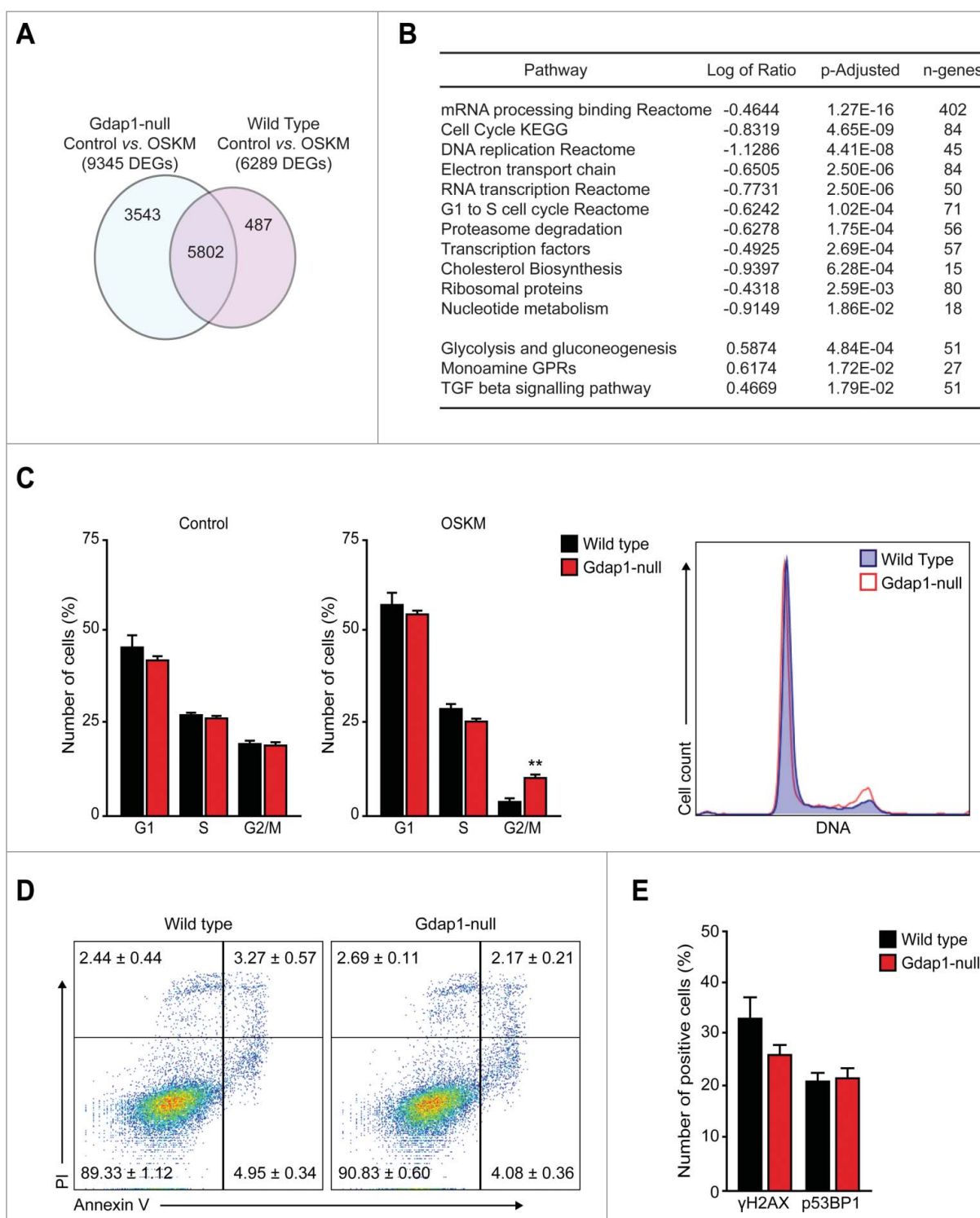


Figure 4. Molecular analysis of cell reprogramming in the absence of Gdap1. (A) Venn diagram showing overlap of Differentially Expressed Genes (DEGs) among control and OSKM-transduced MEFs data sets from both genotypes. (B) GenMAPP analysis comparing OSKM-transduced wild type and Gdap1-null data sets. All downregulated (top, negative Log of ratio) or upregulated (bottom, positive Log of ratio) pathways in Gdap1-null cells relative to wild type MEFs at day 4 of reprogramming are shown. (C) Graphs showing the assessment of the percentages of cells in the different phases of the cell cycle at day zero (left bars diagram) or day 4 of reprogramming (right bars diagram), ($n = 3$; $**P < 0.01$). Histogram on the right shows the cell cycle distribution of the indicated genotypes at day 4 of reprogramming. (D) Representative dot plots of wild type or Gdap1-null MEFs transduced with the OSKM factors that were stained with Propidium Iodide (PtdIns) and FITC-conjugated Annexin V for assessing cell death 4 days after viral transduction. Data in the plots are represented as mean \pm s.e.m. ($n = 3$, differences were non significant). (E) Graph showing the quantification of the data corresponding to wild type or Gdap1-null MEFs transduced with OSKM viruses for 4 days, processed for immunofluorescence with anti- γ H2AX- or -p53BP1 antibodies and analyzed by High-Content microscopy ($n = 3$, differences were non-significant). Data are represented as mean \pm s.e.m. One-tailed unpaired Student's t-test was used to compare data sets.

expression at similar levels than *MiD51*. It is therefore tempting to suggest that, similar to the role performed by MFF in cancer cells, Gdap1 cooperates with *MiD51* to drive mitochondrial

fission in response to reprogramming stimuli, using a specific Drp1-dependent pathway. In addition, the formation of mitochondria-Endoplasmic Reticulum (ER) contacts plays a key

role in mitochondrial fission^{12,13} and *Gdap1* has been shown to participate in the establishment of these contacts in neuroblastoma cells.²³ Thus, it is possible that lack of *Gdap1* impairs OSKM-induced mitochondrial fission by interfering with the formation of mitochondria-ER contacts, leading to a decrease in reprogramming efficiency. Interestingly, *Gdap1* is absent in pluripotent cells whereas it participates in mediating mitochondrial fission in MEFs before and during the very early stages of reprogramming. Thus, cells undergoing reprogramming could use a similar set of proteins to that found in basal conditions while the regulation of mitochondrial morphology in the intermediate states of reprogramming and in pluripotent cells may employ different mechanisms and/or molecular players.

