



UNIVERSIDAD DE LEÓN

Departamento de Biología Molecular

**ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE P73 DURANTE EL PROCESO DE  
REPROGRAMACIÓN CELULAR:  
ANÁLISIS DE LA AUTO-RENOVACIÓN Y LA PLURIPOTENCIA DE  
LAS CÉLULAS REPROGRAMADAS**

Tesis Doctoral

Marta Martín López

León, Noviembre 2016

Las investigaciones correspondientes a esta Memoria de Tesis Doctoral han sido dirigidas por la Dra. M<sup>º</sup> del Carmen Marín Vieira (Departamento de Biología Molecular, Universidad de León) y la Dra. Margarita Marqués Martínez (Departamento de Producción Animal, Universidad de León). El trabajo se ha realizado en las instalaciones del Instituto de Biomedicina y del Departamento de Biología Molecular de la Universidad de León.

La financiación ha estado a cargo de los proyectos nacionales SAF2012-36143 y SAF2015-71381-R subvencionados por el Ministerio de Economía y Competitividad.

La autora de esta Tesis Doctoral ha sido beneficiaria de una beca PIRTU (Personal Investigador de Reciente Titulación Universitaria) de la Junta de Castilla y León, RD 1393/2007.



# Índice



# Tabla de contenidos

Índice de Figuras .....	v
Índice de Tablas .....	ix
Abreviaturas .....	x
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1. DESARROLLO EMBRIONARIO Y CÉLULAS TRONCALES EN RATÓN</b> .....	3
1.1 Especificación de las primeras estirpes en el embrión de ratón.....	3
1.2 Potencial de desarrollo de las células troncales: Pluripotencia y capacidad de Auto-renovación .....	5
1.3 Regulación molecular de la pluripotencia y la capacidad de auto-renovación	8
1.4 Células troncales pluripotentes derivadas del embrión de ratón .....	16
1.4.1 Células troncales embrionarias (ESCs).....	17
1.4.2 Células troncales epiblasticas (EpiSCs) .....	18
1.4.3 Células troncales germinales embrionarias (EGCs).....	20
1.4.4 Estados alternativos de la pluripotencia .....	20
<b>2. INDUCCIÓN DE LA PLURIPOTENCIA Y REPROGRAMACIÓN CELULAR</b> .....	22
2.1 Estrategias de inducción de la pluripotencia .....	23
2.2 Reprogramación celular inducida por factores de transcripción.....	26
2.2.1 Métodos de obtención de Células Troncales Pluripotentes Inducidas (iPSCs) .....	27
A) Métodos integrativos de los factores en el genoma .....	28
B) Métodos no integrativos de los factores en el genoma .....	29
<b>3. EL PROCESO DE REPROGRAMACIÓN, FASES Y MECANISMOS MOLECULARES QUE LO REGULAN</b> .....	31
3.1 Fase de Iniciación .....	32
3.1.1. Regulación molecular de la Transición Mesénquima-Epitelio (MET).....	34
3.2 Fase de Maduración .....	37
3.3 Fase de Estabilización.....	38
<b>4. BARRERAS Y FACILITADORES MOLECULARES DE LA REPROGRAMACIÓN</b> .....	40
<b>5. LA FAMILIA DE p53</b> .....	42
5.1 Organización estructural de la familia de p53.....	43
5.2 Funciones biológicas de la familia de p53 .....	46

5.2.1 Función de la familia de p53 en el desarrollo .....	48
5.2.2 Función de la familia de p53 en diferenciación.....	49
5.2.3 Función de la familia de p53 en la regulación del ciclo celular.....	51
5.2.4 Función de la familia de p53 en apoptosis.....	52
5.2.5 Función de la familia de p53 en senescencia .....	53
5.3 La familia de p53 en cáncer .....	54
5.4 La familia de p53 en angiogénesis .....	55
<b>6. LA FAMILIA DE p53 EN REPROGRAMACIÓN CELULAR .....</b>	<b>57</b>
6.1 Mecanismos de regulación del proceso de reprogramación por la familia de p53 .....	59
A) Control del ciclo celular.....	59
B) Apoptosis y senescencia .....	59
C) Transición Mesénquima-Epitelio .....	60
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>64</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>68</b>
<b>1. TRABAJO CON ANIMALES.....</b>	<b>70</b>
1.1 Cepas y cruces de ratones .....	70
1.2 Genotipado de los ratones .....	70
<b>2. TRABAJO CON LÍNEAS CELULARES.....</b>	<b>72</b>
2.1 Fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) .....	72
2.1.1 Aislamiento y condiciones de cultivo de MEFs.....	72
2.1.2 Curva de crecimiento diaria y acumulativa.....	73
2.1.3 Inactivación de MEFs para generar <i>feeders</i> .....	73
2.2 Células P19 .....	74
2.2.1 Tratamiento con BMP4.....	74
2.3 Células H1299.....	74
2.4 Células troncales pluripotentes inducidas (iPSCs) murinas .....	75
2.4.1 Curva de crecimiento diaria y acumulativa.....	76
2.5 Células HM-1 .....	76
2.6 Transfección con vectores de expresión .....	77
<b>3. GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS REPROGRAMADAS .....</b>	<b>77</b>
3.1 Proceso de reprogramación celular .....	77
3.1.1 Recogida de colonias de iPSCs .....	80
3.2 Ensayos de actividad fosfatasa alcalina (AP) .....	80

3.3 Ensayos de actividad $\beta$ -galactosidasa .....	81
3.4 Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo .....	81
3.5 Ensayos de pluripotencia <i>in vitro</i> .....	81
3.5.1 Diferenciación a partir de cuerpos embrioides (EBs) formados mediante el método de la gota colgante .....	81
3.5.2 Diferenciación endotelial en tres dimensiones (3D) .....	82
3.6 Ensayos de pluripotencia <i>in vivo</i> : formación de teratomas .....	84
<b>4. TRABAJO CON ÁCIDOS NUCLEICOS</b> .....	85
4.1 Transformación bacteriana y purificación de DNA plasmídico .....	85
4.2 Extracción de RNA .....	86
4.3 RT-PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) .....	87
<b>5. ENSAYOS DE ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL</b> .....	89
<b>6. ENSAYO DE INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA (ChIP)</b> .....	89
<b>7. TRABAJO CON PROTEÍNAS</b> .....	92
7.1 <i>Western Blot</i> .....	92
7.2 Inmunocitoquímica .....	94
<b>8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y PROGRAMAS UTILIZADOS</b> .....	95
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	98
<b>OBJETIVO 1. Analizar el papel del gen <i>Trp73</i>, y su relación funcional con el gen <i>Trp53</i>, en el proceso de reprogramación celular y en el mantenimiento de la auto-renovación y la pluripotencia</b> .....	100
1.1 Análisis de la falta de p73 en la eficiencia del proceso de reprogramación, en presencia o ausencia de p53 .....	100
1.1.1 Reprogramación de fibroblastos embrionarios de ratones WT, p73KO, p53KO y DKO .....	100
1.1.2 Eficiencia del proceso de reprogramación celular con cuatro factores (OSKM) .....	103
1.1.3 Eficiencia del proceso de reprogramación celular con tres factores (OSK) .....	104
1.1.4 Análisis de la activación compensatoria de p53 en ausencia de p73 .....	106
1.2 Análisis de la falta de p73 en el establecimiento y mantenimiento de la auto- renovación y la pluripotencia de líneas celulares iPSCs WT, p73KO, p53KO y DKO .....	108
1.2.1 Evaluación morfológica y capacidad de auto-renovación .....	109



1.2.2 Evaluación de la capacidad de pluripotencia <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .....	114
A) Expresión de los marcadores de pluripotencia: NANOG y SSEA-1 ....	115
B) Pluripotencia <i>in vitro</i> : diferenciación a partir de cuerpos embrioides .....	118
C) Pluripotencia <i>in vivo</i> : formación de teratomas .....	119
<b>OBJETIVO 2. Identificar los mecanismos moleculares regulados por el gen <i>Trp73</i> durante el proceso de reprogramación celular</b> .....	124
2.1 Análisis del efecto de la falta de p73 durante las etapas del proceso de reprogramación celular .....	125
2.2 Análisis del efecto de la falta de p73 durante las etapas del proceso de reprogramación celular en el contexto de ausencia de p53.....	129
2.3 Función de p73 en la regulación de la vía de señalización de BMP .....	132
2.3.1 Análisis del efecto de la falta de p73 en la activación de la vía de BMP inducida por los factores OSKM durante la fase de iniciación .....	132
2.3.2 Análisis del papel de p73 en la vía de señalización de BMP.....	135
2.3.3 Estudio del mecanismo molecular de regulación de la vía de señalización de BMP mediado por p73.....	139
<b>OBJETIVO 3. Estudiar la función del gen <i>Trp73</i> en la generación de células de estirpe mesodérmica a partir de líneas celulares pluripotentes inducidas (iPSCs)</b> .....	146
3.1 Análisis del efecto de la falta de p73 en la diferenciación endotelial y morfogénesis vascular .....	146
A) Generación de células endoteliales a partir de precursores mesodérmicos .....	147
B) Diferenciación de células endoteliales y morfogénesis vascular <i>in vitro</i> .....	150
C) Diferenciación endotelial y angiogénesis <i>in vivo</i> .....	154
<b>CONCLUSIONES</b> .....	160
<b>REFERENCIAS</b> .....	165
<b>ANEXOS</b> .....	200

# Índice de figuras

<b>Figure 1.</b> Especificación de las primeras estirpes en el desarrollo embrionario de ratón	4
<b>Figure 2.</b> Proceso de desarrollo según el modelo del paisaje epigenético de Waddington	6
<b>Figure 3.</b> Red esencial de regulación transcripcional de la pluripotencia	9
<b>Figure 4.</b> Vías de señalización implicadas en la regulación de la pluripotencia y auto-renovación	12
<b>Figure 5.</b> miRs implicadas en la regulación de la pluripotencia	14
<b>Figure 6.</b> Representación esquemática de la organización de la estructura de la cromatina y las modificaciones epigenéticas asociadas a la pluripotencia y la diferenciación de las ESCs	15
<b>Figure 7.</b> Origen de las células troncales pluripotentes durante el desarrollo embrionario	17
<b>Figure 8.</b> Rutas alternativas de inducción de pluripotencia: reprogramación celular	23
<b>Figure 9.</b> Hitos cronológicos claves de la inducción de la pluripotencia	24
<b>Figure 10.</b> Estrategias de inducción de la pluripotencia	25
<b>Figure 11.</b> Métodos de obtención de iPSCs	28
<b>Figure 12.</b> Vías de señalización y moléculas implicadas en la reprogramación química	31
<b>Figure 13.</b> Vía de señalización de BMP	36
<b>Figura 1.</b> Regulación entre la transición EMT y MET en reprogramación celular	37
<b>Figura 2.</b> Fases del proceso de reprogramación y eventos moleculares secuenciales característicos	39
<b>Figura 3.</b> Organización estructural de los miembros de la familia de p53	45
<b>Figura 4.</b> Organización genómica de TP73 y representación de las isoformas TA y $\Delta N$	46
<b>Figura 5.</b> Red funcional de la familia de p53	47
<b>Figura 6.</b> Mecanismos de regulación del proceso de reprogramación celular mediados por p53	58

<b>Figura 20.</b> Ejemplo de genotipado de ratones <i>Trp53</i> y <i>Trp73</i> .....	71
<b>Figura 7.</b> Diseño experimental del proceso de reprogramación .....	78
<b>Figura 8.</b> Vectores del sistema <i>piggyBac</i> .....	79
<b>Figura 23.</b> Proceso de diferenciación de las iPSCs mediante el cultivo de cuerpos embrioides (EBs) en gota colgante .....	83
<b>Figura 9.</b> Comprobación de la cromatina sonicada de células H1299 .....	90
<b>Figura 10.</b> El efecto de la falta de p73 durante la reprogramación celular no está mediado por una desregulación de la tasa de proliferación celular.....	101
<b>Figura 11.</b> La eficiencia de electroporación de los MEFs WT y p73KO no está afectada por la ausencia de p73 .....	102
<b>Figura 12.</b> La falta de p73 disminuye la eficiencia del proceso de reprogramación celular con OSKM, incluso en ausencia de p53.....	104
<b>Figura 13.</b> La falta de p73 disminuye la eficiencia del proceso de reprogramación celular con OSK, incluso en ausencia de p53 .....	106
<b>Figura 14.</b> La función de p73 se encuentra aguas abajo de p21 y miR-34a.....	107
<b>Figura 15.</b> La falta de p73 disminuye la eficiencia del establecimiento de líneas iPSCs y genera clones con una morfología alterada .....	110
<b>Figura 16.</b> La falta de p73 afecta el establecimiento de contactos intercelulares generando colonias iPSCs con un fenotipo epitelial alterado.....	111
<b>Figura 17.</b> La falta de p73 no impide la generación de clones iPSCs con capacidad de auto-renovación.....	113
<b>Figura 18.</b> Los clones iPSCs establecidos presentan actividad fosfatasa alcalina y no expresan $\beta$ -galactosidasa en ausencia de doxíciclina .....	115
<b>Figura 19.</b> La falta de p73 disminuye la expresión de los marcadores de pluripotencia NANOG y SSEA-1 .....	116
<b>Figura 20.</b> La falta de p73 disminuye los niveles de Lin28 en los clones iPSCs .....	117
<b>Figura 21.</b> Las iPSCs carentes de p73 pueden generar células de las tres capas germinales <i>in vitro</i> .....	119
<b>Figura 22.</b> Los teratomas derivados de iPSCs p73KO, p53KO y DKO muestran aspecto de posible teratomcarcinoma .....	120

<b>Figura 23.</b> Las células iPSCs WT y p73KO forman teratomas con estructuras características de ectodermo, mesodermo y endodermo .....	121
<b>Figura 24.</b> Las células iPSCs p53KO forman teratocarcinomas muy poco diferenciados .....	122
<b>Figura 25.</b> Los teratomas de iPSCs DKO presentan estructuras muy diferenciadas .....	123
<b>Figura 26.</b> El gen <i>p73</i> se regula durante el proceso de reprogramación celular de MEFs WT, induciéndose ambas isoformas, pero siendo $\Delta$ Np73 predominante .....	124
<b>Figura 27.</b> La falta de <i>p73</i> afecta la transición mesénquima-epitelio (MET) .....	126
<b>Figura 28.</b> La falta de <i>p73</i> disminuye los niveles de expresión de Nanog durante el proceso de reprogramación celular afectando la fase de maduración.....	127
<b>Figura 29.</b> La falta de <i>p73</i> afecta la fase de estabilización durante el proceso de reprogramación .....	129
<b>Figura 30.</b> La falta de <i>p73</i> afecta el perfil de expresión epitelial, la fase de maduración y estabilización durante el proceso de reprogramación celular, incluso en ausencia de <i>p53</i> .....	131
<b>Figura 31.</b> La falta de <i>p73</i> mitiga la inducción de <i>Id1</i> en la etapa de iniciación .....	133
<b>Figura 32.</b> La falta de <i>p73</i> afecta la regulación de la expresión de los inhibidores de la vía de señalización de BMP, <i>Smad6</i> y <i>Nog</i> , durante la fase de iniciación, sin afectar <i>Smad7</i> .....	134
<b>Figura 33.</b> La vía de señalización de BMP se activa en presencia de BMP4.....	135
<b>Figura 34.</b> La isoforma $\Delta$ Np73 está regulada por BMP4 de una manera dosis-dependiente .....	136
<b>Figura 35.</b> TAp73 y $\Delta$ Np73 inducen la expresión de <i>Id1</i> , en presencia de BMP4 .....	137
<b>Figura 36.</b> TAp73 y $\Delta$ Np73 incrementan la activación de la vía de señalización de BMP, en presencia de BMP4, en células P19 .....	138
<b>Figura 37.</b> TAp73 y $\Delta$ Np73 incrementan la activación de la vía de señalización de BMP, en presencia de BMP4, en células H1299 .....	139
<b>Figura 38.</b> La falta de <i>p73</i> resulta en la inducción de la expresión de <i>Smad6</i> , sin afectar <i>Smad7</i> .....	140
<b>Figura 39.</b> La isoforma $\Delta$ Np73 reprime la inducción de <i>Smad6</i> .....	141

<b>Figura 40.</b> Identificación de un p53RE en los promotores de SMAD6 humano y <i>Smad6</i> murino .....	142
<b>Figura 41.</b> La isoforma $\Delta$ Np73 reprime la activación transcripcional de <i>Smad6</i> .....	143
<b>Figura 42.</b> $\Delta$ Np73 se une al p53RE del promotor de SMAD6 .....	144
<b>Figura 43.</b> Modelo de regulación propuesto .....	145
<b>Figura 44.</b> La falta de p73 genera EBs de pequeño tamaño y morfología irregular .....	149
<b>Figura 45.</b> La falta de p73, incluso en el contexto de ausencia de p53, impide la formación de brotes vasculares .....	151
<b>Figura 46.</b> Las iPSCs carentes de p73, incluso en el contexto de ausencia de p53, se diferencian a células CD31+ incapaces de formar brotes vasculares .....	152
<b>Figura 47.</b> La falta de p73 impide la formación de estructuras vasculares y ejerce un efecto <i>non cell autonomous</i> en el potencial angiogénico de las iPSCs.....	153
<b>Figura 48.</b> p73 es necesario para la angiogénesis tumoral .....	155
<b>Figura 49.</b> La expresión de $\Delta$ Np73 en la línea celular de melanoma de ratón B16-F10 resulta en un incremento de la vascularización del tumor .....	157

# Índice de tablas

<b>Table 1.</b> Ensayos utilizados para evaluar la pluripotencia de las PSCs.....	7
<b>Table 2.</b> Características de los estados pluripotentes “naive” y “primed” en ratón.....	21
<b>Table 3.</b> Vía de señalización de BMP.....	35
<b>Table 4.</b> Factores de transcripción que facilitan la reprogramación .....	40
<b>Table 5.</b> Secuencias de <i>primers</i> para el genotipado de <i>Trp53</i> y <i>Trp73</i> .....	71
<b>Table 6.</b> Medio de cultivo de MEF.....	73
<b>Table 7.</b> Medio de cultivo de células P19 .....	74
<b>Table 8.</b> Medio de cultivo de células H1299 .....	75
<b>Table 9.</b> Medio de cultivo de iPSC .....	75
<b>Table 10.</b> Composición de la Tripsina-EGTA .....	76
<b>Table 11.</b> Medio de cultivo de células HM-1 (ESCs).....	76
<b>Table 12.</b> Medio de cultivo de EB 3D.....	84
<b>Table 13.</b> Composición de la solución de colágeno I.....	84
<b>Table 14.</b> Plásmidos utilizados .....	86
<b>Table 15.</b> Secuencias de los <i>primers</i> para el análisis por qRT-PCR .....	88
<b>Table 16.</b> <i>Primers</i> utilizados en CHIP .....	92
<b>Table 17.</b> 10 % <i>Resolving gel</i> (gel separador, 10 mL) .....	93
<b>Table 18.</b> 5 % <i>Stacking gel</i> (gel apilador, 5 mL) .....	93
<b>Table 19.</b> Anticuerpos primarios utilizados para inmunodetección .....	94
<b>Table 20.</b> Anticuerpos secundarios utilizados para inmunodetección.....	94