Cancer cells are rapidly cycling cells, as are cells undergoing reprogramming, which constitute a privileged subset of cells with an ultrafast cell cycle.³⁷ Interestingly, depletion of *FIS1* in human cancer cells caused elongation of mitochondria and DNA damage, followed by G2/M growth arrest induction to eventually trigger senescence.^{33,38,39} Although knockdown of *Fis1* showed that this protein does not participate in regulating mitochondrial morphology in our experimental system, reduction of *Gdap1*, *Mff* or *MiD51* mRNA levels in MEFs caused a similar elongation of mitochondria to that found upon *FIS1* knockdown in transformed cells. Interestingly, *Gdap1* knockout cells displayed a G2/M growth arrest early during reprogramming but conversely to that found with *FIS1* ablation in cancer cells, this growth arrest was not associated with DNA damage. Thus, it is possible that OSKM-expressing cells lacking *Gdap1* were forced to engage into rapid cell divisions without properly fragmenting mitochondria, leading to a G2 and/or M cell cycle checkpoint activation to halt proliferation. Remarkably, this growth arrest was DNA damage-independent and therefore, different to that observed in cancer cells upon *FIS1* knockdown. This suggests that cancer cells and cells undergoing reprogramming respond differently to the presence of abnormally elongated mitochondria in G2/M cell cycle phases. Finally, and although we were able to derive *bona fide* *Gdap1*-null iPS cells, interference with mitochondrial fission by knocking down *DRP1* caused aneuploidy in cancer cells.⁴⁰ Thus, our results also suggest that caution must be taken when deriving human iPS cells for modeling human diseases characterized by a dysfunctional mitochondrial dynamics, such as Charcot-Marie-Tooth, as their reprogramming in the absence of a proficient mitochondrial fission machinery could either be highly inefficient and/or render cytogenetically abnormal iPS cells.

Mitochondria and peroxisomes cooperate at the functional and structural levels.⁴¹ Functionally, these organelles cooperate in the regulation of the lipid and Reactive Oxygen Species homeostasis. At the structural level, mitochondria and peroxisomes share both molecular mechanisms and regulatory proteins for undergoing division. In fact, *Fis1*, *Mff* and *Gdap1* proteins are also present on peroxisomes and regulate the fission of these organelles in insect and mammalian cells.^{13,20} Due to the existing interplay between mitochondria and peroxisomes, the possible implication of a peroxisomal dysfunction, caused by the knockdown of *Mff*, *MiD51* or *Gdap1*, in negatively influencing cell reprogramming in our settings cannot be ruled out. This is, nonetheless, an interesting question that warrants further investigation in the future.

As iPS cells are important tools for disease modeling^{42,43} and defects in mitochondrial homeostasis are associated with human pathologies,⁵ our study has a broad interest not only for

iPS cells-derived biomedical applications but also for understanding the role of factors that participate in the regulation of mitochondrial dynamics in physiological as well as pathological settings.

Materials and methods

Cell culture, reprogramming assays, reagents and vectors

ES cells were cultured on gelatinised plates in ES cell medium supplemented with 10% Foetal Bovine Serum (FBS) (Cat. S182B, Biowest Europe, Nuaille, France) in the presence of LIF.⁴⁴ When indicated, ES and iPSCs were grown on gelatinised plates in 2i medium⁴⁵ [(1:1) mixture of Neurobasal:DMEMF12 (Cat. 11570556, Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain; and Cat. L0091, Biowest Europe, Nuaille, France, respectively) supplemented with $0.5 \times \text{N2}$, $0.5 \times \text{B27}$ (Cat. 11520536 and Cat. 11530536 both from Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain), $3 \mu\text{M}$ CHIR99021 and $1 \mu\text{M}$ PD0325901 (Cat. 361571 and Cat. 444968, both from Millipore, Madrid, Spain)] in the presence of LIF. PlatE⁴⁶ and SNL⁴⁷ cells were grown in DMEM containing 10% FBS. When indicated, SNL cells were mitotically inactivated by treatment with $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ Mitomycin-C (Cat.

M4287, Sigma-Aldrich Quimica SL, Madrid, Spain) for 3 h at 37°C. Wild type and *Gdap1*-null MEFs (both in a pure C57BL/6 background) were prepared from pooled E13.5 embryos and cultured in DMEM supplemented with 10% FBS and Penicillin/Streptomycin. Early-passage MEFs (third passage at most) were used in all experiments. All cells have been routinely tested for mycoplasma contamination using the Lookout Mycoplasma PCR detection kit (Cat. MP0035, Sigma-Aldrich Quimica SL, Madrid, Spain). *Gdap1*^{-/-} mice²⁹ have been published elsewhere. The retroviral vectors pMX-Oct4, pMX-Sox2, pMX-Klf4 and pMX-c-Myc²⁵ were from Addgene. Mission esiRNA targeting *eGFP*, or mouse *Fis1*, *Mff*, *MiD49*, *MiD51* or *Gdap1* (Cat. EHUEGFP, EMU016691, EMU025311, ESIOPEN NM_001009927.2 COMPASS#AXM15-18183970, EMU006961 and EMU001231, Sigma-Aldrich Quimica SL, Madrid, Spain) were delivered into MEFs using Lipofectamine RNAiMAX (Cat. 10514953, Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain), as indicated.

Ecotropic retroviruses were produced in PlatE cells transfected using Polyethylenimine (PEI) "Max" (Mw 40,000) (Cat. 24765-2, Polysciences Europe GmbH, Hirschberg an der Bergstrasse, Germany) exactly as described.²⁵ For reprogramming wild type or *Gdap1*-null cells, 8×10^5 MEFs were plated per p100 mm the day before the assay. Next day (day 0), MEFs were incubated overnight with a 1:1:1:1 mixture of mouse *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* and *c-Myc* retroviral supernatants supplemented with $4 \mu\text{g ml}^{-1}$ Polybrene. Next day the supernatants were replaced with fresh media and cells were incubated for 3 more days (day 4). For reprogramming in the presence of esiRNAs, 30×10^3 MEFs in p24 well plates were transduced as before with OSKM. Infected MEFs were then transfected overnight with $0.6 \mu\text{g}$ of the indicated esiRNAs at day 1 and day 3 post-infection, using Lipofectamine RNAiMAX. Next morning, media was replaced with fresh media. Six days after OSKM-infection, cells were used for either cell reprogramming assays, RNA extraction or immunofluorescence analysis.

For assessing reprogramming efficiency, 1.5×10^5 cells were plated on a confluent layer of mitotically-inactivated SNL

feeders seeded the day before on gelatine-coated p100 mm dishes at 2×10^6 cells per dish. Next day, media was changed to ES cell growth medium containing 10% FBS and LIF. Media was changed every other day. Reprogramming efficiency was assessed 25 days after transduction of MEFs with OSKM-encoding retroviruses by scoring all the alkaline phosphatase positive colonies per p100 mm. Alkaline phosphatase staining was performed using the Alkaline Phosphatase Detection kit (Cat. SCR004, Millipore, Madrid, Spain).

For iPS cell generation, colonies were hand-picked at day 25 of reprogramming, transferred to a 1.5 ml tube containing 50 μ l of Trypsin/EDTA solution and incubated for 10 minutes at 37°C. Then, cells were disaggregated with a pipette by adding 200 μ l of ES cell media containing 10% FBS and LIF. Cells were then plated on SNL feeders in p24 plates (1 clone per well) in ES cell media supplemented with 10% FBS and LIF. When colonies were macroscopically visible, media was switched to 2i medium with LIF. Surviving clones were further expanded in 2i media with LIF and analyzed as indicated.

Immunofluorescence and flow cytometry

For immunofluorescence analysis, all cells were plated on gelatine-coated coverslips. iPS and ES cells were seeded onto Mitomycin C-treated SNL cells and grown until clones were macroscopically visible. MEFs, untreated, transfected and/or transduced with the indicated viruses, were plated at 15000 cells per cm^2 the day before processing. Then, cells were fixed for 15 min at room temperature with 4% paraformaldehyde in PBS, permeabilised for 10 minutes with 0.5% Triton-X-100 in PBS, blocked for 30 minutes with blocking buffer [3% Bovine Serum Albumin (BSA, Cat. A7030, Sigma-Aldrich Quimica SL, Madrid, Spain) in PBS containing 0.025% Tween-20] and incubated overnight with primary antibodies in blocking buffer. After washing with PBS supplemented with 0.025% Tween-20, cells were incubated for 1 hour with the appropriate secondary antibodies in blocking buffer containing 5 μ g per ml of Hoechst 33258 (Cat. 11594876, Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain), washed overnight with PBS, mounted and analyzed using confocal microscopy. For 2-bromo-5-deoxyuridine (BrdU) staining, cells were treated before blocking with 2N HCl at 37°C for 15 min and then with 0.1 M borate buffer (pH 8.5) at room temperature for 10 min, followed by blocking and incubation with mouse anti-BrdU antibody (Cat. MAB4072, Sigma-Aldrich Quimica SL, Madrid, Spain Sigma-Aldrich). Colocalisation of Tom20 and GFP-LC3B or Tom20 and Drp1 stainings was evaluated by calculating the Pearson Correlation Coefficient (PCC) using the freely-available JACoP plug-in (<http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/track/jacop.html>) for ImageJ analysis software, as previously described.⁴⁸

Chromosome counting was carried out exactly as described⁴⁹ using Hoechst 33258 as DNA dye. At least 25 spreads per sample were analyzed.

Confocal immunofluorescence images were taken using a Fluoview FV10i (OLYMPUS IBERIA S.A.U., Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain) confocal microscope equipped with 405-, 488- and 633-nm lasers. Three-dimensional reconstructions of z-stacks were performed using FV10-ASW 2.1 viewer software (OLYMPUS IBERIA S.A.U., Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain). All images were further processed using

Adobe Photoshop CS5 and compiled using Adobe Illustrator CS5 (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA). Alexa Fluor 488-Phalloidin was from Thermo Fisher Scientific (Cat. 10125092). Details about the antibodies used in this study are provided in Table S2.

For cell cycle profiling, trypsinised cells were fixed with ice-cold 70% ethanol for 30 minutes at 4°C, washed once with PBS and incubated in cell cycle propidium iodide/RNase solution (Cat. PI/RNASE, Immunostep, Salamanca, Spain) for 15 minutes in the dark at room temperature. For the analysis of apoptosis, MEFs were resuspended in AnnexinV-binding buffer, and stained with 634-conjugated AnnexinV/propidium iodide solution (Cat. ANNEXIN V DY634, Immunostep, Salamanca, Spain) for 15 minutes in the dark at room temperature. For mitochondrial mass assessment by flow cytometry, cells were trypsinised and resuspended in media containing 25 μ g per ml of the membrane potential-independent mitochondrial dye MitoTracker Green FM (Cat. 11589106, Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain), incubated at room temperature for 10 minutes and then processed for flow cytometry. All measurements were taken using a BD FACSCanto II or FACS Verse (both from BD Biosciences, San Jose, CA, USA) flow cytometers and analyzed using FlowJo V8.1.1 (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA) software. At least 10,000 events from each sample were recorded.

High-content analysis

For the High-Content Analysis (HCA), 30000 MEFs were plated in 24-well plates (Nunc) and stained by immunofluorescence with the indicated antibodies. One fluorescence image was collected for Hoechst 33258 (405/535 nm dichroic) and another for AlexaFluor-549 (535/620 nm dichroic) to detect the different markers with the InCell Analyzer 2000 automated epifluorescence microscope (GE Healthcare, Paterna, Valencia, Spain) at 40x magnification. HCA acquisition was performed using InCell investigator Software (GE Healthcare, Paterna, Valencia, Spain). For the analysis, cells and nuclei were defined using the Hoechst 33258 staining. The nuclei were segmented using top-hat segmentation defining a minimum nucleus area of 50 μm^2 . To define the cell segmentation a collar segmentation routine was used, specifying a ratio of 4 μm . To analyze the expression of γ H2AX, p53BP1 or BrdU by cell, the average intensity of pixels in the reference channel (AlexaFluor-549) within the defined nuclear region was measured. Once each cell had associated a nuclear intensity for the specific expression, a threshold filter defining positive and negative expressing cells was set. Threshold filter uses a histogram for data visualization. To specify the filter settings, the nuclear intensity measure was selected. The threshold filter defines the cells with nuclear intensities above or below a given value as positive or negative respectively for the expression of the protein. As a result, the program assigns to each cell the definition of positive or negative for the expression of γ H2AX, p53BP1 or BrdU and generates a percentage of both cell populations (positive and negative) per well. Details about the antibodies used in this study are provided in Supplementary Table 2.

Western blot

Cells were lysed in lysis buffer [50mM Tris pH7.5, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 0.5% Nonidet P-40, 100 mM NaF, 2 mM Na_3VO_4 ,

20 mM Na₄P₂O₇, and 1x complete proteinase inhibitor cocktail (Roche)]. Cellular lysates were used for immunoblotting with the indicated antibodies using standard procedures. Signals in western blots were detected using ECL prime (Cat. RPN2232, GE Healthcare, Paterna, Valencia, Spain) and images automatically captured in an ImageQuant LAS 4000 digital imaging system equipped with FUJINON F0.85 lenses and a Fujifilm super CCD area type chip (GE Healthcare, Paterna, Valencia, Spain). Acquired images were processed using ImageQuant TL 7.0 analysis software (GE Healthcare, Paterna, Valencia, Spain). Details about the antibodies used in this study are provided in Supplementary Table 2.

Nucleic acid isolation and qPCR analysis

Total RNA was extracted using TRI reagent (Cat. T9424, Sigma-Aldrich Quimica SL, Madrid, Spain) and cDNA synthesized using SuperScript III reverse transcriptase kit (Cat. 10432122, Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain). cDNA products were amplified using a StepOne Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain). Where indicated, Taqman probes were from Applied Biosystems. Sequences of the primers used in this study are listed in Supplementary Table 3.

Microarray data analyses

Microarray data (Affymetrix GeneChip Mouse Expression Array 430 2.0, Affymetrix) was standardized using Robust Multi-array Average method and quantile normalization. Differential gene expression was carried out using the *limma*⁵⁰ and *masigpro* packages from Bioconductor. Multiple testing adjustments of p-values were done according to Benjamini and Hochberg methodology. Gene set analysis was carried out for the Gene Ontology (GO) terms and for the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) Pathways using a logistic regression model,⁵¹ which returns adjusted p-values based on False Discovery Rate method. GO annotation for the genes in the microarray were taken from Ensembl 73 release. Microarray data have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus (GEO Series GSE59527).

Statistical methods

One-tailed Student's t-test was used to estimate statistical significance between categories. Relative values (percentages) were normalized using arcsine transformation before carrying out their statistical comparison. Results are presented as mean ± standard error of the mean (s.e.m.).