# Abreviaturas

<b>3D</b>	Tres dimensiones
<b>AFP</b>	Alfa feto proteína, <i>Alpha Feto Protein</i>
<b>AP</b>	Fosfatasa alcalina, <i>Alkaline Phosphatase</i>
<b>APS</b>	Persulfato Amónico
<b>βgeo</b>	Proteína de fusión βgalactosidasa con resistencia a neomicina
<b>BM1</b>	<i>Polycomb complex protein BMI-1</i>
<b>BMP</b>	Proteína morfogenética ósea, <i>Bone Morphogenetic Protein</i>
<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovina, <i>Bovine Serum Albumin</i>
<b>CAG</b>	Promotor de expresión constitutiva <i>Chicken Actin beta-Globin</i>
<b>CD31</b>	Clúster de diferenciación 31, <i>PECAM-1</i>
<i>Cdh1</i>	Gen <i>E-cadherina</i>
<b>CDK1</b>	Quinasa dependiente de ciclina 1, <i>Cyclin-Dependent Kinase 1</i>
<b>cDNA</b>	DNA complementario, <i>Complementary DNA</i>
<b>ChIP</b>	Inmunoprecipitación de cromatina, <i>Chromatin Immuno Precipitation</i>
<b>CiPSCs</b>	iPSCs generadas por reprogramación química
<b>CKI</b>	Inhibidor de CDK
<b>CMV</b>	Promotor CitoMegaLovirus
<b>Ct</b>	Ciclo umbral, <i>Cycles threshold</i>
<b>DAPI</b>	4', 6-diamino-2-fenilindol
<b>DBD</b>	Dominio central de unión al DNA, <i>DNA Binding Domain</i>
<b>DEPC</b>	Dietil pirocarbonato
<b>DKO</b>	Carente de dos genes, <i>Doble Knock Out</i>
<b>DMEM</b>	Medio de cultivo <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
<b>DMSO</b>	DiMetilSulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico, <i>DeoxyriboNucleic Acid</i>
<b>DNMT</b>	DNA metiltransferasa
<b>dNTPs</b>	Desoxinucleótidos trifosfato
<b>Dox</b>	Doxiciclina
<b>DPPA2</b>	<i>Developmental pluripotency associated 2</i>
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>E</b>	Número de día del desarrollo embrionario, <i>Embryonic day number</i>
<b>EB</b>	Cuerpo embriode, <i>Embryoid Body</i>

<b>EBC</b>	Tampón de lisis
<b>ECC</b>	Célula de carcinoma embrionario, <i>Embryonal Carcinoma Cell</i>
<b>ECG</b>	Célula troncal germinal embrionaria, <i>Embryonic Germ Cell</i>
<b>ECL</b>	Sustrato quimioluminiscente, <i>Enhanced ChemiLuminescence</i>
<b>EDTA</b>	Ácido EtilenDiaminoTetraAcético
<b>EGTA</b>	Ácido EtilenGlicolteTraAcético
<b>EMT</b>	Transición Epitelio Mesénquima, <i>Epithelial to Mesenchymal Transition</i>
<b>EpCAM</b>	Molécula de adhesión celular epitelial, <i>Epithelial Cell Adhesion Molecule</i>
<b>Epi</b>	Epiblasto
<b>EpiSC</b>	Célula troncal epiblastica, <i>Epiblast Stem Cell</i>
<b>ESC</b>	Célula troncal embrionaria, <i>Embryonic Stem Cell</i>
<b>ESRR<math>\beta</math></b>	<i>Oestrogen-related receptor-<math>\beta</math></i>
<b>FBS</b>	Suero fetal bovino, <i>Fetal Bovine Serum</i>
<b>FF</b>	Actividad luciferasa
<b>FGF</b>	Factor de crecimiento fibroblástico, <i>Fibroblast Growth Factor</i>
<b>FITC</b>	Conjugado de isotiocianato de fluoresceína
<b>Flk</b>	Kinasa de hígado fetal, <i>Fetal Liver Kinase 1</i>
<b>FR</b>	Actividad Renilla
<b>G418</b>	Geneticina
<b>GDF</b>	Factor de crecimiento y diferenciación, <i>Growth and Differentiation Factor</i>
<b>GFAP</b>	Proteína glial fibrilar ácida, <i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>
<b>GFP</b>	Proteína verde fluorescente, <i>Green Fluorescent Protein</i>
<b>GLIS1</b>	<i>Glis family zinc finger protein 1</i>
<b>GLS2</b>	Enzima Glutaminasa 2
<b>GMEM</b>	Medio de cultivo <i>Glasgow minimal essential medium</i>
<b>GSK3</b>	<i>Glycogen-synthase kinase-3</i>
<b>HADC</b>	Deacetilasa de histona
<b>HDM</b>	Demetilasa de histona
<b>HE</b>	Hematoxilina eosin
<b>HEPES</b>	Tampón 4-(2-hidroxietil)1-piperazina-etanosulfónico
<b>HIF</b>	Factor inducible por hipoxia, <i>Hypoxia Inducible Factor 1</i>
<b>HMT</b>	Metiltransferasa de histona
<b>IACUC</b>	The Institutional Animal Care and Use Committee
<b>ICM</b>	Masa celular interna del blastocisto, <i>Inner Cell Mass</i>



<b>Id</b>	Gen inhibidor de la diferenciación, <i>Inhibitor of differentiation gen</i>
<b>IF</b>	Inmunofluorescencia
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G
<b>IP</b>	Ioduro de Propidio
<b>IP</b>	InmunoPrecipitado
<b>iPSC</b>	Célula troncal pluripotente inducida, <i>induced Pluripotent Stem Cell</i>
<b>IRES</b>	<i>Internal Ribosome Entry Site</i>
<b>ITR</b>	Secuencia terminal repetida invertida, <i>Inverted Terminal Repeat sequence</i>
<b>KLF4</b>	<i>Krueppel-Like Factor 4</i>
<b>KO</b>	Carente de un gen, <i>Knock Out</i>
<b>LB</b>	Tampón de carga, <i>Loading Buffer</i>
<b>LB</b>	Medio de crecimiento bacteriano <i>Luria Bertani</i>
<b>LIF</b>	Factor inhibidor de la leucemia, <i>Leukemia Inhibitory Factor</i>
<b>M</b>	Molar
<b>MEF</b>	Fibroblasto embrionario de ratón, <i>Mouse Embryonic Fibroblast</i>
<b>mESC</b>	ESC de ratón, <i>mouse ESC</i>
<b>MET</b>	Transición Mesénquima-Epitelio, <i>Mesenchymal to Epithelial Transition</i>
<b>miR</b>	microRNA
<b>mM</b>	miliMolar
<b>MML</b>	<i>Mixed lineage leukemia</i>
<b>MOPS</b>	Tampón ácido 3[N-morfolino]propanosulfónico
<b>mRNA</b>	RNA mensajero, <i>messenger RiboNucleic Acid</i>
<b>NBT/BCIP</b>	NBT: nitroazul de tetrazolio/BCIP: 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato
<b>NEAAs</b>	Aminoácidos no esenciales
<b>NOD</b>	Ratón diabético no obeso, <i>Non-obese diabetic</i>
<b>Nog</b>	NOGGIN
<b>NP40</b>	Nonidet-P40, octil-fenoxi-poli-etoxil-etanol
<b>NR5A1/2</b>	<i>Nuclear receptor subfamily 5 group A member 1/2</i>
<b>NSC</b>	Célula troncal neural, <i>Neural Stem Cell</i>
<b>NSG</b>	Ratones <i>Non Scid Gamma</i>
<b>°C</b>	Grado centígrado
<b>OCT4</b>	Factor de transcripción de unión a octámero, <i>Octamer-binding transcription factor 4</i>
<b>OD</b>	Dominio de oligomerización, <i>Oligomerization Domain</i>

<b>OSK</b>	OCT3/4, SOX2, KLF4
<b>OSKM</b>	OCT3/4, SOX2, KLF4, MYC
<b>Pb</b>	Pares de bases
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino, <i>Phosphate Buffer Saline</i>
<b>PcG</b>	<i>Polycomb</i>
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa, <i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>PD</b>	Duplicaciones poblacionales, <i>Population Doubling</i>
<b>PDGF-B</b>	<i>Platelet-Derived Growth Factor B</i>
<b>PECAM-1</b>	Molécula de adhesión celular endotelial plaquetaria, <i>Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule</i>
<b>PFA</b>	para-Formaldehído
<b>PGC</b>	Célula germinal primordial, <i>Primordial Germ Cell</i>
<b>pH</b>	Potencial de hidrógeno
<b>PI3K</b>	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
<b>PLB</b>	Tampón de lisis pasivo
<b>PMSF</b>	Fluoruro de sulfonilmetilfenilo
<b>PrE</b>	Endodermo primitivo
<b>qRT-PCR</b>	RT-PCR cuantitativa en tiempo real, <i>quantitative Real Time RT-PCR</i>
<b>R</b>	Secuencia <i>reverse</i> o antisentido
<b>Rb</b>	Retinoblastoma
<b>RE</b>	Elemento de respuesta, <i>Response Element</i>
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico, <i>RiboNucleic Acid</i>
<b>RNAseA</b>	Ribonucleasa A
<b>ROS</b>	Especie reactiva de oxígeno, <i>Reactive Oxygen Specie</i>
<b>rpm</b>	revoluciones por minuto
<b>RT</b>	Temperatura ambiente, <i>Room Temperature</i>
<b>RT-PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa, <i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
<b>rtTA</b>	Proteína transactivadora reversa controlada por tetraciclina, <i>reverse tetracycline TransActivator</i>
<b>S</b>	Secuencia <i>forward</i> o sentido
<b>SALL4</b>	<i>Sal-like protein 4</i>
<b>SAM</b>	Dominio alfa estéril, <i>Sterile Alpha Domain</i>
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico

<b>SEM</b>	Error estándar de la media, <i>Standard Error Mean</i>
<b>SOX2</b>	<i>SRY box-containing factor 2</i>
<b>SSEA</b>	Antígeno embrionario específico de estadio, <i>Stage-Specific Embryonic Antigen</i>
<b>STAT3</b>	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
<b>TAD</b>	Dominio de transactivación, <i>TransActivation Domain</i>
<b>TAE</b>	Tampón Tris-Acético-EDTA
<b>TBS-T</b>	Tampón salino Tris-Tween 20
<b>TBX3</b>	<i>Transduction of T-box transcription factor</i>
<b>TCL1</b>	<i>T-cell lymphoma breakpoint 1</i>
<b>TE</b>	Tampón Tris-EDTA
<b>TEMED</b>	N,N,N,N'-tetrametiletilendiamina
<b>Tert</b>	Enzima telomerasa
<b>TetO</b>	Secuencia operadora de tetraciclina
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento transformante beta, <i>Transforming Growth Factor beta</i>
<b>TRIS</b>	Tri-(hidroximetil)aminometano
<b>Tsg</b>	<i>Twisted Gastrulation</i>
<b>TSP-1</b>	<i>Thrombospondin-1</i>
<b>Tuj-1</b>	$\beta$ III tubulina clase III específica de neurona, <i>neuron-specific class III beta-tubulin</i>
<b>UTF1</b>	Undifferentiated embryonic cell transcription factor 1
<b>V</b>	Voltio/segundo
<b>VEGF-A</b>	Factor de crecimiento endotelial vascular A, <i>Vascular Endothelial Growth Factor A</i>
<b>WB</b>	<i>Western blot</i>
<b>WT</b>	Genotipo silvestre, <i>Wild Type</i>
<b>X-Gal</b>	5-bromo-4-cloro-indolyl- $\beta$ -galactopiranosido



# Introducción



## 1. DESARROLLO EMBRIONARIO Y CELULAS TRONCALES EN RATÓN

El desarrollo de mamíferos es un proceso que comienza tras la fecundación del ovocito para dar lugar a la formación del cigoto unicelular, y termina con el establecimiento de todos los tejidos y tipos celulares especializados que forman el nuevo individuo, incluidos los gametos (Wang and Dey, 2006). Por ello, en estadios tempranos del desarrollo, el embrión debe presentar células con la potencialidad suficiente para generar todos los tipos celulares que componen el organismo. La potencialidad de estas células troncales se irá restringiendo a lo largo del desarrollo, a medida que se determina el "destino" de cada célula ("cell fate") y se ejecutan programas de diferenciación específicos, regulados a nivel genético y epigenético (Hemberger *et al.*, 2009).

### 1.1 ESPECIFICACIÓN DE LAS PRIMERAS ESTIRPES EN EL EMBRIÓN DE RATÓN

Los principales eventos previos a la implantación del embrión en el útero están conservados entre las especies de mamíferos (Palmer and Kaldis, 2016). Después de la fecundación, el cigoto sufre divisiones celulares sucesivas que conducen a la formación de un embrión de 8 células en el día 2,5 del desarrollo embrionario (E2,5) (Figura 1). Estos blastómeros establecen uniones intercelulares (adherentes y estrechas), produciéndose los procesos de compactación y polarización (Saiz and Plusa, 2013). Las posteriores divisiones, simétricas y asimétricas, dan lugar a la mórula (16-32 células), en la que es posible distinguir unos blastómeros externos, polarizados, y otros blastómeros internos no-polarizados, en los que se activan redes transcripcionales diferentes (Leung *et al.*, 2016). En ese momento se produce lo que, clásicamente, se ha conocido como el primer evento de especificación en el desarrollo del ratón o "*first cell fate decision*" (Ralston and Rossant, 2005). Como resultado del mismo, los blastómeros de la capa exterior de la mórula tardía forman un tejido de tipo epitelial, denominado trofoectodermo (TE), que sella el interior de la mórula rodeando a las células pluripotentes de la masa celular interna (ICM). La difusión de agua hacia el interior de la mórula, en función de gradientes osmóticos y del transporte por acuaporinas (Bedzhov *et al.*, 2014), facilita la formación y expansión de una cavidad interior o blastocele, con lo que el embrión de ratón se convierte en un blastocisto (E3,5), inicialmente compuesto de la ICM y del TE.

El TE originará, en estadios posteriores del desarrollo, los componentes de la placenta, mientras que en la ICM tiene lugar el segundo evento de especificación o

"second cell fate decision" del embrión (Ralston and Rossant, 2005), por el que las células de la ICM se diferencian bien a epiblasto (Epi), bien a endodermo primitivo (PrE) en el caso de la capa de células que queda en contacto con el blastocelo. El endodermo primitivo, o hipoblasto, dará lugar al endodermo visceral y parietal del saco vitelino, mientras que el epiblasto generará el embrión en sí mismo, así como el mesodermo extraembrionario del saco vitelino, el alantoides y el amnios (Tam *et al.*, 2007).

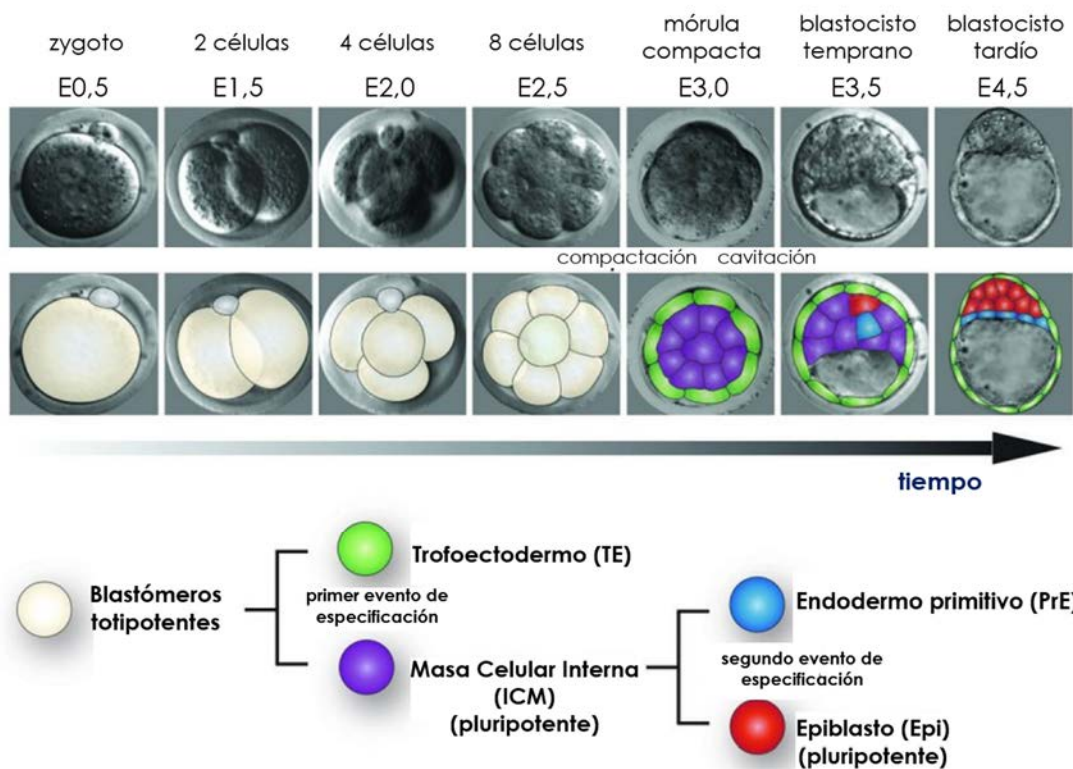


Figura 1. Especificación de las primeras estirpes en el desarrollo embrionario de ratón. Adaptada de Xenopoulos *et al.*, 2012.

La especificación del epiblasto y del endodermo primitivo ocurre antes de la implantación del blastocisto en el útero (E4,5, embrión de más de 100 células). Sin embargo, la heterogeneidad de la ICM, en lo que a perfiles moleculares se refiere, ha sido demostrada en estadios anteriores, existiendo una expresión en mosaico de marcadores de Epi y PrE (conocida como "patrón en sal y pimienta"), que ya se detecta en la transición entre 32-64 células (Chazaud *et al.*, 2006; Plusa *et al.*, 2008). Es interesante destacar que, aunque la segregación entre TE e ICM, así como entre PrE y Epi, son considerados como eventos secuenciales en el desarrollo del embrión, existen

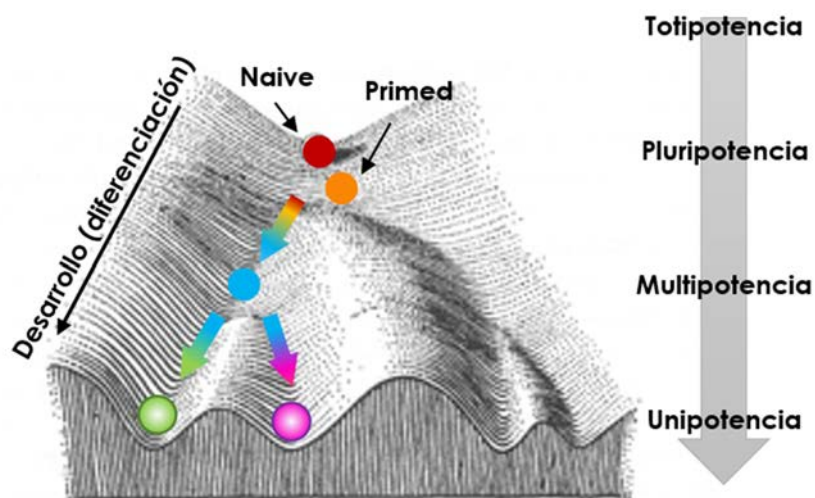


evidencias que indican que no son eventos independientes, sino un continuo interrelacionado (Mihajlović *et al.*, 2015). Adicionalmente, se ha puesto de manifiesto que estas primeras *cell-fate decisions* en el embrión podrían producirse más temprano de lo descrito, puesto que los blastómeros del embrión en estadio de 4 células difieren a nivel epigenético (Torres-Padilla *et al.*, 2007) y, ya en ese estadio, se inicia la toma de “decisiones” hacia una estirpe específica (Goolam *et al.*, 2016; Tabansky *et al.*, 2013).

En el día E5,0, el blastocisto se expande y tiene lugar la eclosión a través de la zona pelúcida y la implantación en el útero (Wang and Dey, 2006). Durante el período inmediatamente posterior a la implantación, se produce un cambio drástico del embrión en tamaño y forma. El epiblasto y el endodermo primitivo crecen hacia el blastocele para formar una estructura elongada, denominada “*the egg cylinder*” (E5,5) (Arnell and Tam, 2012), constituida por una columna de tres tejidos: el ectodermo extraembrionario (derivado del TE), el epiblasto (un epitelio en forma de copa derivado de la ICM) y, envolviendo estos dos tejidos, el endodermo extraembrionario (derivado del PrE). A través del proceso de gastrulación, las células del epiblasto constituirán las tres capas germinales del embrión y producirán el embrión propiamente dicho (Tam and Loebel, 2007), mientras que el resto contribuirán a los tejidos extraembrionarios, que aportan no sólo soporte físico y los nutrientes al embrión, sino que también son importantes para los movimientos celulares y la formación de patrones en los tejidos embrionarios durante la gastrulación (Wu *et al.*, 2016).