Ethics statement

All experiments were carried out in accordance with the guidelines of the Ethics committee at the University of Valencia. Mice were crossed and maintained at the University of Valencia animal core facility in accordance with Spanish regulations (RD53/2013). The experimental protocol (no. 2015/VSC/PEA/00079) was approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the University of Valencia and the Generalitat Valenciana government (Spain).

Abbreviations

AP	Alkaline Phosphatase
DEGs	differentially expressed genes
eGFP	enhanced Green Fluorescent Protein
ER	Endoplasmic Reticulum
esiRNA	endoribonuclease-prepared siRNAs
GenMAPP	Gene Map Annotator and Pathway Profiler
IF	Immunofluorescence
iPS cells	induced-Pluripotent Stem cells
MEF	Mouse Embryonic Fibroblast
MET	Mesenchymal-to-Epithelial Transition
OSKM	Oct4+Sox2+Klf4+cMyc
qPCR	quantitative Polymerase Chain Reaction

Disclosure of potential conflicts of interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

We are indebted to Dr. Lisa M. Sevilla for critical reading of the manuscript.

Funding

This study was supported by the Ministerio de Economía y Competitividad and FEDER funds "Una manera de hacer Europa," grant BFU2015-68366-R to JT, and International Rare Disease Research Consortium (IRDiRC) grant TREAT-CMT #5 to FP and JT. JP was a fellow of the Val+i PhD program from Generalitat Valenciana.

Author contributions

JP and ML conducted the majority of the experiments. XP, CL-G and RB helped with the microscopy analysis. MB-M and FP generated the Gdap1-null mice. ES obtained the microarray data. FG-G and JD carried out the microarray data analysis. JP, ML and JT conceived the project and designed the experiments. All authors discussed the results. FP and JT provided the funding.

ORCID

Xavier Ponsoda  <http://orcid.org/0000-0002-4051-4458>
 Francisco García-García  <http://orcid.org/0000-0001-8354-5636>
 Manuela Barneo-Muñoz  <http://orcid.org/0000-0003-4662-2887>
 Josema Torres  <http://orcid.org/0000-0001-6906-7164>

References

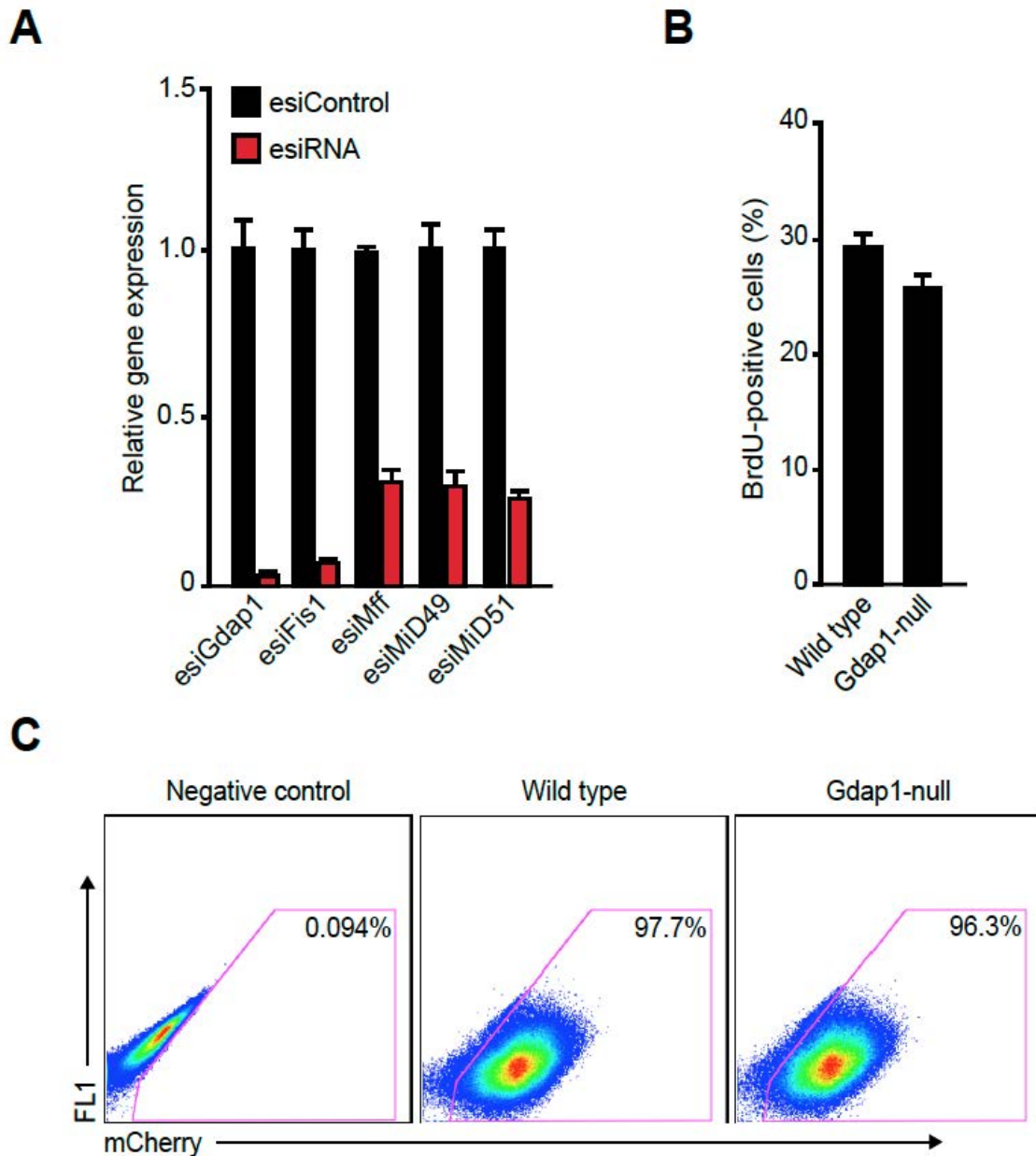
- [1] Westermann B. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11:872-884; PMID:21102612; <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3013>
- [2] Chan DC. Fusion and fission: interlinked processes critical for mitochondrial health. *Annu Rev Genet* 2012; 46:265-287; PMID:22934639; <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132529>
- [3] Nunnari J, Suomalainen A. Mitochondria: in sickness and in health. *Cell* 2012; 148:1145-1159; PMID:22424226; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.035>
- [4] Youle RJ, van der Bliek AM. Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science* 2012; 337:1062-1065; PMID:22936770; <http://dx.doi.org/10.1126/science.1219855>
- [5] Scorrano L. Keeping mitochondria in shape: a matter of life and death. *Eur J Clin Invest* 2013; 43:886-893 PMID:23869410; <http://dx.doi.org/10.1111/eci.12135>

- [6] Friedman JR, Nunnari J. Mitochondrial form and function. *Nature* 2014; 505:335-343; PMID:24429632. <http://dx.doi.org/10.1038/nature12985>
- [7] Shin HW, Shinotsuka C, Torii S, Murakami K, Nakayama K. Identification and subcellular localization of a novel mammalian dynamin-related protein homologous to yeast Vps1p and Dnm1p. *J Biochem* 1997; 122:525-530; PMID:9348079
- [8] Imoto M, Tachibana I, Urrutia R. Identification and functional characterization of a novel human protein highly related to the yeast dynamin-like GTPase Vps1p. *J Cell Sci* 1998; 111 (Pt 10):1341-1349; PMID:9570752
- [9] Kamimoto T, Nagai Y, Onogi H, Muro Y, Wakabayashi T, Hagiwara M. Dymple, a novel dynamin-like high molecular weight GTPase lacking a proline-rich carboxyl-terminal domain in mammalian cells. *J Biol Chem* 1998; 273:1044-1051; PMID:9422767
- [10] Smirnova E, Shurland DL, Ryazantsev SN, van der Bliek AM. A human dynamin-related protein controls the distribution of mitochondria. *J Cell Biol* 1998; 143:351-358; PMID:9786947
- [11] Yoon Y, Pitts KR, Dahan S, McNiven MA. A novel dynamin-like protein associates with cytoplasmic vesicles and tubules of the endoplasmic reticulum in mammalian cells. *J Cell Biol* 1998; 140:779-793; PMID:9472031
- [12] Friedman JR, Lackner LL, West M, DiBenedetto JR, Nunnari J, Voeltz GK. ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science* 2011; 334:358-362; PMID:21885730; <http://dx.doi.org/10.1126/science.1207385>.
- [13] Korobova F, Ramabhadran V, Higgs HN. An actin-dependent step in mitochondrial fission mediated by the ER-associated formin INF2. *Science* 2013; 339:464-467; PMID:23349293; <http://dx.doi.org/10.1126/science.1228360>.
- [14] Gandre-Babbe S, van der Bliek AM. The novel tail-anchored membrane protein Mff controls mitochondrial and peroxisomal fission in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 2008; 19:2402-2412; PMID:18353969; <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E07-12-1287>
- [15] Loson OC, Song Z, Chen H, Chan DC. Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission. *Mol Biol Cell* 2013; 24:659-667; PMID:23283981; <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E12-10-0721>
- [16] Mozdy AD, McCaffery JM, Shaw JM. Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fission is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fis1p. *J Cell Biol* 2000; 151:367-380; PMID:11038183
- [17] Palmer CS, Osellame LD, Laine D, Koutsopoulos OS, Frazier AE, Ryan MT. MiD49 and MiD51, new components of the mitochondrial fission machinery. *EMBO Rep* 2011; 12:565-573; PMID:21508961; <http://dx.doi.org/10.1038/embor.2011.54>
- [18] Zhao J, Liu T, Jin S, Wang X, Qu M, Uhlén P, Tomilin N, Shupliakov O, Lendahl U, Nistér M. Human MIEF1 recruits Drp1 to mitochondrial outer membranes and promotes mitochondrial fission rather than fission. *EMBO J* 2011; 30:2762-2778; PMID:21701560; <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2011.198>
- [19] Cuesta A, Pedrola L, Sevilla T, García-Planells J, Chumillas MJ, Mayordomo F, LeGuern E, Marín I, Vilchez JJ, Palau F. The gene encoding ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 is mutated in axonal Charcot-Marie-Tooth type 4A disease. *Nat Genet* 2002; 30:22-25 PMID:11743580
- [20] Otera H, Ishihara N, Mihara K. New insights into the function and regulation of mitochondrial fission. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1833:1256-1268; PMID:23434681; <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.02.002>
- [21] Niemann A, Ruegg M, La Padula V, Schenone A, Suter U. Ganglioside-induced differentiation associated protein 1 is a regulator of the mitochondrial network: new implications for Charcot-Marie-Tooth disease. *J Cell Biol* 2005; 170:1067-1078; PMID:16172208; <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200507087>
- [22] Huber N, Guimaraes S, Schrader M, Suter U, Niemann A. Charcot-Marie-Tooth disease-associated mutants of GDAP1 dissociate its roles in peroxisomal and mitochondrial fission. *EMBO Rep* 2013; 14:545-552; PMID:23628762; <http://dx.doi.org/10.1038/embor.2013.56>
- [23] Pla-Martín D, Rueda CB, Estela A, Sánchez-Piris M, González-Sánchez P, Traba J, de la Fuente S, Scorrano L, Renau-Piqueras J, Alvarez J, et al. Silencing of the Charcot-Marie-Tooth disease-associated gene GDAP1 induces abnormal mitochondrial distribution and affects Ca²⁺ homeostasis by reducing store-operated Ca²⁺ entry. *Neurobiol Dis* 2013; 55:140-151; PMID:23542510; <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2013.03.010>
- [24] López Del Amo V, Seco-Cervera M, García-Giménez JL, Whitworth AJ, Pallardó FV, Galindo MI. Mitochondrial defects and neuromuscular degeneration caused by altered expression of Drosophila Gdap1: implications for the Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Hum Mol Genet* 2015; 24:21-36; PMID:25122658; <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddu416>
- [25] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126:663-676; PMID:16904174
- [26] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131:861-872; PMID:18035408
- [27] Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 2007; 448:313-317; PMID:17554338
- [28] Prieto J, León M, Ponsoda X, Sendra R, Bort R, Ferrer-Lorente R, Raya A, López-García C, Torres J. Early ERK1/2 activation promotes DRP1-dependent mitochondrial fission necessary for cell reprogramming. *Nat Commun* 2016; 7:11124; PMID:27030341; <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms11124>
- [29] Barneo-Munoz M, Juárez P, Civera-Tregón A, Yndriago L, Pla-Martín D, Zenker J, Cuevas-Martín C, Estela A, Sánchez-Aragó M, Forteza-Vila J, et al. Lack of GDAP1 induces neuronal calcium and mitochondrial defects in a knockout mouse model of charcot-marie-tooth neuropathy. *PLoS Genet*. 2015; 11:e1005115; PMID:25860513; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1005115>
- [30] Li R, Liang J, Ni S, Zhou T, Qing X, Li H, He W, Chen J, Li F, Zhuang Q et al. A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell* 2010; 7:51-63; PMID:20621050; <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2010.04.014>
- [31] Samavarchi-Tehrani P, Golipour A, David L, Sung HK, Beyer TA, Datti A, Wolftjen K, Nagy A, Wrana JL. Functional genomics reveals a BMP-driven mesenchymal-to-epithelial transition in the initiation of somatic cell reprogramming. *Cell Stem Cell* 2010; 7:64-77; PMID:20621051; <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2010.04.015>
- [32] Soufi A, Donahue G, Zaret KS. Facilitators and impediments of the pluripotency reprogramming factors' initial engagement with the genome. *Cell* 2012; 151:994-1004; PMID:23159369; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.09.045>
- [33] Lee S, Park YY, Kim SH, Nguyen OT, Yoo YS, Chan GK, Sun X, Cho H. Human mitochondrial Fis1 links to cell cycle regulators at G2/M transition. *Cell Mol Life Sci* 2014; 71:711-725; PMID:23907611; <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-013-1428-8>
- [34] Vazquez-Martin A, Cufi S, Corominas-Faja B, Oliveras-Ferreros C, Vellon L, Menendez JA. Mitochondrial fusion by pharmacological manipulation impedes somatic cell reprogramming to pluripotency: new insight into the role of mitophagy in cell stemness. *Aging (Albany NY)* 2012; 4:393-401; PMID:22713507
- [35] Otera H, Wang C, Cleland MM, Setoguchi K, Yokota S, Youle RJ, Mihara K. Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. *J Cell Biol* 2010; 191:1141-1158. PMID:21149567; <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201007152>
- [36] Guido C, Whitaker-Menezes D, Lin Z, Pestell RG, Howell A, Zimmers TA, Casimiro MC, Aquila S, Ando S, Martinez-Outschoorn UE, et al. Mitochondrial fission induces glycolytic reprogramming in cancer-associated myofibroblasts, driving stromal lactate production, and early tumor growth. *Oncotarget* 2012; 3:798-810; PMID:22878233
- [37] Guo S, Zi X, Schulz VP, Cheng J, Zhong M, Koochaki SH, Megyola CM, Pan X, Heydari K, Weissman SM et al. Nonstochastic reprogramming from a privileged somatic cell state. *Cell* 2014; 156:649-662; PMID:24486105; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.020>