## **1.2 POTENCIAL DE DESARROLLO DE LAS CÉLULAS TRONCALES: PLURIPOTENCIA Y CAPACIDAD DE AUTO-RENOVACIÓN**

A finales de los años 50, Conrad Waddington propuso un modelo que explicaba cómo el potencial de desarrollo o potencialidad de una población celular (que ilustraba como una canica) disminuye a medida que se reduce el rango de posibles “destinos” a los que las células pueden optar y las células se comprometen hacia un determinado linaje, hasta llegar a un estado de diferenciación terminal (Smith, 2006). Este modelo recibe el nombre de modelo del paisaje epigenético de Waddington (revisado por (Noble, 2015), Figura 2), ya que el proceso de desarrollo se equipara con el recorrido de la canica rodando a lo largo de una colina (paisaje epigenético), eligiendo entre diferentes rutas (decisiones celulares) y valles (linajes celulares) hasta que la canica alcanza la base de la colina (diferenciación terminal).



**Figura 2. Proceso de desarrollo según el modelo del paisaje epigenético de Waddington.** Adaptado de Hemberger *et al.*, 2009.

De acuerdo con esa potencialidad, existen varios términos para clasificar las poblaciones de células troncales que surgen durante el desarrollo (Hochedlinger and Plath, 2009). Conviene destacar que sólo el cigoto y los blastómeros embrionarios tempranos son considerados inequívocamente **totipotentes**, ya que retienen la capacidad de dar lugar a todos los tejidos embrionarios y extraembrionarios (Tarkowski *et al.*, 2010). En el embrión, las células de la ICM del blastocisto y las del epiblasto se caracterizan por ser **pluripotentes**, entendiendo por pluripotencia la capacidad para originar todos los tipos celulares de las tres capas germinales embrionarias, pero no el linaje trofoblástico extraembrionario (Manor *et al.*, 2015).

En estadios posteriores del desarrollo y en los organismos adultos, las células troncales que residen en los tejidos tienen una potencialidad más restringida, pudiendo sólo diferenciarse a tipos celulares de alguna de las tres capas germinales, por lo que se definen como **multipotentes** (Hochedlinger and Plath, 2009). Estas células troncales adultas se localizan en microambientes especializados, denominados nichos, y tienen como función el mantenimiento de la homeostasis tisular a lo largo de la vida de los organismos (Mimeault and Batra, 2006).

Aunque la pluripotencia *in vivo* es un estado transitorio de las células durante la embriogénesis temprana (Weinberger *et al.*, 2016), es posible establecer y mantener *in vitro* cultivos de células troncales pluripotentes (PSCs) a partir de diferentes estadios del desarrollo embrionario, pudiendo hablarse de células troncales embrionarias (ESCs), células troncales epiblasticas (EpiSCs), y células germinales embrionarias (EGCs)

(revisado en el Apartado 1.3). Todas estas células troncales presentan dos rasgos distintivos que las definen. Uno de ellas es su capacidad de **auto-renovación**, gracias a la cual pueden proliferar indefinidamente *in vitro* dando lugar a nuevas células troncales y manteniéndose en un estado no diferenciado mediante condiciones de cultivo específicas (Smith, 2006; Suda *et al.*, 1987; Weinberger *et al.*, 2016). Además, las PSCs se caracterizan por su **pluripotencia**, o capacidad de diferenciación a todos los tipos celulares que forman el organismo adulto (Nagy *et al.*, 1993).

Las PSCs se han convertido en una herramienta muy relevante en Biotecnología, Biomedicina o Biología del Desarrollo; por ello, resulta esencial disponer de ensayos que permitan evaluar su pluripotencia, tanto *in vitro* como *in vivo* (Cahan and Daley, 2013). Junto con la caracterización de la morfología y el análisis de marcadores y perfiles genéticos del estado pluripotente (“stemness”), existen diversos ensayos para comprobar la capacidad de diferenciación de las PSCs (Jaenisch and Young, 2008), que aparecen recogidos en la Tabla 1.

**Tabla 1. Ensayos utilizados para evaluar la pluripotencia de las PSCs.**

	<b>Ensayo</b>	<b>Abordaje experimental</b>
<b>In vitro</b>	Diferenciación mediante la formación de cuerpos embrioides (EBs)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cultivo en suspensión de las PSCs, que forman agregados multicelulares con forma esférica, o EBs, que recapitulan los primeros estadios del desarrollo embrionario. En ausencia del factor inhibidor de leucemia (LIF) en el medio de cultivo, deben diferenciarse a cualquier tipo celular de las tres capas germinales.</li> <li>- Análisis de la diferenciación mediante la expresión de marcadores específicos ectodermo, mesodermo o endodermo</li> </ul>
	Formación de teratomas	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Inyección subcutánea de las PSCs en ratones inmunodeficientes y desarrollo de tumores, que deben contener células diferenciadas pertenecientes a las tres capas germinales.</li> <li>- Análisis histopatológico de los tumores obtenidos</li> </ul>
<b>In vivo</b>	Generación de ratones quiméricos y contribución a la línea germinal	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Las PSCs, inyectadas por ejemplo en blastocistos de ratón, deben incorporarse a la ICM del blastocisto y dar lugar al nacimiento de quimeras, contribuyendo a todos los tejidos del organismo, incluyendo los gametos.</li> <li>- Cruzamiento prueba de los ratones quiméricos para conocer si ha habido transmisión del genotipo de las PSCs a través de la línea germinal y, por tanto, capacidad de las células testadas para generar células germinales funcionales</li> </ul>
	Complementación de embriones tetraploides	Los embriones tetraploides (4n) no son capaces de completar el desarrollo normal, pero sí contribuyen al tejido extraembrionario complementando la pluripotencialidad de las PSCs (2n), que deben ser capaces de dirigir de forma autónoma el desarrollo completo del embrión

El análisis de la **pluripotencia *in vitro*** se lleva a cabo diferenciando las PSCs mediante la formación de cuerpos embrioides (EBs) y analizando la expresión de marcadores específicos de ectodermo, mesodermo o endodermo (Kurosawa, 2007). Entre los ensayos de **pluripotencia *in vivo***, una de las generalmente utilizadas es el ensayo de formación de teratomas (Gropp *et al.*, 2012). Esta prueba es la única disponible *in vivo* para testar la pluripotencia de las PSCs humanas, aunque en el caso de las PSCs murinas, se dispone de otros ensayos adicionales. Uno de los más exigentes es la generación de ratones quiméricos con contribución a la línea germinal (Arkell and Tam, 2012) y, aunque sin duda, el ensayo más estricto para comprobar la pluripotencia *in vivo* es la complementación de embriones tetraploides (Nagy *et al.*, 1990; Tanaka *et al.*, 2009), que pueden generarse mediante la electrofusión de embriones 2n en estado de dos células (Eakin and Hadjantonakis, 2006).

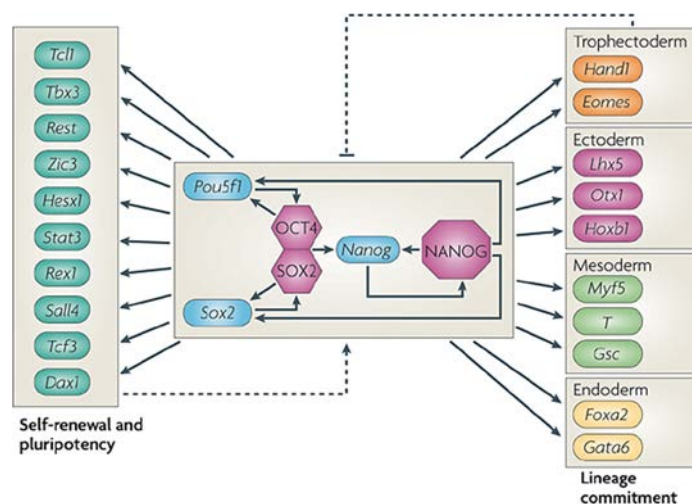
### **1.3 REGULACIÓN MOLECULAR DE LA PLURIPOTENCIA Y LA CAPACIDAD DE AUTO-RENOVACIÓN**

Adicionalmente a los ensayos funcionales descritos, la definición de la auto-renovación y la pluripotencia de las PSCs en términos moleculares requiere el conocimiento de los factores de transcripción, vías de señalización, etc., que regulan los programas de expresión génica de estas células. La identificación de estos factores es uno de los focos de interés en la investigación con células troncales, puesto que el balance dinámico que existe entre todos estos factores determina la identidad celular (Tee and Reinberg, 2014). A pesar de que las investigaciones con cultivos de ESCs, comenzaron hace más de treinta años, todavía son muchos los aspectos que se desconocen, particularmente en lo que se refiere a la integración de los diferentes "circuitos" de control de la pluripotencia (Jaenisch and Young, 2008).

#### **A) REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL**

La red esencial de regulación transcripcional responsable del mantenimiento de la capacidad de auto-renovación y la pluripotencia (Figura 3) está dirigida por los **factores de transcripción** OCT4, NANOG y SOX2 ("*core transcriptional network*") (Loh *et al.*, 2006). Estos factores son fundamentales para el desarrollo embrionario temprano de mamíferos y el mantenimiento de la identidad de las ESCs. Asimismo, el establecimiento de las tres capas germinales del embrión depende en gran medida de ellos (Smith *et al.*, 2016). En

concreto, OCT4 dirige la aparición del mesodermo y reprime la del trofoectodermo, mientras que SOX2 y NANOG promueven la especificación hacia ectodermo y endodermo, respectivamente, al tiempo que reprimen la aparición de los restantes linajes (Loh *et al.*, 2006).



**Figura 3. Red esencial de regulación transcripcional de la pluripotencia.** Tomado de MacArthur *et al.*, 2009.

El primer regulador identificado fue **OCT4** (*Octamer Binding Protein 4*), también conocido como **POU5F1** (*POU Class 5 Homeobox 1*) (Rosner *et al.*, 1990). Se trata de un factor de transcripción de la familia POU de proteínas homeodominio, que se une a una secuencia octámero en el DNA (Niwa *et al.*, 2000). La expresión de *Oct4* es un elemento clave en la especificación de la ICM del epiblasto (Kellner and Kikyo, 2010); de hecho, en los ratones carentes de *Oct4*, las células de la ICM pierden su pluripotencialidad y adquieren características de células del TE (Nichols *et al.*, 1998). Los niveles de expresión de OCT4 en la célula necesitan estar regulados dentro de un estrecho margen para el mantenimiento de la auto-renovación y pluripotencia, ya que tanto la sobre-expresión como el silenciamiento con respecto a un determinado umbral, inician la diferenciación hacia el linaje trofoblástico o hacia el endodermo primitivo y mesodermo, respectivamente (Karwacki-Neisius *et al.*, 2013; Niwa *et al.*, 2000).

**NANOG**, que recibe su nombre por la antigua leyenda celta de Tír na nÓg, o Tierra de la Eterna Juventud (Chambers *et al.*, 2003), es un factor de transcripción *homeobox* que desempeña un papel esencial en el mantenimiento de la pluripotencia. Las células ESCs carentes de *Nanog* son más propensas a la diferenciación, aunque conservan la capacidad de auto-renovación (Chambers *et al.*, 2007; Hatano *et al.*, 2005); es

interesante destacar que NANOG puede mantener la pluripotencia de las ESCs murinas incluso en ausencia del factor inhibidor de leucemia (LIF, *leukemia inhibitory factor*) en el medio de cultivo (Chambers *et al.*, 2003). En el embrión, la expresión de *Nanog* se activa en el estado de 8 células y es necesaria para que tenga lugar la especificación del epiblasto (Boiani and Scholer, 2005; Mitsui *et al.*, 2003).

**SOX2** (*SRY box-containing factor 2*) es el otro integrante de la red esencial de regulación transcripcional de la pluripotencia (Liu *et al.*, 2007). Los estudios de expresión génica en células individuales en los primeros estadios embrionarios (Guo *et al.*, 2010), han evidenciado que este gen es uno de los primeros marcadores de la ICM. La expresión de *Sox2* se activa específicamente en los blastómeros internos de la mórula, a partir del estadio de 8-16 células. Posteriormente, su expresión disminuye en aquellas células de la ICM que contribuyen al endodermo primitivo, pero permanece activa en las células del TE (al contrario de lo que sucede con *Oct4*) (Xenopoulos *et al.*, 2012). En ausencia de *Sox2* (ratones *Sox2*<sup>-/-</sup>), se produce la muerte inmediata de los embriones después de la implantación (Avilion *et al.*, 2003).

OCT4, SOX2 y NANOG auto-regulan su propia expresión, y también pueden regularse entre ellos de forma coordinada, formando circuitos de retroalimentación (Chambers and Tomlinson, 2009; Kuroda *et al.*, 2005). En particular, SOX2 interacciona directamente con OCT4 para formar un complejo OCT4-SOX2 que regula positivamente la expresión de *Oct4*, *Sox2* y *Nanog* (MacArthur *et al.*, 2009). Igualmente, NANOG también puede interaccionar directamente con OCT4 (Loh *et al.*, 2006) y SOX2 (Gagliardi *et al.*, 2013), controlando así su expresión, y manteniéndose la identidad de las ESCs a través de una red auto-reguladora (Greenow and Clarke, 2012).

Los estudios de interacción DNA-proteínas a nivel genómico han puesto de manifiesto que estos factores de transcripción a menudo co-localizan en las regiones reguladoras de numerosos genes diana (Loh *et al.*, 2006), donde cooperan funcionalmente para activar la expresión de genes asociados con la capacidad de pluripotencia y auto-renovación (Boyer *et al.*, 2005). Por otro lado, pueden reprimir la expresión de genes diana asociados con procesos de diferenciación, controlando así el destino final hacia linajes específicos (Figura 3) (MacArthur *et al.*, 2009).

Entre las dianas transcripcionales de OCT, SOX2 y NANOG también se han identificado otros factores de transcripción que se expresan durante el desarrollo embrionario temprano y que, en los últimos años, han ido adquiriendo un papel cada vez más relevante como reguladores de la pluripotencia. Entre estos genes se incluyen

*Sall4, Stat3, Smad1, Rex1, Uff1, Glis1, Dax1, Esrrb, Tcf4, Klf4, Myc, Tbx3, Tcl1, Rif1, Nac1*, (Chen *et al.*, 2008; Greenow and Clarke, 2012; Lee *et al.*, 2013). A su vez, estos factores pueden unirse a los promotores de *Oct4, Sox2* y *Nanog*, regulando su expresión, y dando lugar al establecimiento de circuitos adicionales de retroalimentación. Se ha descrito la unión de, al menos, 14 de estos factores de transcripción al promotor de *Oct4*, y de 9 factores en el caso de *Nanog* (Ng and Surani, 2011).

## **B) VÍAS DE SEÑALIZACIÓN**

El conocimiento de las vías de señalización que regulan la pluripotencia de las ESCs (Figura 4) ha resultado fundamental para mejorar las condiciones de derivación y cultivo de estas células (Guofeng Han, 2013).

El mantenimiento de la auto-renovación y del estado indiferenciado de las ESCs murinas *in vitro* requiere de la vía de señalización **JAK**, que es activada por LIF (Niwa, 2007). Tras la unión de LIF a su receptor, se recluta gp130, formándose un heterodímero encargado de la fosforilación y activación de la quinasa JAK (*Janus kinase*), que activa la vía de señalización de **STAT3** (*signal transducer and activator of transcription 3*) y **PI3K/Akt** (*Phosphoinositide 3-kinase/ protein kinase Akt*) (Liu *et al.*, 2007). Estas vías son importantes para el mantenimiento de la proliferación, auto-renovación y pluripotencia de las ESCs. Entre los genes diana de STAT3 se encuentran numerosos genes asociados con la pluripotencia, entre los que están *Oct4, Sox2, Klf4* y *Nanog*. PI3K/Akt es la vía responsable del mantenimiento de la auto-renovación de las ESCs y activa la expresión de genes relacionados con proliferación, como *c-Myc* (Williams *et al.*, 1988).

La fosforilación de JAK también induce la activación de la vía **MAPK/Erk** (*mitogen-activated protein kinase/extracellular-signal-regulated kinase*), implicada en la diferenciación de las ESCs. Esta vía también puede ser activada a través de la cascada de señalización inducida por los factores de crecimiento fibroblástico (**FGF**, *Fibroblast growth factors*), que a su vez también pueden activar la vía PI3K/Akt (Kulcenty *et al.*, 2015).

La vía de señalización del factor de crecimiento transformante beta (TFG- $\beta$ , *transforming growth factor beta*) también desempeña un papel principal en las ESCs. En ratón, las proteínas morfogenéticas óseas **BMP4** regulan el mantenimiento de la pluripotencia de las ESCs mediante la inducción de los genes inhibidores de la diferenciación de la familia *Id* (Ying *et al.*, 2003). BMP4 realiza esta función a través de la vía de SMAD. Cuando BMP4 se une a sus receptores, estos promueven la fosforilación

de los mediadores de la vía, las proteínas SMAD1/5/8, que tras unirse a SMAD4, pasan al núcleo para regular transcripcionalmente genes diana como *Id1*, *Id2*, *Id3*, *Gata2* y *Fgfr2*, importantes en el control de la diferenciación, crecimiento y proliferación celular (Attisano and Wrana, 2002; Miyazono *et al.*, 2005).

Otra vía de señalización importante en el control de la pluripotencia es **Wnt/ $\beta$ -catenina** (Kuhl and Kuhl, 2013). La vía canónica de Wnt se activa tras la unión de proteínas Wnt al receptor de *Frizzled* en la membrana celular. Esta activación da lugar a la inhibición de la quinasa GSK3 (*glycogen-synthase kinase-3*), de tal manera que se inhibe la fosforilación y la degradación de la  $\beta$ -catenina en el citoplasma celular, por lo que la  $\beta$ -catenina no fosforilada se acumula gradualmente y se trasloca hacia al núcleo para inducir la expresión de genes diana *c-Myc*, *c-Jun*, *Ccnd1*, *Ppard*, *Fosl1* y *Uterin*, relacionados con el crecimiento y la proliferación celular (Boiani and Scholer, 2005).

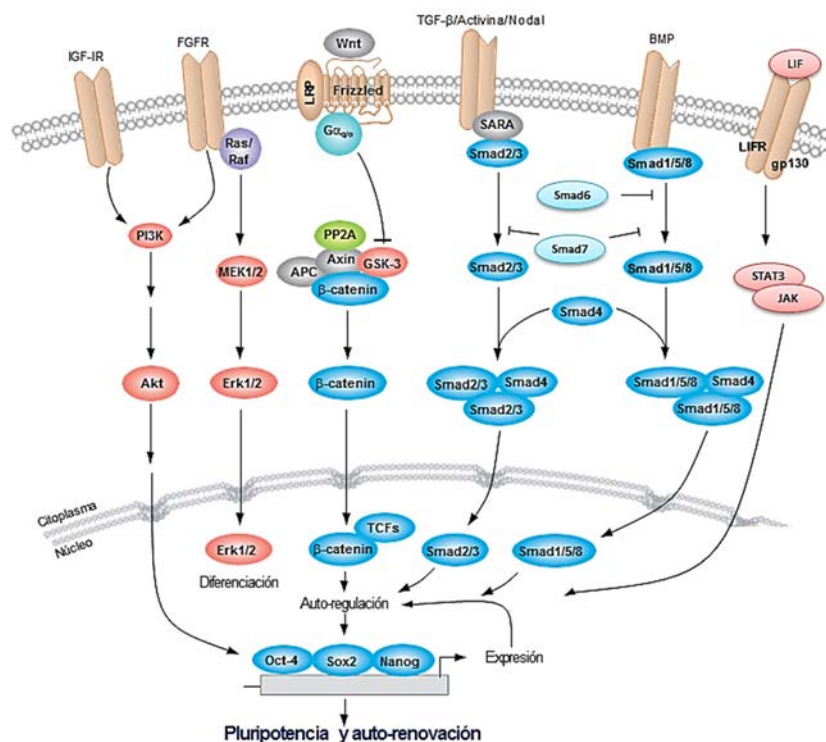


Figura 4. Vías de señalización implicadas en la regulación de la pluripotencia y auto-renovación.



### C) MICRORNAs (miRs)

Los microRNAs (miRs) son pequeños RNAs ( $\approx 22$  pares de bases) de cadena sencilla no codificante que modulan la expresión de genes mediante la inhibición de la traducción o degradación del mRNA (Heinrich and Dimmeler, 2012). En las ESCs, los miRs regulan genes relacionados con el mantenimiento de la pluripotencia, la regulación del ciclo celular y proliferación celular (Figura 5), y su expresión está regulada por la red esencial de regulación transcripcional de las ESCs: NANOG, OCT4, SOX4 (Rosa and Brivanlou, 2013).

Entre todos los miRs identificados en las ESCs, la familia **miR-302** compuesta por los grupos miR-302 y miR-290 es la más expresada (Rosa and Brivanlou, 2013). miR-302 es de los más importantes, representa casi dos tercios de todos los miRs activos en las ESCs, mientras que su expresión disminuye en células diferenciadas. En concreto, está involucrado en la regulación de las vías de señalización del factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) y BMP (Tiscornia and Izpisua Belmonte, 2010). Los factores de transcripción OCT4, SOX2 y NANOG, junto con esta familia reprimen la transcripción de miRs específicos de linaje, como los miRs neurales, miR-9 y miR-124, o el miR-155 específico de mesodermo (Marson *et al.*, 2008). Con respecto a su papel en la regulación del ciclo celular en las ESCs, se ha demostrado que el bloqueo de la familia miR-302 resulta en la sobreexpresión de los genes *p21<sup>CIP1</sup>*, *Rbl2* y *Lats2*, de hecho, se ha descrito que estos miRs pueden unirse específicamente, y reprimir su expresión, regulando así la transición de G1/S (Wang and Blelloch, 2009)

Por el contrario, también existen miRs que bloquean la pluripotencia. Este es el caso de **miR-34**, que reprime genes diana como *Sox2* y *Nanog* (Choi *et al.*, 2011), o la familia de **miRs let-7**, activa en células diferenciadas y reprimida en células pluripotentes (Viswanathan *et al.*, 2008). La expresión de let-7 promueve la diferenciación neural en las ESCs (Hammell *et al.*, 2009; Schwamborn *et al.*, 2009) e inhibe la expresión de factores de pluripotencia, incluyendo LIN28, MYC y SALL4, (Heinrich and Dimmeler, 2012; Rosa and Brivanlou, 2013), además de reguladores críticos del ciclo celular, como CDK6, CDC25A y ciclina D, revisado en (Mallanna and Rizzino, 2010).

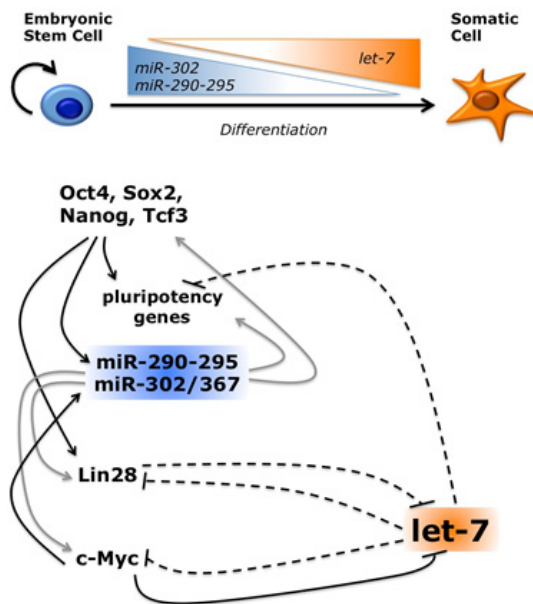


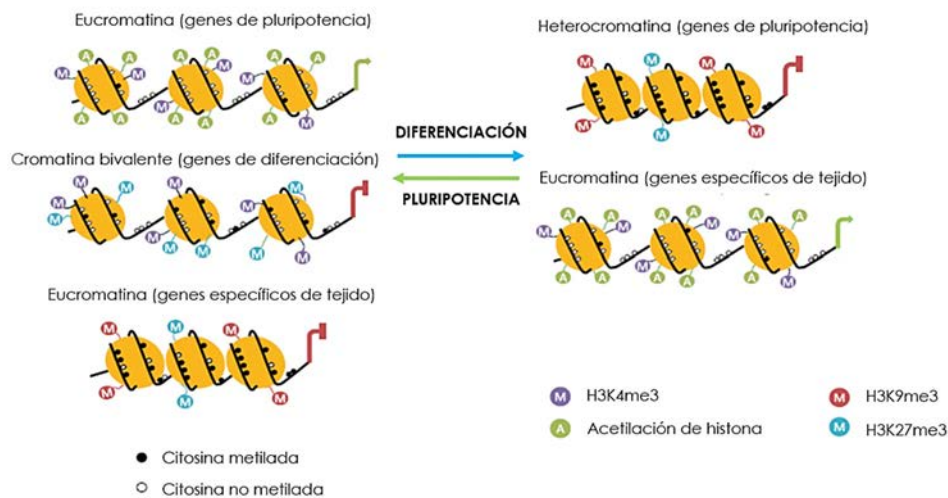
Figura 5. miRs implicadas en la regulación de la pluripotencia. Tomado de Rosa and Brivanlou, 2013.

#### D) REGULACIÓN EPIGENÉTICA

La organización de la estructura de la cromatina y las modificaciones epigenéticas son elementos clave para la regulación molecular de la pluripotencia (Boyer *et al.*, 2006). La cromatina de las PSCs requiere una configuración transcripcionalmente permisiva y dinámica, que posibilite tanto el mantenimiento de la pluripotencia, como la capacidad de respuesta a las señales externas pro-diferenciadoras (Gaspar-Maia *et al.*, 2011; Meshorer *et al.*, 2006). Las modificaciones epigenéticas más representativas comprenden metilaciones covalentes en el DNA, cambios en el posicionamiento de los nucleosomas y modificaciones de histonas (Brix *et al.*, 2015). Estas últimas son realizadas por las enzimas metiltransferasas (HMTs), acetiltransferasas (HATs), demetilasas (HDMs) y deacetilasas de histonas (HDACs) (Portela and Esteller, 2010).

Los complejos proteicos de los grupos PcG (*Polycomb*) y MML (*mixed lineage leukemia*, ortólogo en mamíferos de *Trithorax* de *Drosophila*) son dos de las maquinarias epigenéticas mejor caracterizadas implicadas en el mantenimiento de la auto-renovación y la pluripotencia de las ESCs (Aloia *et al.*, 2013). El complejo represor de la cromatina PRC2 (*Polycomb repressive complex 2*) (Boyer *et al.*, 2006; Niwa, 2007), funciona como una metiltransferasa de histonas que trimetila la histona H3 en el residuo de lisina 27 (H3K27me3). Esta marca está asociada con genes transcripcionalmente

inactivos (marca “represora”) (Cao and Zhang, 2004) y, en general, su distribución es excluyente con las marcas de trimetilación en el residuo 4 (H3K4me3), que están asociadas con regiones transcripcionalmente activas (marca “activadora”) (Szutorisz and Dillon, 2005). Sin embargo, se ha observado que ambas marcas, activadoras y represoras, pueden co-localizar en determinadas regiones de la cromatina de las ESCs (Figura 6), a las que se ha denominado **dominios bivalentes** (Azuara *et al.*, 2006; Bernstein *et al.*, 2006).



**Figura 6. Representación esquemática de la organización de la estructura de la cromatina y las modificaciones epigenéticas asociadas a la pluripotencia y la diferenciación de las ESCs.** Adaptado de Gładych *et al.*, 2015.

La estructura bivalente de la cromatina es importante para el mantenimiento de la pluripotencia, puesto que proporciona un estado de mayor plasticidad para el control rápido de la expresión génica durante el desarrollo (Voigt *et al.*, 2013). En este contexto, las marcas H3K4me3 y H3K27me3 permiten discriminar, eficientemente, entre los genes que se están expresando (H3K4me3), aquellos reprimidos de forma estable (H3K27me3), y los que se encuentran silenciados pero que pueden ser rápidamente activados en función de las señales pro-diferenciadoras (H3K4me3 y H3K27). Estos genes, en los que coexisten ambas marcas, reciben el calificativo de “poised”, por estar preparados para su activación transcripcional, revisado por (Gładych *et al.*, 2015). Los estudios epigenómicos han puesto de manifiesto que muchos de estos dominios bivalentes se encuentran en genes diana de OCT4, SOX y NANOG (Niwa, 2007), y que los complejos *Polycomb* en las ESCs se localizan, predominantemente, en genes reguladores clave

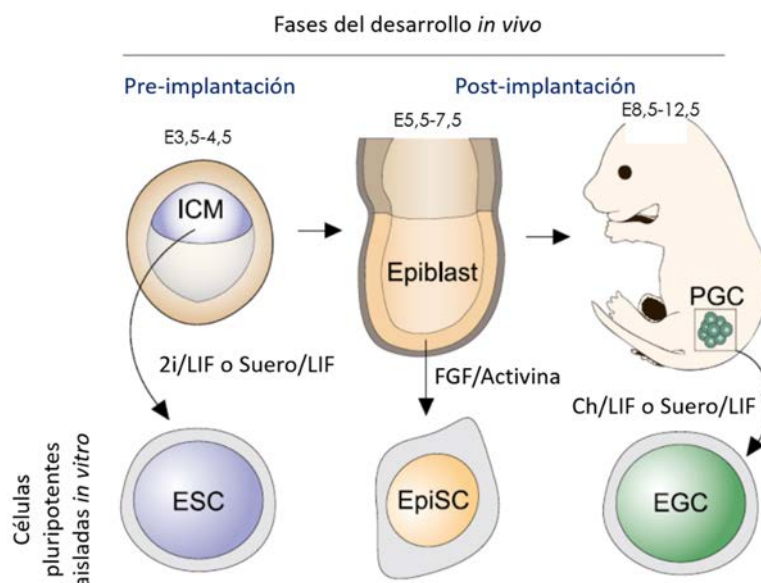
para el desarrollo, que se encuentran silenciados en las células indiferenciadas, y deben activarse durante la diferenciación (Schuettengruber and Cavalli, 2009).

Las modificaciones post-traduccionales de las histonas generalmente preceden a los cambios de metilación en el DNA (Apostolou and Hochedlinger, 2013). Este mecanismo epigenético, complementario a la modificación de histonas, se produce simétricamente en las bases de citosinas en los dinucleótidos CpG (pares de citosina y guanina) y confiere un silenciamiento génico estable. Las marcas de metilación se establecen *de novo* durante el desarrollo embrionario por las DNA-metiltransferasas 3A y 3B (DNMT3A y DNMT3B) y se mantienen en el adulto por la DNA-metiltransferasa 1 (DNMT1) (Paranjpe and Veenstra, 2015).

#### 1.4 CÉLULAS TRONCALES PLURIPOTENTES DERIVADAS DEL EMBRIÓN DE RATÓN

Las primeras líneas de células troncales pluripotentes fueron derivadas de teratocarcinomas de ratón, tumores testiculares de células germinales que presentan componentes celulares indiferenciados junto con tejidos de origen ectodérmico, endodérmico y mesodérmico (Solter, 2006). En los años 70 se observó que, cuando se aislaban células de estos tumores en cultivo, presentaban marcadores similares a las células de la ICM, tenían capacidad de auto-renovación ilimitada y formaban EBs a partir de los cuales podían obtenerse células diferenciadas de las tres capas germinales (Kahan and Ephrussi, 1970). Estas células pluripotentes fueron designadas como **células de carcinoma embrionario** (ECCs) (Cahan and Daley, 2013).

El establecimiento de las ECCs en cultivo impulsó el aislamiento de líneas de células troncales pluripotentes directamente de embriones de ratón. Como ya se ha indicado, la pluripotencia de las células embrionarias es sólo un estado transitorio *in vivo* pero puede ser "capturada *in vitro*", ya que es posible establecer PSCs en cultivo a partir de diferentes estadios del desarrollo embrionario temprano, cada uno con características moleculares y funcionales distinguibles (Wu *et al.*, 2016) (Figura 7).



**Figura 7. Origen de las células troncales pluripotentes durante el desarrollo embrionario.** Adaptado de Hackett and Surani, 2014.

#### 1.4.1 CÉLULAS TRONCALES EMBRIONARIAS (ESCS)

La derivación de las primeras líneas de ESCs murinas se produjo en 1981, a partir de la ICM de blastocistos pre-implantación (E3,5) de ratones de la cepa 129 (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981).

En condiciones de cultivo adecuadas, las ESCs murinas pueden proliferar indefinidamente *in vitro*, manteniéndose indiferenciadas, y presentan una morfología de colonias redondeadas y compactas, gracias a las adhesiones intercelulares mediadas por los complejos E-cadherina-  $\beta$ catenina (Pieters and van Roy, 2014). Las células muestran una relación núcleo-citoplasma elevada, presentan una elevada actividad de las enzimas fosfatasa alcalina (AP) y telomerasa (TERT) y, al igual que las células de la ICM, expresan el antígeno embrionario específico de estadio-1 (SSEA-1, *Stage-Specific Embryonic Antigen 1*) (Loh *et al.*, 2015). Las ESCs manifiestan un potencial de desarrollo completo cuando se inyectan en blastocistos de ratones, contribuyendo a todas las células de las tres capas germinales y a la línea germinal de animales quiméricos. Sin embargo, no contribuyen a la formación del trofoectodermo ni del endodermo primitivo (Hanna *et al.*, 2010; Smith, 2006). Estas células troncales se corresponden con un estado de pluripotencia que se ha designado como “naive” (Nichols and Smith, 2009).

Inicialmente, las condiciones apropiadas para derivar y mantener *in vitro* ESCs murinas incluían el cultivo con suero fetal bovino (FBS), sobre una monocapa de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) inactivados mitóticamente, que servían de soporte y secretaban factores no definidos necesarios para el mantenimiento de las ESCs, actuando como *feeders* (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981). Más tarde, se identificó el factor LIF como la citoquina necesaria para el mantenimiento de la auto-renovación de las ESCs de ratón, estableciéndose cultivos en condiciones FBS+LIF sin *feeders* (Manor *et al.*, 2015). La búsqueda de condiciones definidas para el cultivo en medio libre de suero supuso la suplementación con BMP4, habitualmente presente en el suero, y que actúa inhibiendo la diferenciación (Ying *et al.*, 2003). Sin embargo, incluso bajo estas condiciones definidas (medio sin FBS+BMP+LIF), la derivación de líneas de mESCs de cepas de ratón diferentes a la 129 seguía estando dificultada (Nichols and Smith, 2011). Este inconveniente fue superado adicionando al medio de cultivo: (i) una molécula inhibidora de la ruta de señalización FGF/MEK/ERK (PD03-PD0325901), lo que promueve la auto-renovación, y (ii) un inhibidor de GSK3 $\beta$  (CHIRON-CHIR99021), que estimula la vía de Wnt, implicada en el mantenimiento de la pluripotencia (Ying *et al.*, 2008). Estas condiciones, denominadas 2i+LIF, permiten el mantenimiento de la pluripotencia y la capacidad de auto-renovación de las ESCs en medio definido, sin suero y sin *feeders*, en un estado que se ha denominado “ground” (Wray *et al.*, 2010).

Epigenéticamente, las ESCs “naive” cultivadas en condiciones 2i+LIF se caracterizan por presentar un genoma globalmente hipometilado; sin embargo, cuando las células son transferidas a condiciones de FBS+LIF, se produce un incremento en el nivel global de metilación (Leitch *et al.*, 2013). Otra característica a destacar es que, en el caso de las ESCs “naive” de dotación cromosómica XX, mantienen ambos cromosomas X activos (XaXa) (De Los Angeles *et al.*, 2015). Además, la eliminación en estas células de represores epigenéticos, como DNMT1, favorece la pluripotencia y confiere a estas células un estado “hiper-naive” haciendo que sean, relativamente, más resistentes a la diferenciación (Geula *et al.*, 2015; Kumar *et al.*, 2014).

#### **1.4.2 CÉLULAS TRONCALES EPIBLÁSTICAS (EPISCs)**

Las líneas celulares troncales epiblasticas de ratón se derivaron, por primera vez, en el año 2007, a partir de epiblastos post-implantación de embriones E5,5-E7,5 (Brons *et al.*, 2007; Tesar *et al.*, 2007). Estas células reflejan un estado de pluripotencia más cercano al de la fase de gastrulación, en la que se establecen las tres capas germinales y, por ello,

este estado se ha denominado "primed" ("*primed for differentiation*", (Nichols and Smith, 2009; Wu and Izpisua Belmonte, 2015).

El establecimiento de las EpiSCs *in vitro* requiere el cultivo de las células en medio suplementado con factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF o FGF2) y Activina A (Brons *et al.*, 2007; Tesar *et al.*, 2007). La ruta de señalización de TGF $\beta$  también es necesaria para el mantenimiento de la auto-renovación de las EpiSCs que, además, requieren de la señalización mediada por ERK1/2. La auto-renovación de las EpiSCs es independiente de LIF/STAT3 y la señalización por BMP4 induce la diferenciación de estas células (Hanna *et al.*, 2010).

Las EpiSCs presentan una morfología de colonia aplanada y crecimiento lento, y no se cultivan bien a densidad clonal. Pueden diferenciarse a todos los tipos celulares derivados de las tres capas germinales *in vitro* y formar teratomas (Brons *et al.*, 2007; Tesar *et al.*, 2007). Sin embargo, tienen un potencial de desarrollo más limitado que las ESCs, y son altamente ineficientes en contribuir a la generación de ratones quiméricos cuando se inyectan en blastocistos (Ohtsuka *et al.*, 2012). Curiosamente, por el contrario, a las ESCs, las EpiSCs sí pueden formar embriones quiméricos cuando se inyectan en epiblastos post-implantación E7,5 y, aunque la contribución a los tejidos del nuevo individuo es baja, pueden contribuir a la línea germinal (Huang *et al.*, 2012). Molecularmente, las EpiSCs se caracterizan por un programa de expresión génica que recuerda al epiblasto post-implantación, más que a la ICM: presentan niveles de expresión elevados de OCT4 y SOX2 (Buecker *et al.*, 2014), pero bajos niveles de expresión de otros factores de pluripotencia, incluyendo NANOG, (ESRR $\beta$ ), KLF2 y KLF4 (Hackett and Surani, 2014).

Desde el punto de vista epigenético, en las EpiSCs ya se ha producido la inactivación del cromosoma X (XaXi). Estas células presentan un nivel de metilación global más elevado que las ESCs y, contrariamente a éstas, tienden a diferenciarse en respuesta a la pérdida de represores epigenéticos (Geula *et al.*, 2015). El incremento en la metilación es debido tanto a la metilación del DNA, por incremento en la expresión de DNMT3b (Hackett *et al.*, 2013), como a la metilación de histonas, ya que los promotores de genes reguladores del desarrollo adquieren la marca de trimetilación "represora" H3K27me3 (Hackett *et al.*, 2013; Marks *et al.*, 2012).

### 1.4.3 CÉLULAS TRONCALES GERMINALES EMBRIONARIAS (EGCs)

Las EGCs son células troncales pluripotentes derivadas *in vitro* a partir de células germinales primordiales (PGCs) en torno al día E8,5-E12,5. (Matsui *et al.*, 1992; Resnick *et al.*, 1992). Cuando se realizan explantes de PGCs y se cultivan condiciones similares a las usadas para derivar líneas de ESCs, pueden establecerse líneas de células germinales embrionarias fenotípicamente indistinguibles de las ESCs (Sabour and Scholer, 2012). Las EGCs pueden proliferar indefinidamente *in vitro* y generar ratones quiméricos con contribución a la línea germinal (Labosky *et al.*, 1994; Stewart *et al.*, 1994). Sin embargo, aunque transcripcional y funcionalmente son muy similares a las ESCs (Hackett *et al.*, 2013), presentan marcas epigenéticas heredadas de las PGCs originales que permiten distinguirlas de las ESCs (Wu *et al.*, 2016).