- [38] Lee S, Jeong SY, Lim WC, Kim S, Park YY, Sun X, Youle RJ, Cho H. Mitochondrial fission and fusion mediators, hFis1 and OPA1, modulate cellular senescence. *J Biol Chem* 2007; 282:22977-22983; PMID:17545159
- [39] Menendez JA, Vellon L, Oliveras-Ferraro C, Cufi S, Vazquez-Martin A. mTOR-regulated senescence and autophagy during reprogramming of somatic cells to pluripotency: a roadmap from energy metabolism to stem cell renewal and aging. *Cell Cycle* 2011; 10:3658-77; PMID:22052357; <http://dx.doi.org/10.4161/cc.10.21.18128>
- [40] Qian W, Choi S, Gibson GA, Watkins SC, Bakkenist CJ, Van Houten B. Mitochondrial hyperfusion induced by loss of the fission protein Drp1 causes ATM-dependent G2/M arrest and aneuploidy through DNA replication stress. *J Cell Sci* 2012; 125:5745-5757; PMID:23015593; <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.109769>
- [41] Schrader M, Costello J, Godinho LF, Islinger M. Peroxisome-mitochondria interplay and disease. *J Inher Metab Dis* 2015; 38:681-702; PMID:25687155; <http://dx.doi.org/10.1007/s10545-015-9819-7>
- [42] Hirschi KK, Li S, Roy K. Induced pluripotent stem cells for regenerative medicine. *Annu Rev Biomed Eng* 2014; 16:277-294; PMID:24905879; <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071813-105108>
- [43] Hotta A, Yamanaka S. From genomics to gene therapy: induced pluripotent stem cells meet genome editing. *Annu Rev Genet* 2015; 49:47-70; PMID:26407033; <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-genet-112414-054926>
- [44] Torres J, Watt FM. Nanog maintains pluripotency of mouse embryonic stem cells by inhibiting NFkappaB and cooperating with Stat3. *Nat Cell Biol* 2008; 10:194-201; PMID:18223644; <http://dx.doi.org/10.1038/ncb1680>
- [45] Ying QL, Wray J, Nichols J, Batlle-Morera L, Doble B, Woodgett J, Cohen P, Smith A. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* 2008; 453:519-523; PMID:18497825; <http://dx.doi.org/10.1038/nature06968>
- [46] Morita S, Kojima T, Kitamura T. Plat-E: an efficient and sTable system for transient packaging of retroviruses. *Gene Ther* 2000; 7:1063-1066; PMID:10871756
- [47] McMahon AP, Bradley A. The Wnt-1 (int-1) proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain. *Cell* 1990; 62:1073-1085; PMID:2205396
- [48] Bolte S, Cordelières FP. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J Microsc* 2006; 224:213-232; PMID:17210054
- [49] Robertson EJ. Embryo Derived Stem Cell Lines in Teratocarcinomas And Embryonic Stem Cells: a Practical Approach (ed Robertson, E. J.) 71-112 (Oxford: IRL Press, Oxford, UK, 1987).
- [50] Smyth GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* 2004; 3:Article3; PMID:16646809
- [51] Montaner D, Dopazo J. Multidimensional gene set analysis of genomic data. *PLoS One* 2010; 5:e10348; PMID:20436964; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0010348>

SUPPLEMENTARY FIGURES

Prieto et al., Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 1. Controls for the knockdown, proliferation and viral transduction in wild type and Gdap1-null cells

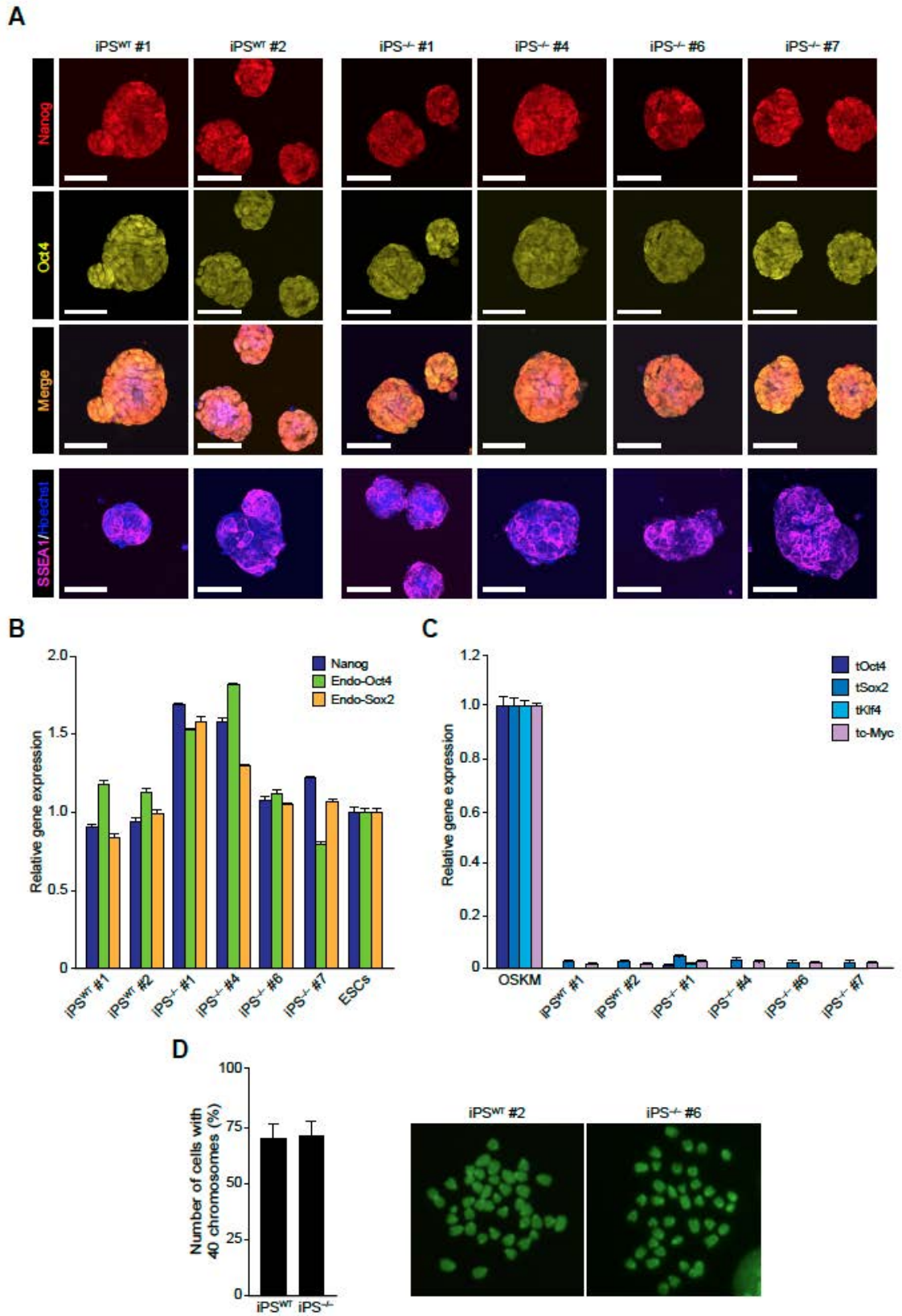
(A) Total RNA was extracted from OSKM-infected wild type MEFs for six days in the presence of esiRNA targeting *eGFP* (control, black bars) or the indicated factors (red bars). The expression of the indicated genes was then assessed by qPCR and