### 1.4.4 ESTADOS ALTERNATIVOS DE LA PLURIPOTENCIA

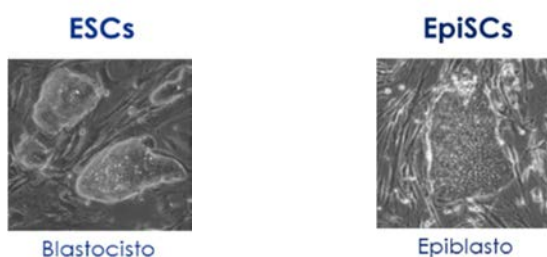
La clasificación convencional de las células troncales en función del estadio embrionario en el que se derivan ha llevado a definir la existencia de un estado pluripotente "naive", asociado a la ICM del blastocisto pre-implantación (células ESCs y EGCs), y otro estado pluripotente "primed" en el embrión post-implantación, correspondiente a las EpiSCs (Wu and Izpisua Belmonte, 2015). Adicionalmente, diversos estudios han sugerido la existencia de otros estados alternativos intermedios entre los anteriores (Kalkan and Smith, 2014).

Los estados "naive" y "primed" proporcionan a las ESCs y las EpiSCs distintas características a nivel de morfología, expresión de genes de pluripotencia, estado epigenético, y capacidad de generación de quimeras (Hanna *et al.*, 2010). Cada uno depende de diferentes factores de crecimiento y rutas de señalización que, incluso, pueden tener un efecto antagónico en uno y otro caso (Tabla 2).

Sin embargo, a pesar de estas diferencias, y dada la heterogeneidad observada en los cultivos de ESCs y EpiSCs, estos dos estados no pueden considerarse como compartimentos estanco, sino que más bien, las células pueden transitar entre ellos de forma reversible, a lo largo de un espectro de estados, teniendo en cuenta que el "naive" es el predominante en el caso de las ESCs y lo mismo ocurre con el "primed" en el caso de las EpiSCs (Loh *et al.*, 2015).



**Tabla 2. Características de los estados pluripotentes "naive" y "primed" en ratón.** Adaptada de Hanna *et al.*, 2010, fotografías tomadas de Nichols and Smith, 2009



Característica	Estado pluripotente "naive"	Estado pluripotente "primed"
Tejido embrionario de origen	ICM del blastocisto, Epiblasto temprano (pre-implantación). E3,5-E4,5	Epiblasto tardío (peri/post-implantación). E5,5-E7,5
Tipos de células pluripotentes	Células troncales embrionarias (ESCs) Células troncales germinales embrionarias (EGCs)	Células troncales epiblasticas (EpiSCs)
Morfología de la colonia	Compacta, redondeada y abovedada	Aplanada y adoquinada
Moléculas de adhesión celular	E-cadherina	N-cadherina
Actividad fosfatasa alcalina	Positiva (más fuerte)	Positiva (más débil)
Estado de metilación del DNA	Hipometilado	Hipermetilado
Presencia de marcas "represoras" (H3K27me3) en la cromatina	Relativamente baja	Relativamente alta
Estado del cromosoma X femenino	XaXa	XaXi
Clonogenicidad ( <i>single-cell cloning</i> )	Alta	Baja
Diferenciación a partir de cuerpos embrioides	SI	SI
Formación de teratoma	SI	SI
Contribución a quimeras	SI	NO
Dependencia de factores de crecimiento	LIF	Activina, FGF2
Respuesta a LIF/STAT3 LIF/BMP4	Auto-renovación	Ninguna
Respuesta a FGF/ERK	Diferenciación	Auto-renovación
Respuesta a 2i	Auto-renovación	Diferenciación/Muerte
Vías de señalización que regulan positivamente el estado pluripotente	LIF/STAT3 BMP4 WNT IGF	TGF- $\beta$ Activina/Nodal FGF2 ERK1/2 WNT IGF
Vías de señalización que regulan negativamente el estado pluripotente	TGF- $\beta$ Activina FGF2 ERK1/2 Nodal	BMP4
Marcadores de pluripotencia	OCT4/SOX2 alto NANOG, KLF2, KLF4, ESRR $\beta$ muy alto	OCT4/SOX2 alto NANOG, KLF2, KLF4, ESRR $\beta$ bajo

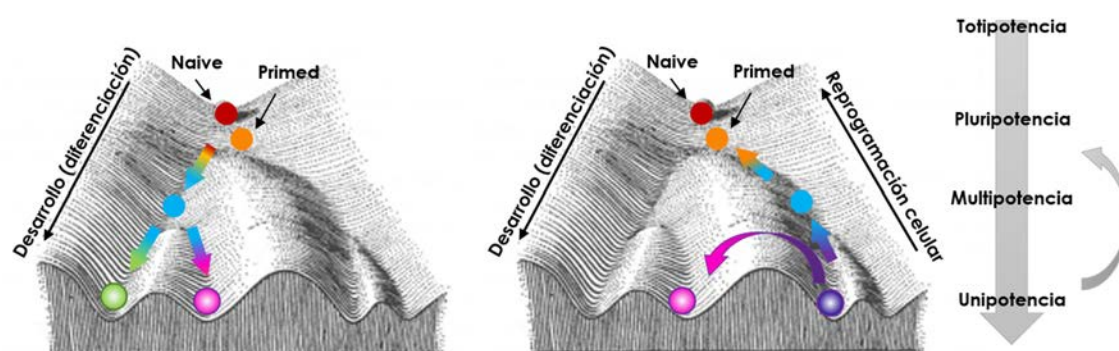
Se ha propuesto que estos dos estados alternativos de pluripotencia son metaestables e interconvertibles entre sí mediante modificación de las condiciones de cultivo. De este modo, las ESCs “naive” pueden adoptar gradualmente el estado “primed” de las EpiSCs mediante la exposición a bFGF y Activina A (Borsos and Torres-Padilla, 2016; Nichols and Smith, 2009). Asimismo, el estado “primed” de EpiSCs derivadas de cepas de ratón de fondo genético 129, C57BL/6 y BALB/C (Hanna *et al.*, 2009a), puede ser revertido al estado “naive” en presencia de LIF/STAT3, o mediante la sobreexpresión transitoria de KLF4, KLF2, NANOG o c-MYC (Hanna *et al.*, 2010). En EpiSCs derivadas de cepas de fondo genético no permisivo, como son los ratones diabéticos no obesos (ratón NOD, *Non-obese diabetic*), es necesaria no sólo la presencia de LIF, sino también el cultivo en las condiciones 2i (Guo *et al.*, 2009a).

Por tanto, las ESCs “naive” murinas se pueden derivar tanto de blastocistos pre-implantación como de epiblastos post-implantación, siempre que se utilicen las condiciones de crecimiento “naive”, y lo mismo se aplica a las EpiSCs cuando se usan condiciones de cultivo “primed”. Por ello, la tendencia actual es argumentar que, más que el estadio embrionario de origen, es la activación de distintas vías de señalización, a través de las diferentes condiciones de cultivo, lo que determina el estado de pluripotencia que es adquirido *in vitro* (Hochedlinger and Jaenisch, 2015; Weinberger *et al.*, 2016).

## **2. INDUCCIÓN DE LA PLURIPOTENCIA Y REPROGRAMACIÓN CELULAR**

Durante el desarrollo embrionario, las células troncales pasan de un estado pluripotente a otro diferenciado (Takahashi and Yamanaka, 2015). Inicialmente, este proceso fue considerado irreversible, entendiendo que una célula diferenciada no es capaz de volver a adquirir pluripotencia. Bajo esta premisa, Conrad Waddington propuso el modelo expuesto en el apartado 1.2, equiparando el proceso de diferenciación celular con el recorrido de una canica rodando a lo largo de una colina, a través de valles y bifurcaciones. En el modelo de Waddington, una vez que la canica alcanzaba la base de la colina, no podía continuar hacia otro valle vecino o ascender de nuevo a la cima puesto que, según su teoría, los vías que dirigían la progresión del desarrollo y la diferenciación celular eran unidireccionales, y el destino de las células, comprometidas hacia un linaje determinado, permanente e irreversible (Takahashi and Yamanaka, 2016). En la actualidad se sabe que, mediante diferentes procesos celulares, la canica puede no solo pasar al valle vecino, sino que también puede volver a

ascender a la cima de la colina. El primero de esos procesos, que implica la conversión directa de un tipo celular diferenciado a otro, sin tener que revertir previamente a un estado de pluripotencia (Graf and Enver, 2009), recibe el nombre de **transdiferenciación**. En el segundo proceso, el estado diferenciado de la célula somática puede ser revertido a un estado pluripotente, mediante el proceso denominado **reprogramación nuclear**, abriendo la posibilidad de crear rutas de alternativas de inducción de la pluripotencia por manipulación experimental (Figura 8).



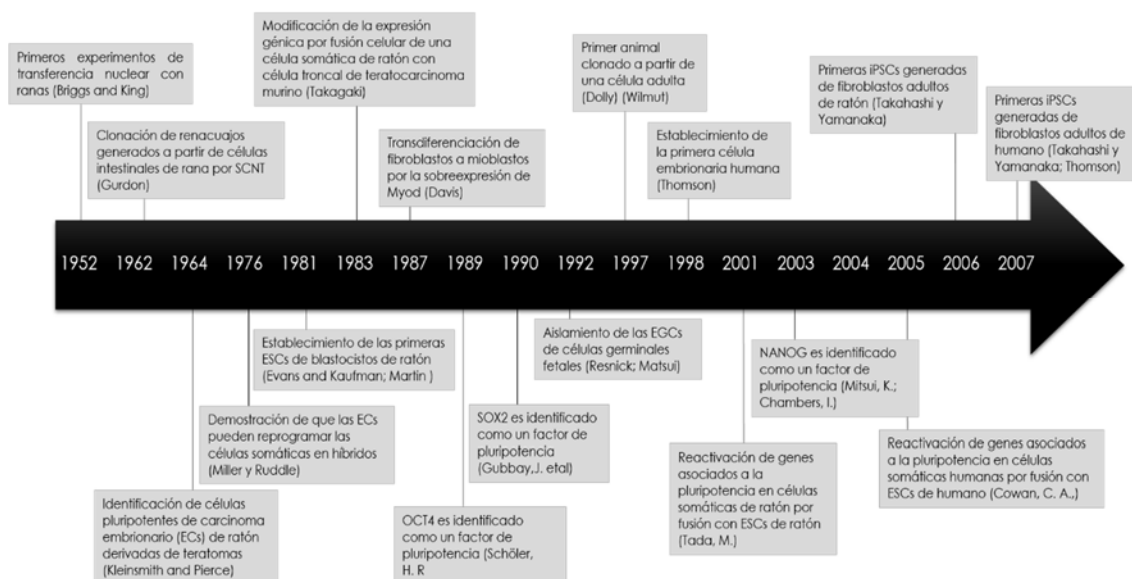
**Figura 8. Rutas alternativas de inducción de la pluripotencia: reprogramación celular.** Las PSCs (*naïve* en rojo y *primed* en naranja) pueden diferenciarse a cualquier linaje (verde, rosa, morado), no solo durante el desarrollo sino también en respuesta a señales extrínsecas *in vitro*. La reprogramación directa, o la transdiferenciación, permite a las células comprometidas (morada) convertirse en otro destino (rosa). Durante la reprogramación indirecta, se puede revertir una célula somática madura (morada) a la pluripotencia (naranja o rojo) a través de un estado progenitor multipotente (azul). Adaptado de Takahashi and Yamanaka, 2016.

## 2.1 ESTRATEGIAS DE INDUCCIÓN DE LA PLURIPOTENCIA

La primera estrategia desarrollada para inducir la pluripotencia en células somáticas se basó en poner en contacto el núcleo de una célula somática con el ambiente de un ovocito previamente enucleado, revisado por (Smith *et al.*, 2016). En los años cincuenta, Briggs y King consiguieron transferir exitosamente el núcleo de una célula del blastocisto de *Rana pipiens* a un ovocito enucleado, obteniendo un organismo adulto mediante **transferencia nuclear** (Briggs and King, 1952). Las tentativas para reproducir estos experimentos con células en estadios más avanzados del desarrollo embrionario fueron infructuosas, hasta que, en 1962, John Gurdon transfirió el núcleo de una célula epitelial intestinal diferenciada de *Xenopus laevis* a un ovocito previamente enucleado y logró generar un organismo genéticamente idéntico a la célula somática donante (Gurdon, 1962; Gurdon *et al.*, 1958). En mamíferos, la aplicación de la tecnología de transferencia

nuclear tuvo sus primeros frutos con los trabajos de Willadsen (Willadsen, 1989), realizados con blastómeros embrionarios de estadios tempranos, pero no fue hasta finales de los años noventa, cuando las investigaciones realizadas en el Instituto Roslin (Edimburgo, UK) permitieron obtener ovejas clonadas mediante transferencia nuclear, tanto a partir de células embrionarias mantenidas en cultivo durante varios meses (Campbell *et al.*, 1996), como de fibroblastos fetales y, finalmente, partiendo de una célula de glándula mamaria de una oveja adulta, en el caso de la oveja Dolly (Wilmut *et al.*, 1997).

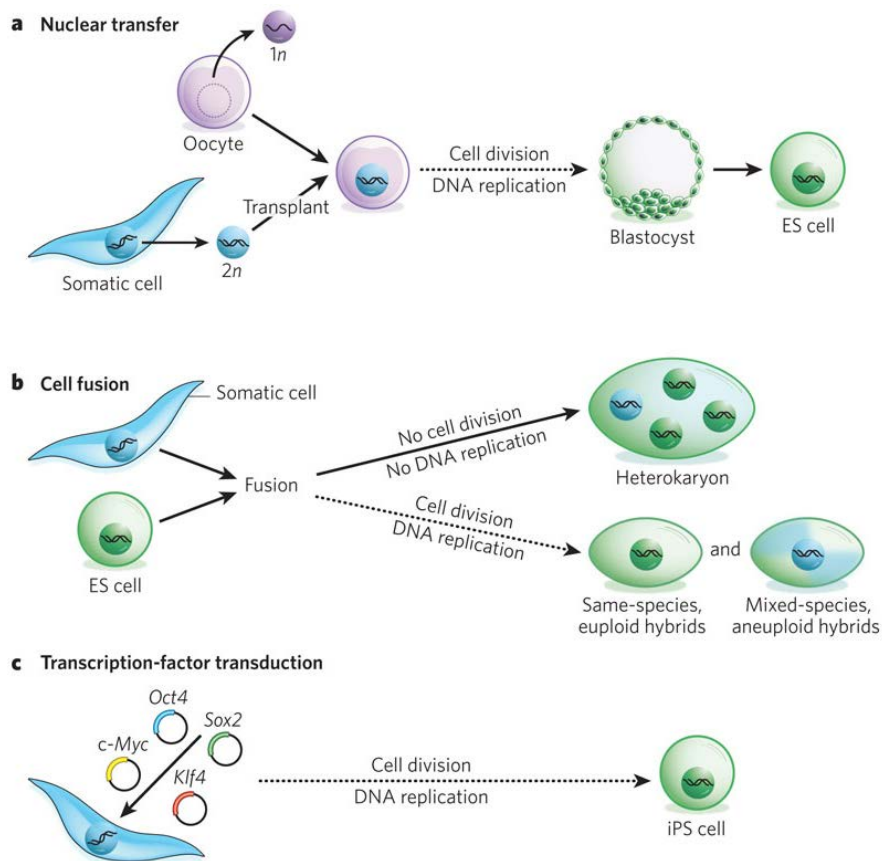
Estas investigaciones indicaron que la diferenciación celular y las “restricciones” epigenéticas impuestas en el genoma de la célula somática durante el desarrollo no eran irreversibles (Hochedlinger and Jaenisch, 2002), demostrando que el ovocito contiene los factores necesarios para reprogramar el epigenoma y revertir el estado diferenciado hacia un estado pluripotente embrionario, sugiriendo que estos factores podrían ser identificados y utilizados para inducir la pluripotencia en células somáticas.



**Figura 9. Hitos cronológicos claves de la inducción de la pluripotencia.** Adaptado de (Evans, 2011), Stadtfeld and Hochedlinger, 2010; Takahashi and Yamanaka, 2016

Otra de las estrategias de inducción de la pluripotencia consiste en la **fusión de células somáticas con células troncales pluripotentes**, bien ECCs (Blau *et al.*, 1983) o ESCs (Cowan *et al.*, 2005; Tada *et al.*, 2001). En el híbrido resultante de la fusión, o heterocarionte, el estado pluripotente domina sobre el diferenciado, activándose genes silenciados en la célula somática, que adquiere las características de la célula

pluripotente. Esta dominancia corroboró la existencia de factores transactivadores en las células troncales, capaces de conferir el estado pluripotente a las células somáticas (Yamanaka and Blau, 2010). Los experimentos de transdiferenciación también aportaron evidencias de que la expresión ectópica de factores de transcripción, particularmente los reguladores de la identidad celular y especificidad de tejido, puede modificar el destino de las células (Davis *et al.*, 1987; Jopling *et al.*, 2011).



**Figura 10. Estrategias de inducción de la pluripotencia.** Tomado de Yamanaka and Blau, 2010.

Todos estos estudios condujeron, en el año 2006, a la primera descripción de la inducción de la pluripotencia en células somáticas **mediante la expresión de factores de transcripción, asociados a células troncales embrionarias** (Takahashi and Yamanaka, 2006), proceso que se describe con más detalle en el siguiente apartado.

## 2.2 REPROGRAMACIÓN CELULAR INDUCIDA POR FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN

Las investigaciones pioneras de Takahashi y Yamanaka en el año 2006 demostraron que la expresión ectópica transitoria de un conjunto mínimo de factores de transcripción inducía la **reprogramación celular** de células somáticas murinas (fibroblastos embrionarios y adultos) dando lugar a la generación de células pluripotentes a las que denominaron células troncales pluripotentes inducidas, o iPSCs. Estas células presentan características moleculares y funcionales similares a las ESCs, y los rasgos distintivos de pluripotencia y capacidad de auto-renovación (Takahashi and Yamanaka, 2006).

En su estudio, Takahashi y Yamanaka seleccionaron un grupo de 24 factores candidatos cuya expresión se había asociado de forma específica a las ESCs y que desempeñaban funciones clave en el mantenimiento de la identidad de las células troncales. Utilizando vectores retrovirales, los cDNAs de los 24 candidatos (por separado o en diferentes combinaciones) se introdujeron en las células, que se cultivaron en condiciones propias de ESCs y en presencia de un agente de selección. Finalmente, mediante la retirada secuencial e individual de los factores, se determinó que la combinación necesaria para obtener colonias semejantes a las ESCs consistía en cuatro factores de transcripción: OCT3/4, SOX2, KLF4 y c-MYC (a los que nos referiremos de aquí en adelante como OSKM).

Las iPSCs derivadas en este estudio satisfacían la mayoría de los requisitos de pluripotencia, aunque no permitieron la generación de ratones quiméricos vivos, hecho probablemente asociado a la presencia de células parcialmente reprogramadas (Takahashi and Yamanaka, 2006). No obstante, un año más tarde, se consiguió no sólo reproducir la técnica y obtener quimeras adultas con capacidad de contribución a la línea germinal (Maherali *et al.*, 2007; Okita *et al.*, 2007; Wernig *et al.*, 2007), sino también reprogramar células humanas. (Takahashi *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2007). En este último trabajo, el "cóctel" de factores de reprogramación estuvo integrado por OCT4, SOX2, NANOG y LIN28, sugiriendo que OCT4 y SOX2 eran imprescindibles para la reprogramación (Nemajerova *et al.*, 2012), mientras que NANOG, LIN28, KLF4 y c-MYC podrían ser factores sustituibles (Feng *et al.*, 2009; Gao *et al.*, 2013; Han *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2007).