represented as relative gene expression normalised to OSKM-infected MEFs transfected with the control esiRNA targeting *eGFP*.

(B) Wild type or *Gdap1*-null MEFs under normal cell growth conditions were pulsed for 15 minutes with BrdU, followed by immunofluorescence analysis using anti-BrdU antibody. The graph shows the assessment of BrdU incorporation. Data are represented as mean \pm s.e.m. (n = 3, differences were non-significant; One-tailed student's t-test).

(C) Representative dot plots of wild type or *Gdap1*-null MEFs transduced with mCherry-expressing retroviruses for assessing transduction efficiency four days after infection by flow cytometry.

Prieto et al., Supplementary Figure 2



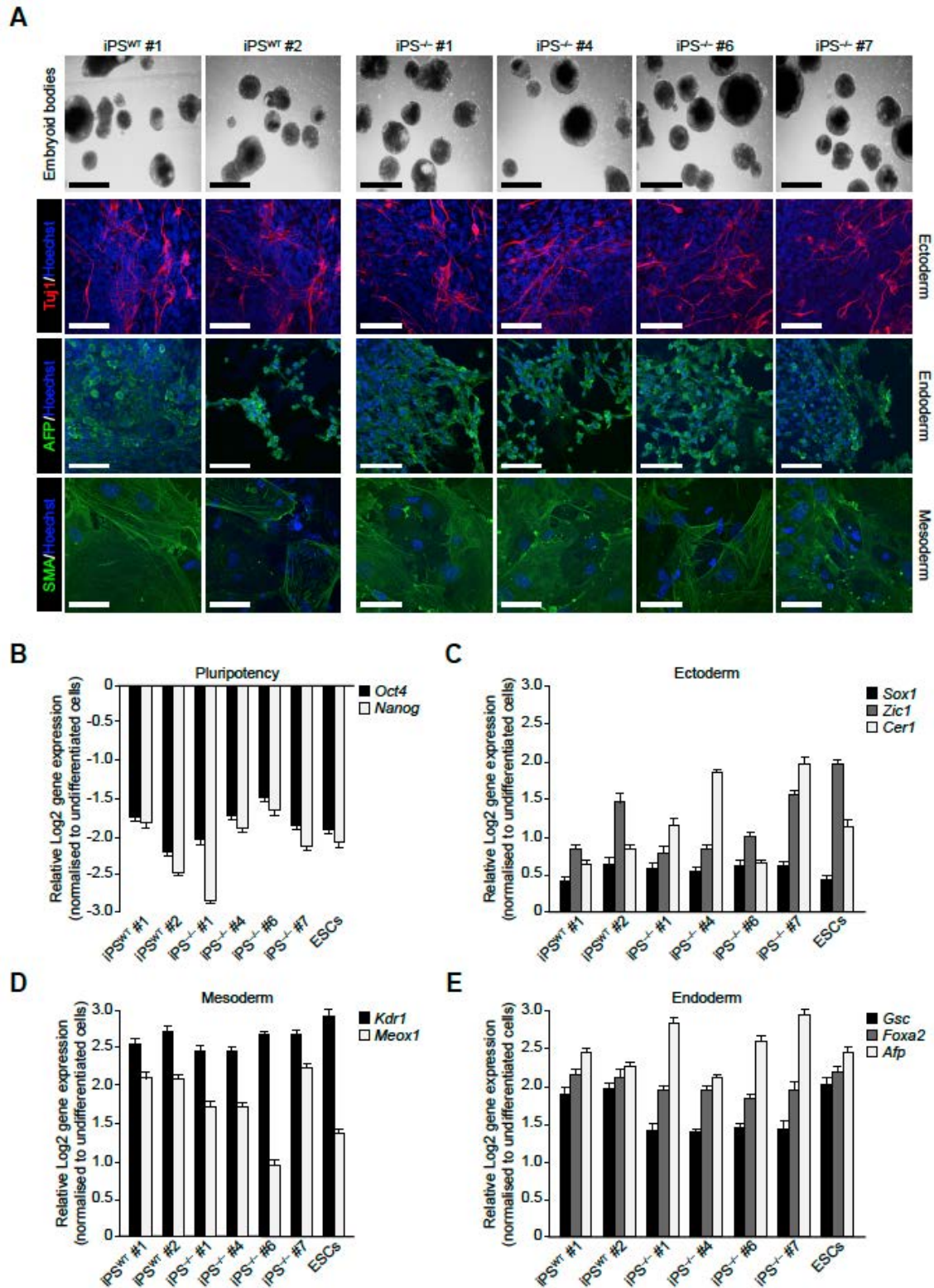
Supplementary Figure 2. Molecular characterisation of wild type and Gdap1-null iPS cell clones.

(A) Representative iPS cell clones of the indicated genotypes were subjected to IF staining with the indicated antibodies, using Hoechst (blue) as a nuclear counterstaining. Scale bar, 30 μ m. IF images with Nanog and Oct4 antibodies show different fields compared to that of SSEA1 staining.

(B-C) Total RNA was extracted from the indicated pluripotent stem cells and expression of (B) the *Oct4*, *Sox2* and *Nanog* pluripotency markers, or (C) exogenous *OSKM* cDNAs was assessed by qPCR and represented as relative gene expression normalised to undifferentiated ES cells (A) or OSKM-infected MEFs for four days (B).

(D) Graph showing the quantification of chromosome numbers from 25 metaphase spreads/sample from representative iPS cell clones of the indicated genotypes. Representative confocal images of the spreads are shown on the right.