Desde entonces, diversas combinaciones de estos y otros factores de transcripción (generalmente reguladores del desarrollo temprano implicados en el mantenimiento de la pluripotencia de la ICM) y/o microRNAs relacionados con la regulación de la pluripotencia, han sido utilizadas para reprogramar múltiples tipos celulares (González *et al.*, 2011; Hochedlinger and Jaenisch, 2015). Por ejemplo, se ha conseguido derivar iPSCs

de células neurales (Kim *et al.*, 2008), melanocitos (Utikal *et al.*, 2009a), linfocitos T y B terminalmente diferenciados (Eminli *et al.*, 2009; Hanna *et al.*, 2008), células de sangre periférica (Kulcenty *et al.*, 2015), etc. Asimismo, se ha logrado reprogramar células de diversos tumores humanos, como páncreas, hígado, o colon, entre otros (Kim and Zaret, 2015; Semi and Yamada, 2015). También existen numerosas referencias de reprogramación de células somáticas procedentes de pacientes con patologías (Bellin *et al.*, 2012; Deshmukh *et al.*, 2012), y se ha conseguido corregir defectos genéticos en las células objeto de la reprogramación (Howden *et al.*, 2015; Raya *et al.*, 2009).

Todo este abanico de posibilidades, junto con los rasgos distintivos de auto-renovación y pluripotencia de las iPSCs, hacen de estas células una valiosa herramienta, que puede ser empleada como modelo de estudio de enfermedades o para la búsqueda de nuevos tratamientos farmacológicos. La utilización de estas células en terapia celular y medicina regenerativa esquivan los principales problemas éticos que suscitaría la utilización clínica de ESCs humanas, además de evitar la posibilidad de rechazo inmunológico por parte del paciente (Menendez *et al.*, 2010).

### **2.2.1 MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE CÉLULAS TRONCALES PLURIPOTENTES INDUCIDAS (IPSCs)**

La relevancia de las iPSCs como herramienta en la investigación biomédica, junto con las prometedoras aplicaciones de estas células en medicina regenerativa han fomentado el desarrollo de avances técnicos encaminados a generar iPSCs clínicamente útiles y seguras. Por un lado, el objetivo ha sido mejorar la eficiencia del proceso de reprogramación, que es menor al 0,06-0,01% en la mayoría de los casos (Chan *et al.*, 2009; Takahashi *et al.*, 2007). Por otro, se ha intentado evitar tanto el uso de DNA viral como la integración permanente de los transgenes que codifican los factores de reprogramación en el genoma de las células (Hu, 2014; Rony *et al.*, 2015). En base a este último criterio, los métodos de obtención de iPSCs pueden clasificarse en métodos con integración o no de los factores OSKM en el genoma (Figura 11).

	Eficiencia		Seguridad	
	Vectores virales integrativos	Transposón piggyBac	Vectores virales no integrativos	Compuestos químicos
Ventajas	Fáciles de usar; reproducible; permite la generación de iPSCs secundarias	Fácil de usar; reproducible; permite la generación de iPSCs secundarias; permite la escisión de los transgenes del genoma	Baja frecuencia de integración	Eliminan el riesgo asociado con posibles modificaciones del genoma; no se utiliza DNA
Desventajas	Riesgo de inserción en el genoma; mutagénesis insercional; posibilidad de reactivación de los transgenes; silenciamiento incompleto	La escisión de los transgenes del genoma no es completa	Se requieren repetidas transfecciones/infecciones; posibilidad de inserción en el genoma	Proceso de generación de iPSCs muy lento
	Vectores retrovirales/lentivirales	Sistema piggyBac	Vectores adenovirales; virus Sendai; vectores episomales.	Modificadores epigenéticos del DNA o histonas

Figura 11. Métodos de obtención de iPSCs. Tomado de Sommer and Mostoslavsky, 2010.

### A) MÉTODOS INTEGRATIVOS DE LOS FACTORES EN EL GENOMA

Los métodos integrativos basados en el empleo de retrovirus o lentivirus fueron los primeros en ser utilizados (Takahashi *et al.*, 2007; Takahashi and Yamanaka, 2006). A pesar de que ambas clases de **vectores virales** tienen la capacidad para infectar con elevada eficiencia una gran variedad de células somáticas, presentan serias limitaciones para su utilización clínica (Cooray *et al.*, 2012). Los principales inconvenientes están asociados con la posibilidad de mutagénesis insercional derivada de la integración al azar del vector (Kaji *et al.*, 2009), así como con el riesgo que conlleva la reactivación de los transgenes en células somáticas diferenciadas a partir de las iPSCs, lo que puede tanto interferir con su pluripotencia, como dar lugar a la formación de tumores (Okita *et al.*, 2007). Por otro lado, dado el origen viral de estos vectores, las secuencias OSKM son objeto de procesos de silenciamiento epigenético, por lo que su expresión en las células puede verse silenciada antes de que se complete el proceso de reprogramación, dando lugar a células parcialmente reprogramadas (Stadtfield and Hochedlinger, 2010).

Como alternativa, destacan los métodos integrativos no virales, basados en el **sistema de transposición piggyBac** (Wu *et al.*, 2006) combinado con sistemas de expresión inducibles del tipo *Tet-ON*, regulados por doxiciclina (Woltjen *et al.*, 2009). En este caso, los factores de reprogramación se encuentran flanqueados por las secuencias repetidas terminales e invertidas del trasposón, y pueden ser insertados o escindidos del genoma al ser reconocidos por la *piggyBac* transposasa. Esta enzima está



codificada en un vector independiente del transposón, lo que convierte a éste en elemento móvil no autónomo (Revilla *et al.*, 2015). Este sistema es más seguro y eficiente (Sommer and Mostoslavsky, 2010), aunque su uso en la clínica no ha sido totalmente aceptado, ya que la escisión de los transgenes del genoma, mediante la reintroducción de la transposasa en las células reprogramadas, no es completa (Sommer and Mostoslavsky, 2010; Woltjen *et al.*, 2009).

## **B) MÉTODOS NO INTEGRATIVOS DE LOS FACTORES EN EL GENOMA**

Los métodos no integrativos se desarrollaron con el fin de conseguir aumentar la seguridad del proceso ya que, al producirse la expresión transitoria de los factores de reprogramación (sin necesidad de que se integren en el genoma), se evitan los inconvenientes mencionados en el apartado anterior. Como contrapartida, estos métodos son mucho más ineficientes (Hochedlinger and Jaenisch, 2015).

Entre los vectores virales no integrativos, se han utilizado **vectores adenovirales** (Stadtfield *et al.*, 2008b) y virus Sendai (Fusaki *et al.*, 2009). La eficiencia de los vectores adenovirales para la generación de iPSCs es extremadamente baja (0,006%), algo que ha sido asociado con la dificultad para mantener la expresión, en niveles adecuados, de los factores de reprogramación más allá de 3-8 días (Lowry and Plath, 2008; Stadtfield *et al.*, 2008b). El virus Sendai es un virus de RNA que se replica constitutivamente en el citoplasma de las células infectadas y, por tanto, no necesita integrarse en el genoma (Fusaki *et al.*, 2009). No obstante, esta característica es también su principal limitación, ya que se requiere un número muy elevado de pases de las iPSCs generadas para eliminar el virus de las células (Hu, 2014).

Como alternativa a los vectores virales no integrativos, se han utilizado **vectores episomales** que presentan componentes del herpes virus humano *Epstein-Barr* (el origen de replicación y el antígeno 1 nuclear), que hacen posible la replicación del plásmido extracromosómico (Okita *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2009). A pesar de su seguridad, la eficiencia de reprogramación obtenida con este tipo de vectores es muy baja (Okita *et al.*, 2011).

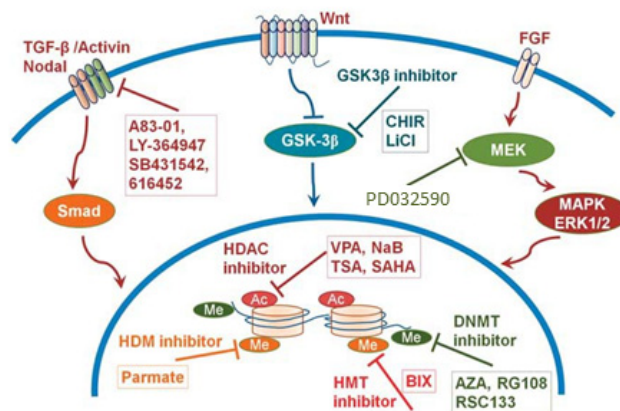
**Otras estrategias** de reprogramación son la transfección repetida de plásmidos (Okita *et al.*, 2008), el empleo de proteínas recombinantes (Kim *et al.*, 2009), la introducción de cromosomas artificiales (Hiratsuka *et al.*, 2011) o la utilización de vectores de mRNA sintético (Warren *et al.*, 2010) que ha permitido obtener iPSCs con

una eficiencia mucho mayor a la alcanzada con otros sistemas no integrativos (Schlaeger *et al.*, 2015). No obstante, es un sistema que requiere de transfecciones continuas, por lo que la alta dosis génica de los factores de reprogramación en las iPSCs generadas podría representar un riesgo elevado para su posible utilización en clínica (González *et al.*, 2011).

Finalmente, es especialmente destacable la utilización de **compuestos químicos** de bajo peso molecular para mejorar la eficiencia del proceso de reprogramación o en sustitución de alguno/s de los factores OSKM (Figura 12). Muchos de estos compuestos actúan mediante la modificación epigenética del DNA o las histonas, haciendo que la estructura de la cromatina sea más permisiva para la maquinaria transcripcional durante la reprogramación (Papp and Plath, 2013). Así, la utilización de agentes desmetilantes del DNA, como la 5-azacitidina, incrementa la eficiencia del proceso al inactivar las DNA metiltransferasas (DNMTs). Junto a la metilación del DNA, la desacetilación de las histonas también impide la reprogramación y, por ello, se han usado inhibidores de las deacetilasas de histonas (HADCs), tales como el butirato sódico o el ácido valproico, para favorecer el proceso (Popowski and Tucker, 2015).

La metilación de histonas está asociada tanto a activación como a represión transcripcional, en función de los residuos modificados (Layman and Zuo, 2014). En este último contexto, para mejorar la reprogramación se han utilizado tanto compuestos que inducen la actividad de demetilinasas de histonas (HDMs), como agentes inhibidores de las metiltransferasas de histonas (HMTs) (Muchkaeva *et al.*, 2012). Entre los primeros destaca la vitamina C, mientras que en el segundo grupo se encuentran los compuestos BIX-01294 (BIX) o AMI-5 (Higuchi *et al.*, 2015). En otros casos, las marcas de metilación de histonas son activadoras (ej. H3K4) y, por consiguiente, las moléculas empleadas para favorecer la reprogramación son inhibidores de demetilinasas como la trancilpromina (Parnate®), que activa la expresión de *Oct4* e incrementa la eficiencia de reprogramación (Higuchi *et al.*, 2015).

Además de los modificadores epigenéticos indicados, se ha demostrado que empleo de determinadas combinaciones de moléculas permite reprogramar fibroblastos de ratón sin la utilización de ningún factor de transcripción (Hou *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2016). Esta estrategia de reprogramación, conocida como reprogramación química (CiPSCs), es actualmente, el foco de numerosas investigaciones encaminadas a la obtención de iPSCs clínicamente más seguras.



**Figura 12. Vías de señalización y moléculas implicadas en la reprogramación química.** Adaptado de Higuchi *et al.*, 2015.

### 3. EL PROCESO DE REPROGRAMACIÓN, FASES Y MECANISMOS MOLECULARES QUE LO REGULAN

A pesar de la mejora de las metodologías de obtención de iPSCs, es necesario tener en cuenta que la mayoría de las células que expresan los factores OSKM fracasan en superar las barreras epigenéticas y transcripcionales que previenen la inducción de la pluripotencia (Silva *et al.*, 2008; Wernig *et al.*, 2008), por lo que solo un número pequeño de células alcanza la reprogramación completa con éxito (Takahashi and Yamanaka, 2016; Yamanaka, 2009). Por este motivo, resulta esencial incrementar los conocimientos sobre el proceso de reprogramación celular.

Originariamente, el proceso de reprogramación fue descrito como una secuencia de eventos iniciada con el silenciamiento del programa genético de las células somáticas diferenciadas, seguido por la reactivación de genes asociados a la pluripotencia (Brambrink *et al.*, 2008; Stadtfeld *et al.*, 2008a). Posteriormente, mediante la realización de un extenso perfil transcriptómico (Li *et al.*, 2010; Samavarchi-Tehrani *et al.*, 2010), se describió la reprogramación celular como un proceso secuencial definido por tres etapas, denominadas iniciación, maduración y estabilización. Complementando estos estudios, los análisis genómicos y proteómicos determinaron que este proceso está caracterizado por dos fases u "oleadas" (*first and second waves*) de cambios moleculares, la primera estocástica, más larga, y la segunda jerárquica y organizada, separadas por un periodo intermedio en el que se pueden encontrar células en un estado de reprogramación parcial (Araki *et al.*, 2010; Buganim *et al.*, 2012;

Hanna *et al.*, 2009b; Hansson *et al.*, 2012; Megyola *et al.*, 2013; Polo *et al.*, 2012; Smith *et al.*, 2010).

A continuación, se describen los procesos celulares y los mecanismos moleculares más destacados que tienen lugar durante las fases del proceso de reprogramación celular de fibroblastos embrionarios de ratón (Buganim *et al.*, 2012; Golipour *et al.*, 2012; Hawkins *et al.*, 2014; Papp and Plath, 2011; Smith *et al.*, 2016; Takahashi and Yamanaka, 2016; Xu *et al.*, 2016) que, de acuerdo con los datos publicados, corresponden aproximadamente con los días 0-7 (iniciación), 7-12 (maduración) y 12-17 (estabilización), después del comienzo de la expresión de los factores OSKM (Li *et al.*, 2010; Samavarchi-Tehrani *et al.*, 2010).

### 3.1 FASE DE INICIACIÓN

Tras la expresión de OSKM en las células somáticas, uno de los primeros cambios que se detectan es un aumento en la proliferación celular en consonancia con la expresión de MYC, así como un cambio en el metabolismo energético de las células, que empiezan a realizar glucólisis anaeróbica en detrimento de la fosforilación oxidativa (Hanna *et al.*, 2009b; Hawkins *et al.*, 2014; Maherali *et al.*, 2007; Mikkelsen *et al.*, 2008). Conjuntamente, es necesario que se inhiban los mecanismos de apoptosis y senescencia que se activan en respuesta al daño en el DNA y al estrés oxidativo que se produce, y que bloquean el progreso de la reprogramación (Banito *et al.*, 2009; Papp and Plath, 2011).

A nivel morfológico, tiene lugar una transformación coordinada que supone una reducción rápida del tamaño celular y el comienzo de la formación de grupos celulares apretados, formados por células redondeadas, junto con una pérdida de la identidad mesenquimal y la reactivación de las características epiteliales, en un proceso que recapitula la **Transición Mesénquima-Epitelio (MET, Mesenchymal to Epithelial Transition)** (Li *et al.*, 2010; Samavarchi-Tehrani *et al.*, 2010).

La transición MET, al igual que el proceso inverso, la Transición Epitelio-Mesénquima (EMT, *Epithelial to Mesenchymal Transition*) desempeñan un papel fundamental durante el desarrollo embrionario y en la progresión tumoral (Thiery *et al.*, 2009). La transición MET implica la pérdida de características mesenquimales, como la motilidad, al tiempo que **las células adquieren características epiteliales**, como son el establecimiento de los contactos célula-célula, la polaridad celular y la expresión de moléculas de adhesión

celular (Li *et al.*, 2010; Samavarchi-Tehrani *et al.*, 2010; Zaravinos, 2015). En consonancia con esto, se ha descrito que la reprogramación de células epiteliales, que no experimentan transición MET, es más eficiente que la de las células mesenquimales (Aasen *et al.*, 2008; Esteban *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2010).

Asimismo, durante la transición MET, el citoesqueleto de actina debe ser reorganizado, siendo reemplazadas las fibras de estrés de actina características de los fibroblastos por actina cortical (Lamouille *et al.*, 2014). En relación con esto, se ha demostrado que las serina/treonina quinasas, TESK1 (*testicular protein kinase 1*) y LIMK2 (*LIM kinase 2*), que fosforilan específicamente a la proteína de unión a actina COFILINA, actuarían como barreras para la transición MET, ya que su silenciamiento resulta en alteraciones en la polimerización de la actina, detectándose un incremento en la eficiencia de reprogramación (Sakurai *et al.*, 2014).

La transición MET es uno de los hitos de la fase de iniciación. No obstante, existen evidencias de que la reprogramación en esta fase no sólo depende de MET. Se ha demostrado la existencia de una transición EMT corta y transitoria, que precede la transición MET, en los primeros estadios de la reprogramación celular (Gingold *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2013b; Unternaehrer *et al.*, 2014). Este mecanismo secuencial EMT-MET se caracteriza por una atenuación en la expresión de *Cdh1* (*E-cadherina*) y una inducción de la expresión de *Slug* (Liu *et al.*, 2013b). Contrariamente a lo esperado, esta EMT es beneficiosa para el proceso de reprogramación (Gingold *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2013b).

Simultáneamente a la supresión de los genes somáticos y la transición MET, la primera fase de la reprogramación también se caracteriza por la activación de la expresión de la enzima fosfatasa alcalina y del antígeno embrionario SSEA-1, marcador molecular característico de pluripotencia de células ESCs de ratón (Brambrink *et al.*, 2008; Hansson *et al.*, 2012; Polo *et al.*, 2012).

Desde el punto de vista epigenético, este período temprano se relaciona con una secuencia de eventos estocásticos que reflejan las interacciones entre los factores de transcripción OSKM con cofactores, proteínas y cromatina, interacciones que en su conjunto y en última instancia dictarán unos perfiles epigenéticos y transcripcionales similares a los que presentan las ESCs (Polo *et al.*, 2012).

La transición MET y la fase de iniciación son procesos reversibles, ya que los genes asociados a la pluripotencia no están todavía reactivados en esta fase. Además se ha sugerido que puede tener lugar la degradación de los factores OSKM mediante un

mecanismo de defensa celular, llevado a cabo por el sistema inmune innato, pudiendo esto explicarse por qué solo unas pocas células son capaces de progresar hacia la fase de maduración (Buckley *et al.*, 2012; Polo *et al.*, 2012).

### 3.1.1 REGULACIÓN MOLECULAR DE LA TRANSICIÓN MESÉNQUIMA-EPITELIO (MET)

La transición MET es la marca distintiva de la fase de iniciación durante la reprogramación y es imprescindible para que las células continúen hacia la fase de maduración (Li *et al.*, 2010; Samavarchi-Tehrani *et al.*, 2010). El proceso comienza con la represión de la expresión de las proteínas de superficie específicas mesenquimales, CD44 y THY1, y de los factores de transcripción inductores de la transición EMT, entre los que se encuentran SNAIL, SLUG, ZEB1, ZEB2 y TWIST (Lamouille *et al.*, 2014). Tan pronto como la **identidad mesenquimal desaparece**, se induce de forma independiente (Li *et al.*, 2010) la expresión de proteínas relacionadas con el establecimiento de uniones de tipo epitelial, como E-CADHERINA,  $\beta$ -CATENINA o la molécula de adhesión celular epitelial (EPCAM, *epithelial cell adhesion molecule*) (Li *et al.*, 2010; Polo and Hochedlinger, 2010; Samavarchi-Tehrani *et al.*, 2010).

La regulación de la transición MET durante la reprogramación está mediada por la **vía de señalización de BMP** (Tabla 3 y Figura 13), en acción sinérgica con los factores OSKM. En concreto, BMP puede cooperar con la red transcripcional de regulación de la pluripotencia mediante la **inducción de las proteínas ID**, a través de la vía SMAD (Samavarchi-Tehrani *et al.*, 2010; Ying *et al.*, 2003). Estas proteínas actúan como reguladores positivos de la proliferación y como inhibidores de la diferenciación (Miyazono and Miyazawa, 2002). Paralelamente, la activación de la vía de BMP, en colaboración sinérgica con KLF4, induce la adquisición de un perfil genético epitelial durante la transición MET en la reprogramación de MEFs (Chen *et al.*, 2011).