Prieto et al., Supplementary Figure 3

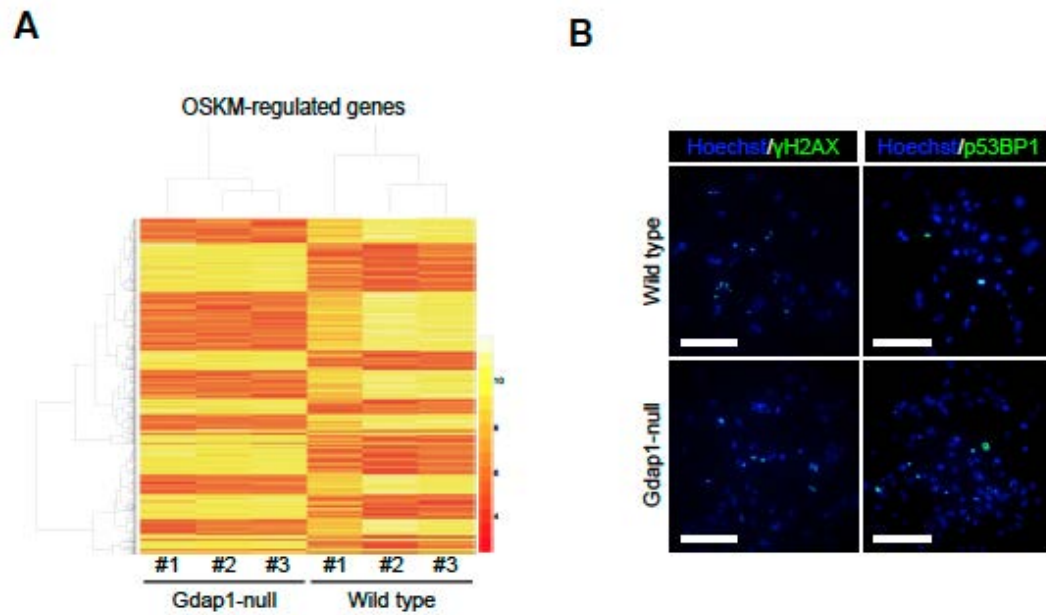


Supplementary Figure 3. Functional characterisation of wild type and Gdap1-null iPS cell clones

(A) Representative iPS cell clones of the indicated genotypes were subjected to Embryoid Body (EB) differentiation and photographed 7 days after (top panels). Scale bar, 500 μm . EBs were then seeded and 2 days later cells were subjected to IF with the indicated antibodies (lower panels). Scale bar, 40 μm .

(B-E) Total RNA was extracted from 7 days-old EBs of the indicated genotypes and the expression of **(B)** pluripotency, **(C)** ectoderm, **(D)** mesoderm or **(E)** endoderm markers was assessed by qPCR and represented as relative gene expression normalised to undifferentiated ES cells. Data are represented as mean \pm s.e.m. (n = 3).

Prieto et al., Supplementary Figure 4



Supplementary Figure 4. Comparative analysis of OSKM-induced genes and DNA damage marker staining.

(A) Heat maps showing the relative expression of OSKM-regulated genes³⁴ in Gdap1-null or wild type MEFs expressing the OSKM factors for 4 days.

(B) Wild type or Gdap1-null MEFs were transduced with OSKM viruses for four days, processed for IF with anti- γ H2AX or -p53BP1 antibodies and analysed by High-Content microscopy. Representative pictures of the indicated stainings are shown. Hoechst (blue) was used as a nuclear counterstaining. Scale bar, 120 μ m. Quantification of the data is displayed in the main text as Figure 5e (n = 3, differences were non-significant).

SUPPLEMENTARY TABLES

Prieto et al., Supplementary Table 1

Supplementary Table 1 (Excel file). Microarray data analysis

Microarray data analysis showing the differentially expressing genes (DEGs), Gene Ontology categories, GenMAPP pathways and the relative expression of the OSKM-regulated genes in our settings³⁴.

Prieto et al., Supplementary Table 2

Antigen	Host	Company	Reference	Dilution and applications
Alpha-fetoprotein	Rabbit	R&D Systems	MAB1368	1:100 (IF)
α -Tubulin	Mouse	SCBT	sc-32293	1:5000 (WB)
β III-Tubulin (Tuj1)	Rabbit	Covance	MRB-435P	1:1000 (IF)
Drp1	Rabbit	CST	#8570	1:1000 (WB)
p-Drp1 (Ser616)	Rabbit	CST	#3455	1:1000 (WB)
Mfn2	Rabbit	Sigma-Aldrich	AV42420	1:1000 (WB)
Nanog	Rabbit	Cosmo Bio Co.	RCAB0001P	1:100 (IF); 1:1000 (WB)
Oct4	Mouse	SCBT	sc-5279	1:50 (IF)
Opa1	Mouse	BD	# 612606	1:1000 (WB)
Smooth Muscle Actin	Mouse	Abcam	ab7817	1:100 (IF)
SSEA1	Mouse	SCBT	sc-21702	1:10 (IF)
Tom-20	Rabbit	SCBT	sc-11415	1:50 (IF)

Supplementary Table 2. Primary antibodies used in this study. SCBT, Santa Cruz Biotechnology; CST, Cell Signaling Technologies; BD, BD Biosciences; IF, immunofluorescence; WB, western blot.

Prieto et al., Supplementary Table 3

Target	Host	Conjugate	Company	References	Dilution and applications
Mouse IgG	Donkey	AF-488	TF	A-21202	1:1000 (IF)
Mouse IgG	Donkey	AF-555	TF	A-31570	1:1000 (IF)
Mouse IgG	Donkey	AF-647	TF	A-31571	1:1000 (IF)
Mouse IgM	Donkey	AF-555	TF	A-21426	1:1000 (IF)
Rabbit IgG	Donkey	AF-488	TF	A-21206	1:1000 (IF)
Rabbit IgG	Donkey	AF-555	TF	A-31572	1:1000 (IF)
Rabbit IgG	Donkey	AF-647	TF	A-31573	1:1000 (IF)
Mouse IgG	Goat	HRP	TF	31432	1:5000 (WB)
Rabbit IgG	Goat	HRP	TF	31460	1:5000 (WB)

Supplementary Table 3. Secondary antibodies used in this study. TF, Thermo Fisher Scientific; SCBT, Santa Cruz Biotechnologies; AF, AlexaFluor; HRP, horseradish peroxidase; IF, immunofluorescence; WB, western blot.

Prieto et al., Supplementary Table 4

Gene	Forward primer (5' to 3')	Reverse primer (5' to 3')
<i>Fis1</i>	TGTCCAAGAGCACGCAATTTG	CCTCGCACATACTTTAGAGCCTT
<i>Gapdh</i>	GCACAGTCAAGGCCGAGAAT	GCCTTCTCCATGGTGGTGAA
<i>Gdap1</i>	TCCTTCAGCTCTCAAAGGTGC	GCGCATAAACCAAGGCTCATT
<i>Mff</i>	ATGCCAGTGTGATAATGCAAGT	CTCGGCTCTCTCGCTTTG
<i>Mid49</i>	AGCCCACGCCCATTCATTC	TGGAGCCCGTCGTAGAGAG
<i>Mid51</i>	GGTGAGCGCAAAGGGAAGA	AATGCCCAACATAGCTGCTCC
<i>Mfn2</i>	TGACCTGAATTGTGACAAGCTG	AGACTGACTGCCGTATCTGGT
<i>Opa1</i>	ACAGCAAATTCAAGAGCACGA	TTGCGCTTCTGTTGGGCAT

Supplementary Table 4. Sequences of the primers used in this study (qPCR).