Se ha sugerido que la acción sinérgica de BMP con OSKM podría estar mediada a través de interacciones directas entre SMAD1, OCT4 y SOX2 (Samavarchi-Tehrani *et al.*, 2010) que co-localizarían en las regiones reguladoras de sus genes diana. Además, tras la inducción de la vía de BMP, se produce un incremento en la expresión de *Sall4*, *Nanog* y *Oct4* endógenos. Estas acciones se producen solo en presencia de OSKM, ya que BMP por sí mismo no induce la transición MET durante la reprogramación (Chen *et al.*, 2011; Samavarchi-Tehrani *et al.*, 2010).

**Tabla 3. Vía de señalización de BMP.**

LIGANDOS: <b>BMPs</b>
<p>Las proteínas morfogenéticas de hueso (BMPs) son citoquinas pertenecientes a la superfamilia de TGF-<math>\beta</math>, que están involucradas en la regulación de la proliferación, migración, diferenciación, y apoptosis, desempeñando un papel esencial durante el desarrollo embrionario, así como en el mantenimiento de la pluripotencia de las ESCs (<b>Sieber et al., 2009</b>). Se han identificado más de 30 BMPs en varias especies (<b>Ducy and Karsenty, 2000</b>), siendo BMP2 y BMP4 los miembros mejor estudiados de esta familia. Estos ligandos son secretados como formas activas.</p> <p>Existen antagonistas extracelulares de esta vía, que se unen a los ligandos BMP, bloqueando su interacción con los receptores. Pertenecen a tres familias: CHORDIN/NOGGIN, Twisted Gastrulation (TSG) y DAN/CERBERUS, que antagonizan directamente BMP2 y BMP4 (<b>Tong et al., 2015</b>).</p>
RECEPTORES
<p>Receptores transmembrana serina/treonina quinasa de tipo I y tipo II (<b>Miyazono et al., 2010</b>). El receptor funcional es un heterotetrámero constituido por dos receptores de tipo I (ALK2, ALK3 y ALK6 son los relacionados con la respuesta a BMPs) y dos receptores de tipo II (se han identificado BMPRII, ActRIIA, ActRIIB) (Tong et al., 2015).</p>
MEDIADORES INTRACELULARES QUE TRANSDUCEN LA SEÑAL: <b>SMADs</b>
<p>Familia de factores de transcripción implicada en la señalización de las vías de BMP y TGF-<math>\beta</math>. En los mamíferos, se han descrito tres grupos de proteínas SMAD (Wrana, 2000): los SMADs regulados por receptor (R-SMADs: SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD5 y SMAD8), el SMAD mediador común (co-SMAD: SMAD4) y los SMAD inhibidores (I-SMADs: SMAD6 y SMAD7).</p> <p>Los receptores inician la señalización intracelular mediante la fosforilación de los R-SMAD, produciéndose la formación de un heterotrímero integrado por dos R-SMAD y la proteína co-SMAD (Kawabata et al., 1998). En general, SMAD1, SMAD5 y SMAD8 son activados por receptores de BMP, mientras que SMAD2 y SMAD3 son activados por receptores de TGF<math>\beta</math> y activina (Attisano and Wrana, 2002; Massague, 1998).</p> <p>Los SMADs pueden interactuar con diversos factores de transcripción (incluyendo FAST1, c-JUN-c-FOS, o PEBP2/RUNX) y reclutar tanto co-activadores transcripcionales (p300 o CBP, que activan la transcripción a través de la acetilación de histonas), como co-represores transcripcionales (TGIF y c-SKI, que se unen a los complejos SMAD e inhiben la transcripción mediante el reclutamiento de desacetilasas de histonas) (Ishida et al., 2000).</p>
SEÑALIZACIÓN CANÓNICA
<p>Tras la unión de los ligandos extracelulares a los receptores, el receptor tipo II fosforila al receptor tipo I, que es el encargado de la fosforilación de los SMAD1/5/8 quienes, a su vez, reclutan a SMAD4. Este complejo trimérico es translocado al núcleo para regular la transcripción de genes diana, tales como <i>Id1</i>, <i>Id2</i>, <i>Id3</i>, <i>Gata2</i> o <i>Fgfr2</i> (<b>Attisano and Wrana, 2002; Miyazono et al., 2005</b>).</p>
AUTO-REGULACIÓN POR <b>SMADs INHIBIDORES</b>
<p>La activación de la expresión de los I-SMADs está inducida por miembros de la propia superfamilia de TGF-<math>\beta</math>, lo que da lugar a un circuito de retroalimentación negativa. Mientras que SMAD6 preferiblemente bloquea la vía de señalización de BMP, SMAD7 actúa como un inhibidor general tanto de la señalización de TGF-<math>\beta</math> como de BMP. (Hayashi et al., 1997; Imamura et al., 1997; Nakao et al., 1997; Souchelnytskyi et al., 1998)</p> <p>Los I-SMAD pueden antagonizar las rutas de señalización por diferentes mecanismos: compitiendo con los R-SMADs por la interacción con el receptor, reduciendo la fosforilación C-terminal de los R-SMAD, interfiriendo con la formación de los complejos R-SMAD/Co-SMAD, etc. De hecho, SMAD6 puede competir específicamente con SMAD4 para evitar la formación de un complejo activo de SMAD1-SMAD4 (<b>Hata et al., 1998</b>). Por otra parte, los I-SMADs pueden reclutar a la ubiquitina ligasa Smurf E3 a los receptores de tipo I, promoviendo la degradación proteasomal de los receptores (<b>Ebisawa et al., 2001; Kavsak et al., 2000; Murakami et al., 2003</b>). Además, los I-SMADs pueden inhibir el reclutamiento de co-activadores por los R-SMADs (<b>Bai et al., 2000</b>) o interferir la formación de complejos SMAD-DNA funcionales (<b>Zhang et al., 2007</b>).</p>

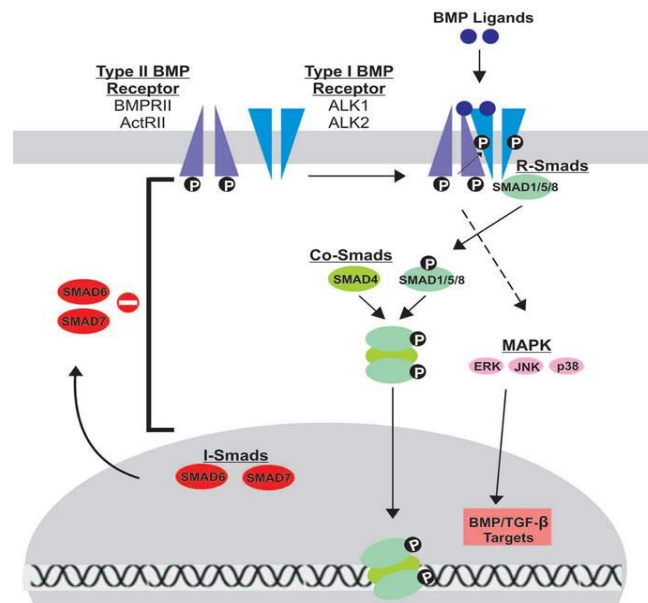


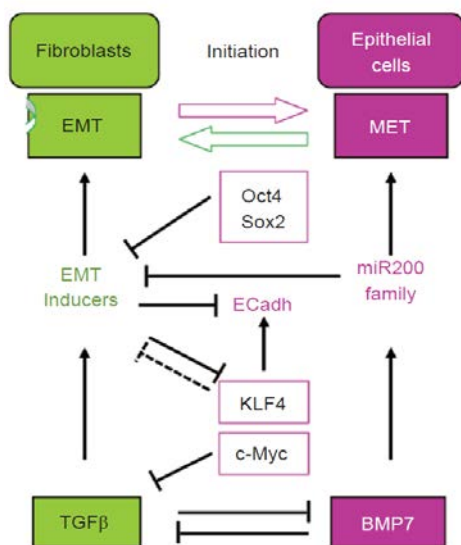
Figura 13. Vía de señalización de BMP. Adaptado (Beederman *et al.*, 2013).

Otro elemento primordial de la regulación de la transición MET son los microRNAs de la familia miR-200 (Figura 14). La vía de señalización de BMP participa, junto con los factores OSKM, en **la inducción de la expresión de miR-200 y miR-205**, que son potentes represores mesenquimales y, por tanto, claves para mantener la identidad epitelial y promover la progresión de la transición MET (Samavarchi-Tehrani *et al.*, 2010). También se ha demostrado que las proteínas de la familia TET (*Ten-eleven translocation*), que promueven la desmetilación del DNA, están implicadas en la activación de los promotores de los miRs de la familia miR-200, lo que hace que esta familia de metilcitosina hidroxilasas sean necesarias para la generación de iPSCs en ratón (Hu, 2014).

Junto con su papel en la transición MET, los factores OSKM son los responsables de bloquear EMT mediante el silenciamiento de la vía de señalización de TGFβ y de sus genes diana, *Snail*, *Slug*, *Zeb1*, *Zeb2* y *Twist*. Concretamente, SOX2/OCT4 bloquean la transcripción de *Snail*, KLF4 también regula a *Snail* y compete con ZEB2 en su unión al promotor de *Cdh1*, y c-MYC interfiere en la vía de señalización de TGFβ (Koopmansch *et al.*, 2013; Yori *et al.*, 2010). En resumen, estas redes de regulación impiden la expresión de los factores de transcripción asociados con EMT (*Snail*, *Slug*, *Zeb1*, *Zeb2* y *Twist*), la cual disminuye drásticamente la eficiencia del proceso de reprogramación, debido a que estos factores reprimen transcripcionalmente *Cdh1* (Batlle *et al.*, 2000; Cano *et al.*, 2000; Ichida *et al.*, 2009; Maherali and Hochedlinger, 2009; Nieto, 2002). Como se ha indicado, la expresión de E-CADHERINA es necesaria para la reprogramación celular



debido al papel fundamental de esta proteína en las uniones intercelulares adherentes (Cavallaro and Christofori, 2004; Li *et al.*, 2010). En este sentido, se ha demostrado que el empleo de compuestos que promueven la expresión de E-CADHERINA, como la apigenina o la luteolina, puede mejorar la eficiencia de reprogramación (Chen *et al.*, 2010). Asimismo, la inhibición de la señalización de TGF $\beta$ , facilita la generación de iPSCs en ratón (Li *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2013b).



**Figura 14. Regulación entre la transición EMT y MET en reprogramación celular.** Tomado de (Ocana and Nieto, 2010).

### 3.2 FASE DE MADURACIÓN

La transición desde la fase de iniciación a la fase de estabilización está descrita como un paso en “cuello de botella”, que refleja la baja eficiencia del proceso de reprogramación y da lugar a una fase intermedia más larga que la fase de iniciación (Hawkins *et al.*, 2014; Tanabe *et al.*, 2013). En esta fase desaparece por completo la expresión de los marcadores mesenquimales, mientras que paralelamente se activa gradualmente la expresión de genes asociados a la pluripotencia como *Fbxo15*, *Sall4*, seguido por *Nanog*, *Esrrb* y *Oct4* endógeno (Brambrink *et al.*, 2008; Buganim *et al.*, 2012; Golipour *et al.*, 2012; Polo *et al.*, 2012; Tanabe *et al.*, 2013).

Se ha descrito que la activación endógena de *Nanog*, inducida por *Oct4* y *Sox2*, (Boyer *et al.*, 2006; Niwa, 2007; Takahashi *et al.*, 2007; Takahashi and Yamanaka, 2006) es un evento necesario e irreversible para la completa maduración de las iPSCs (Samavarchi-Tehrani *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2009); de hecho, bloquear la expresión de

*Nanog* impide la progresión hacia la fase de estabilización (Mikkelsen *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2009; Theunissen and Silva, 2011). No obstante, también ha sido publicado que *Nanog* es prescindible para la generación de las iPSCs si las células se cultivan en un medio óptimo conteniendo ácido ascórbico (Schwarz *et al.*, 2014). Por ello, aunque NANOG, junto con OCT4, son buenos indicadores de la reprogramación, su expresión no garantiza la reprogramación completa de las células (Buganim *et al.*, 2012; Polo *et al.*, 2012; Takahashi and Yamanaka, 2006).

El proceso de reprogramación se va completando con la expresión gradual de genes de pluripotencia asociados con la fase de estabilización, que inician su expresión cerca del final de la fase de maduración, coincidiendo con el inicio de la segunda "oleada" de cambios moleculares. Sin embargo, estos genes son reprimidos por los transgenes OSKM (Golipour *et al.*, 2012). Por ello, para que finalice el proceso, es necesario que tenga lugar el silenciamiento total de los transgenes OSKM. Este proceso es llevado a cabo por la familia de metiltransferasas Dnmt3a (Buganim *et al.*, 2012; Golipour *et al.*, 2012; Samavarchi-Tehrani *et al.*, 2010; Stadtfeld *et al.*, 2008a). Mientras tanto, la expresión endógena de *Nanog* y *Oct4* prepara a las células para la auto-renovación independiente de OSKM y el progreso exitoso hacia la fase final de estabilización (David and Polo, 2014; Golipour *et al.*, 2012). A partir de esta fase intermedia, la secuencia de eventos que tiene lugar debe proceder de forma jerárquica y organizada (Buganim *et al.*, 2012; David and Polo, 2014; Golipour *et al.*, 2012; Hawkins *et al.*, 2014; Papp and Plath, 2011; Xu *et al.*, 2016).

### **3.3 FASE DE ESTABILIZACIÓN**

La fase de estabilización comienza con el final de la segunda "oleada" de grandes cambios transcripcionales y proteómicos y se caracteriza por la reactivación secuencial de genes responsables del mantenimiento y regulación de la pluripotencia, como son *Lin28*, *Rex1*, *Dppa2* (*Developmental pluripotency associated 2*), *Dppa3*, *Dppa4*, *Dppa5*, *Gdf3* (*Growth and differentiation factor*) y *Utf1* (Buganim *et al.*, 2012; Hansson *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2010; Polo *et al.*, 2012; Samavarchi-Tehrani *et al.*, 2010; Takahashi and Yamanaka, 2016). En particular, LIN28, actúa como un factor pro-reprogramador (Hanna *et al.*, 2009b) inhibiendo la reversión del proceso de reprogramación (Tanabe *et al.*, 2013), y no es hasta el final de la fase de estabilización que tiene lugar la activación de la expresión de *Sox2* endógeno, evento tardío imprescindible para que tenga lugar la restauración de la red de regulación transcripcional de la pluripotencia, OCT4, SOX2 y

NANOG (Buganim *et al.*, 2012; Takahashi *et al.*, 2014). De hecho, solo las células que reactivan este programa son capaces de mantener la pluripotencia (Golipour *et al.*, 2012). Finalmente, las células adquieren un estado pluripotente estable, que se mantiene con independencia de la expresión de OSKM, y se induce la expresión de PECAM, uno de los marcadores más característicos de la fase tardía del proceso (Araki *et al.*, 2010; Buganim *et al.*, 2012; Golipour *et al.*, 2012; Hansson *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2010; Megyola *et al.*, 2013; Samavarchi-Tehrani *et al.*, 2010).

Aunque las células ya han adquirido la pluripotencia, los cambios epigenéticos continúan (Ho *et al.*, 2011; Stadtfeld and Hochedlinger, 2010). Tiene lugar el alargamiento de los telómeros mediante la reactivación de la telomerasa (Marion *et al.*, 2009; Stadtfeld *et al.*, 2008a), o la reactivación del cromosoma X inactivo en células con dotación cromosómica XX de ratón (Stadtfeld *et al.*, 2008a). Otro reordenamiento epigenético que puede ser asignado a la fase de estabilización es el fenómeno de la "memoria epigenética". Se conoce que las iPSCs pueden guardar cierta memoria de las células de las que derivan y ser menos eficaces a la hora de producir células diferenciadas distintas a las del origen (Kim *et al.*, 2010). Por ello, a pesar de que las iPSCs son morfológicamente equivalentes a las ESCs, pueden existir pequeñas diferencias funcionales, transcripcionales y epigenéticas entre ellas (Maherali *et al.*, 2007; Mikkelsen *et al.*, 2008; Okita *et al.*, 2007; Wernig *et al.*, 2007).

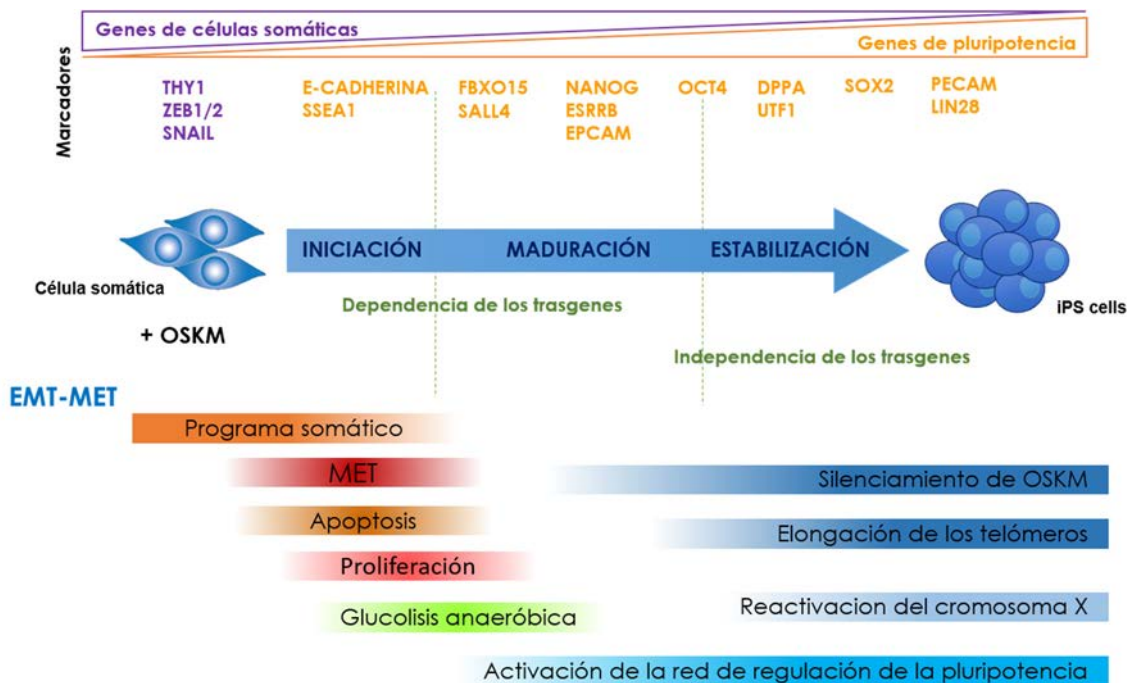


Figura 15. Fases del proceso de reprogramación y eventos moleculares secuenciales característicos

#### 4. BARRERAS Y FACILITADORES MOLECULARES DE LA REPROGRAMACIÓN

El incremento de los conocimientos sobre la reprogramación celular y las redes de regulación inducidas por OSKM ha permitido identificar una serie de barreras que actúan disminuyendo la eficiencia del proceso, por lo que en los últimos años se han desarrollado diversas estrategias para facilitar la reprogramación e incrementar su eficiencia (Ebrahimi, 2015).

Una de las estrategias iniciales fue analizar **diferentes combinaciones de los factores OSKM** para inducir la pluripotencia (Higuchi *et al.*, 2015). Muy pronto se descubrió que c-MYC era prescindible (Nakagawa *et al.*, 2008) y, posteriormente, se demostró que otros miembros de la familia de SOX y KLF podían reemplazar a los factores de Yamanaka (Tabla 4). En el caso de la familia MYC, L-MYC ha sido propuesto como sustituto, ya que su capacidad oncogénica es mucho menor que la del resto de los miembros de la familia (Nakagawa *et al.*, 2010; Wernig *et al.*, 2008).

Junto a estos factores de transcripción, se han identificado otros **reguladores del desarrollo embrionario temprano o el mantenimiento de la pluripotencia** que, bien en cooperación o bien en sustitución de alguno/s de los factores OSKM, pueden facilitar la reprogramación celular (Rony *et al.*, 2015); incluso se han descrito combinaciones de factores diana de OSKM (como ESRR $\beta$ , SALL4, LIN28 y NANOG), que pueden ser suficientes para reemplazar a los primeros y obtener iPSCs a partir de MEFs (Buganim *et al.*, 2012).

Tabla 4. Factores de transcripción que facilitan la reprogramación

Factor de sustitución	Factor sustituido	Referencia
<b>SOX1/SOX3/SOX15/SOX18</b>	SOX2	(Xu <i>et al.</i> , 2016)
<b>KLF2/KLF5/KFL1</b>	KLF4	(Xu <i>et al.</i> , 2016)
<b>ESRR<math>\beta</math></b> ( <i>Oestrogen-related receptor-<math>\beta</math></i> )	KLF4	(Xu <i>et al.</i> , 2016)
<b>GLIS1</b> ( <i>Glis family zinc finger protein 1</i> )	c-MYC	(Maekawa <i>et al.</i> , 2011)
<b>TBX3</b> ( <i>transduction of T-box transcription factor</i> )	c-MYC	(Han <i>et al.</i> , 2010)
<b>SALL4</b> ( <i>Sal-like protein 4</i> )	c-MYC	(Tsubooka <i>et al.</i> , 2009)
<b>NR5A1/2</b> ( <i>nuclear receptor subfamily 5 group A member 1/2</i> )	OCT4	(Xu <i>et al.</i> , 2016)
<b>TCL1</b> ( <i>T-cell lymphoma breakpoint 1</i> )	OCT4	(Xu <i>et al.</i> , 2016)
<b>BMI1</b> ( <i>polycomb complex protein BMI-1</i> )	SOX2/KLF4/c-MYC	(Rony <i>et al.</i> , 2015)

Entre los facilitadores moleculares de la reprogramación, no sólo se encuentran factores de transcripción, sino también algunos miRs y proteínas de unión al RNA. Entre estas últimas destaca **LIN28**, que puede incrementar la eficiencia de la reprogramación tanto promoviendo la expresión de OCT4, como bloqueando la diferenciación celular,

al inhibir el procesamiento y maduración de miRs de la familia de let-7 (Rybak *et al.*, 2008; Viswanathan *et al.*, 2008).

Varios **miRs** reguladores de la pluripotencia han sido identificados como **facilitadores de la reprogramación**. Destacan la familia de miR-200, miR-290 y miR-302 que, junto con OSK, favorecen la obtención de iPSCs (Rosa and Brivanlou, 2013). Además, se ha demostrado que la combinación de miR-302, miR-200c y miR-369 puede reprogramar tanto células somáticas murinas como humanas en ausencia de los factores de reprogramación (Rosa and Brivanlou, 2013).

También existen otras familias de **miRs que pueden bloquear el proceso de reprogramación celular**. Entre ellas destaca la familia miR-34, constituida por miR-34a, miR-34b y miR-34c (Choi *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2011), que actúa como barrera de la reprogramación al ser una diana transcripcional de p53 (Chang *et al.*, 2007; Lüningschrör *et al.*, 2013). Además, se ha demostrado que el bloqueo de la reprogramación mediado por miR-34a es debido a la represión de genes de pluripotencia como *Nanog*, *Sox2* y *N-Myc* (Choi *et al.*, 2011). Especial mención merece también la familia de miRs let-7, que inhibe la expresión de factores de pluripotencia, incluyendo LIN28, c-MYC y SALL4 (Heinrich and Dimmeler, 2012; Melton *et al.*, 2010; Rosa and Brivanlou, 2013), y reguladores críticos del ciclo celular como CDK6, CDC25A y ciclina D, revisado en (Mallanna and Rizzino, 2010). Otros miRs, como miR-21 y miR-29a, que se expresan abundantemente en los MEFs, interfieren con el proceso de reprogramación, y se ha demostrado que miR-199a-3p inhibe la proliferación celular mediante la parada del ciclo celular a través de p53 (Wang *et al.*, 2012).

Las iPSCs se caracterizan no solo por su pluripotencia, sino también por su capacidad de auto-renovación, la cual está asociada a la capacidad para proliferar de forma ilimitada. En este sentido, se ha descrito una correlación positiva entre la tasa de proliferación y la eficiencia de la reprogramación (Ebrahimi, 2015), demostrándose que la inducción de la proliferación promueve la obtención de células reprogramadas (Ruiz *et al.*, 2011); no obstante, es necesario mencionar que algunos autores han indicado que tasas de proliferación elevadas en los MEFs correlacionan con una menor eficiencia de reprogramación (Gupta *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2013).

Los estudios genómicos y de *single-cell imaging* durante el proceso de reprogramación han puesto de manifiesto que, en la fase de iniciación, se produce una activación de genes asociados con la proliferación (Mikkelsen *et al.*, 2008; Polo *et al.*, 2012), reduciéndose el tiempo de duplicación de los MEFs para hacerse similar al de las

ESCs (Smith *et al.*, 2010). También se conoce que, en esta fase, la mayoría de las células que comienzan a expresar los factores OSKM son incapaces de activar los eventos tempranos de la reprogramación y experimentan procesos de parada del ciclo celular, apoptosis o senescencia. Por ello, los genes que regulan todos estos procesos celulares representan algunas de las barreras más importantes para la reprogramación (Popowski and Tucker, 2015) y, en consonancia con esto, la represión de los principales genes supresores tumorales, como *p53* (Hong *et al.*, 2009), *Rb1* (retinoblastoma) (Kareta *et al.*, 2015) o el locus *Ink4a/Arf* (Li *et al.*, 2009a)(Han Li 2009), incrementan la eficiencia del proceso de reprogramación.

## 5. LA FAMILIA DE p53

Las vías de señalización que regulan el mantenimiento de la auto-renovación y la pluripotencia en las ESCs están conectadas por diversas redes transcripcionales que son necesarias para controlar el estado indiferenciado de las células (Guofeng Han, 2013). Muchas de estas vías implican procesos de proliferación, apoptosis o diferenciación (Kokovay *et al.*, 2008; Molofsky *et al.*, 2003), que, en la mayoría de los casos, están regulados por los miembros de la familia de p53.

La familia de p53 está formada por los factores de transcripción p53, p73 y p63. El gen *p53* (también conocido como *TP53* en humano y *Trp53* en ratón) se identificó en 1979 y fue considerado inicialmente un oncogén (DeLeo *et al.*, 1979; Lane and Crawford, 1979; Linzer and Levine, 1979). A finales de 1980, se descubrió que el alelo silvestre de *p53* funciona suprimiendo la proliferación celular y se clasificó, por tanto, como gen supresor tumoral (Levine and Oren, 2009). Desde entonces ha sido protagonista de numerosas investigaciones, ya que es el gen supresor tumoral más frecuentemente mutado en tumores humanos, afectando casi a la mitad de ellos (Weinberg, 2007)(Weinberg 2007). Los otros dos miembros de la familia se identificaron 15 años después. El gen *p73* fue clonado en 1997 (Kaghad *et al.*, 1997) y el gen *p63* en 1998 (Augustin *et al.*, 1998; Osada *et al.*, 1998; Schmale and Bamberger, 1997; Senoo *et al.*, 2001; Trink *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1998).

## 5.1 ORGANIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LA FAMILIA DE P53

El gen *TP53* está localizado en el cromosoma 17p13.1 y se compone de 19.198 nucleótidos repartidos en 11 exones. El gen *TP63* se encuentra en el cromosoma 3q27-29 y se compone de 265.822 nucleótidos divididos en 15 exones. El gen *TP73* se localiza en el cromosoma 1p36.3 y se compone de 80.728 nucleótidos divididos en 14 exones (Belyi *et al.*, 2010a).

La familia de *p53* está muy conservada evolutivamente, desde *Drosophila melanogaster* hasta la especie humana (Stiewe, 2007) y todos sus miembros comparten una gran homología estructural, compuesta por tres dominios funcionales básicos: un dominio de transactivación (TAD) situado en el extremo 5'NH<sub>2</sub>-terminal (N-terminal), seguido de un dominio central de unión al DNA (DBD) y un dominio de oligomerización (OD) situado en el extremo 3'COOH-terminal (C-terminal), (Moll and Slade, 2004) (Figura 16).

El **dominio TAD** es el responsable de la activación de los genes diana, contactando con la maquinaria transcripcional RNA polimerasa II y con algunos reguladores de la transcripción como E2F, p300 y la proteína de unión CREB (Zeng *et al.*, 2000). Evolutivamente es la región menos conservada entre especies y la que presenta menor homología entre los miembros de la familia.

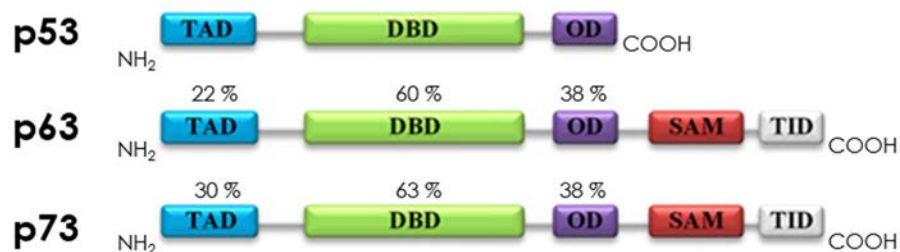
El **dominio DBD** determina el reconocimiento y la unión específica al DNA. Es el dominio más conservado (Yoon *et al.*, 2015), especialmente los aminoácidos que contactan con el DNA, por ello, los tres miembros de la familia pueden unirse a la misma secuencia consenso, denominada elemento de respuesta a p53 (p53RE) y regular la transcripción de los mismos genes diana (Grob *et al.*, 2001). El p53RE consta de dos copias de un motivo palindrómico consenso: 5'RRRCWWGYYY3' separados por 0-13 pares de bases (pb), en la que R es purina, W es Adenina o Timina e Y es pirimidina. En total unas 20-30 pb que se encuentran a una distancia menor de mil pb desde el sitio de inicio de la transcripción (Lokshin *et al.*, 2007; Smeenk *et al.*, 2008). La mayoría de las mutaciones encontradas en tumores humanos son cambios de sentido en estos dominios DBD, lo cual subraya la relevancia funcional de los mismos (Yoon *et al.*, 2015). En *TP53* se han identificado al menos 6 mutaciones por cambio de sentido, en las posiciones 175, 245, 248, 249, 273 y 282, siendo las más frecuentes p53-R175H, p53-Y220C o p53-R248W (Freed-Pastor and Prives, 2012b).

No obstante, p63 y p73, pero no p53, pueden unirse además a elementos de respuesta específicos, p63RE y p73RE, que son secuencias palindrómicas consenso ligeramente diferentes a los p53RE (Murray-Zmijewski *et al.*, 2006; Sasaki *et al.*, 2005). En particular, mientras que p53 se une preferiblemente a secuencias consenso que contienen CATG (en sustitución a CWWG), p63 se une tanto a CATG como a CGTG (Osada *et al.*, 2005). Asimismo, se determinó que la capacidad de activación transcripcional de los distintos miembros de la familia es inversamente proporcional a la distancia existente entre los dos motivos palindrómicos consenso, ya que la estructura cuaternaria adoptada por el DBD es determinada por el número de pb entre ambos motivos. En este sentido, se identificó que la actividad transcripcional de p73 disminuye drásticamente cuando la distancia es superior a dos pb, mientras que p53 tolera distancias mayores (Ethayathulla *et al.*, 2012). Esto podría explicar por qué los miembros de la familia de p53, a pesar de tener una especificidad de secuencia similar, muestran patrones de expresión génica diferentes y variables (Candi *et al.*, 2014).

El **dominio OD** es indispensable para la función biológica de todos los miembros de la familia de p53, ya que es responsable de la formación de tetrámeros funcionales. Todos los miembros de la familia deben formar homo-tetrámeros (dímeros de dímeros) para ser transcripcionalmente activos, por ello se conoce también como dominio de tetramerización. Sin embargo, solo p63 y p73 son capaces de interactuar entre sí a través de su dominio OD para formar hetero-tetrámeros (Coutandin *et al.*, 2009; Davison *et al.*, 1999). Por el contrario, p53wt no es capaz de oligomerizar ni con p63 ni con p73 a través del dominio OD, aunque se ha descrito que las formas mutantes de p53 que presentan mutaciones de cambio de sentido en su dominio DBD (Freed-Pastor and Prives, 2012a), pueden unirse a p63 y p73 e inactivarlos mediante interacción con el dominio DBD (Bensaad *et al.*, 2003; Gaiddon *et al.*, 2001; Marin *et al.*, 2000; Strano *et al.*, 2002). El dominio OD también incluye las señales de importación nuclear (NLS) y exportación nuclear (NES), ambas muy conservadas (Stommel *et al.*, 1999).

La región C-terminal de p63 y p73, pero no p53, también presenta un dominio a-estéril (**SAM**), implicado en interacciones proteína-proteína (Chi *et al.*, 1999), y un dominio de inhibición de la transactivación (**TID**), que disminuye la capacidad de activación transcripcional (Arfaoui *et al.*, 2010; Ozaki *et al.*, 1999), mediante una interacción intramolecular con el dominio TAD (Straub *et al.*, 2010).





**Figura 16. Organización estructural de los miembros de la familia de p53.** Dominios estructurales de los miembros de la familia de p53 con su porcentaje de homología con respecto a p53. Adaptado de Dotsch *et al.*, 2010.

Todos los miembros de la familia de p53 presentan múltiples isoformas, algunas de ellas con funciones completamente distintas (Bourdon *et al.*, 2005), debido a la utilización de diferentes promotores y a la maduración alternativa del mRNA, tanto en el extremo N- como en el C-terminal (De Laurenzi *et al.*, 1998; Grob *et al.*, 2001).

El gen *TP73* presenta dos promotores, P1 y P2 (Figura17). El promotor P1 está localizado aguas arriba del exón 1 y da lugar a las proteínas completas que contienen el dominio TAD en su extremo N-terminal (isoformas **TA**). Mientras que el promotor P2, localizado dentro del intrón 3, genera las proteínas truncadas carentes del dominio TAD (isoformas **ΔN**) (Yang and McKeon, 2000). A su vez, la maduración alternativa de todos los transcritos en el extremo 3' genera al menos siete isoformas C-terminales, α, β, ε, γ, ζ, δ, η, identificadas en células normales y tumorales, y una octava isoforma η', que solo ha sido detectada en células tumorales, que difieren en su potencial para activar los genes diana (De Laurenzi *et al.*, 1998; Moll and Slade, 2004). En células tumorales también se han encontrado otras variantes que difieren por maduración alternativa en su dominio N-terminal, y que se denominan **ΔEx2** (carentes del exón 2), **ΔEx2/3** (carentes del exón 2 y 3) y **ΔN'p73** (Dominguez *et al.*, 2006; Stiewe and Putzer, 2002; Stiewe *et al.*, 2004). En concreto, *TP73* mediante la maduración alternativa del mRNA y la transcripción a partir del promotor P1 y P2, puede transcribir a 35 variantes de mRNA, que en teoría se pueden traducir en 29 proteínas diferentes, aunque hasta el momento solo se han descrito 14 (Candi *et al.*, 2014).

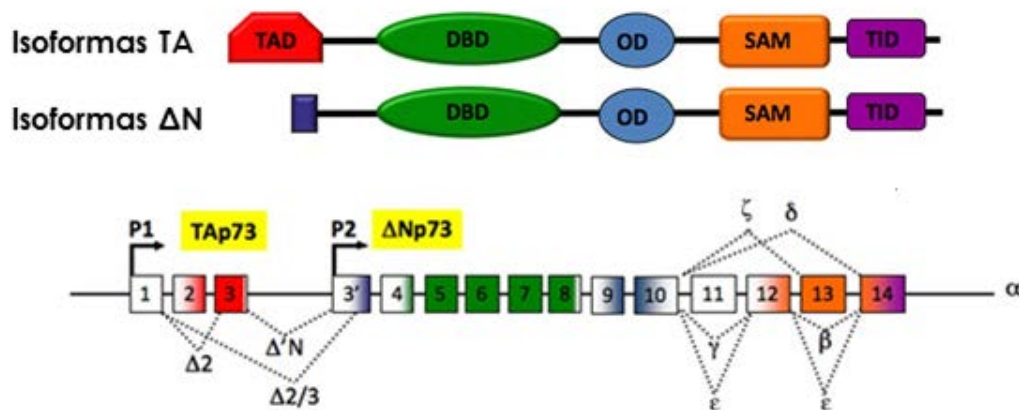
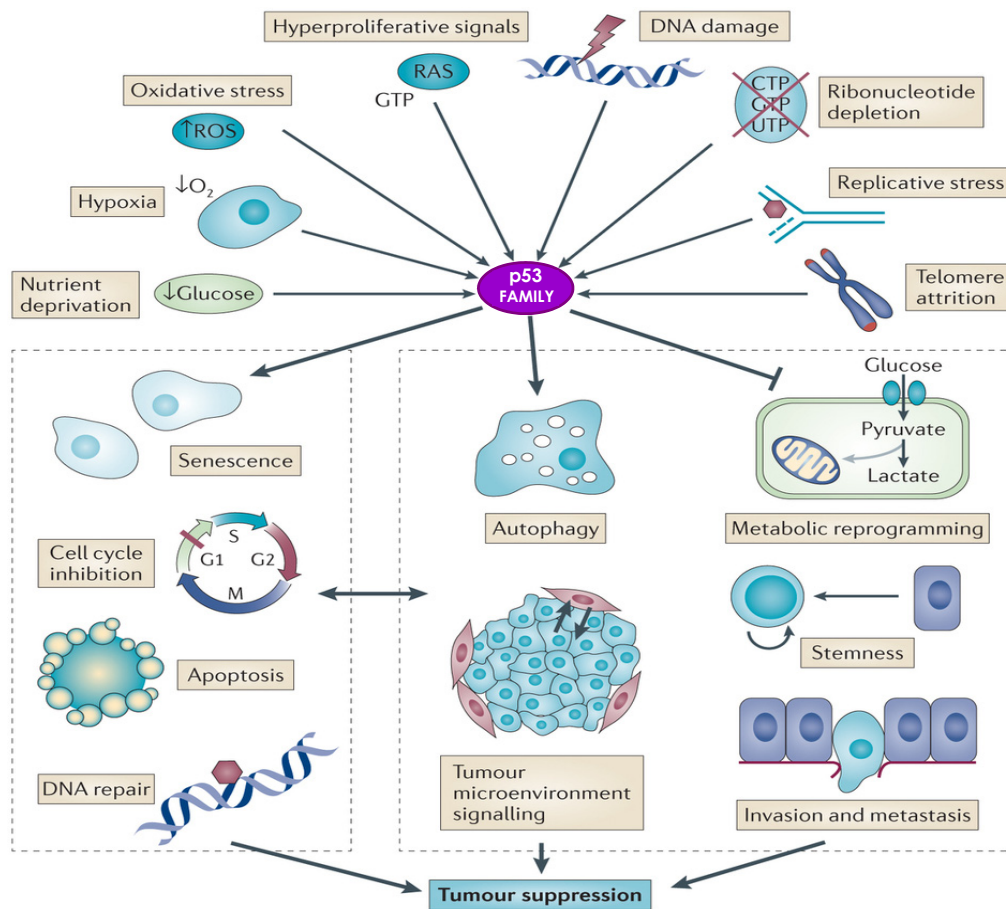


Figura 17. Organización genómica de *TP73* y representación de las isoformas TA y  $\Delta$ N. Tomado de Candi *et al.*, 2014.

## 5.2 FUNCIONES BIOLÓGICAS DE LA FAMILIA DE P53

La proteína supresora tumoral p53 posee un papel central en el mantenimiento de la integridad genómica y la proliferación celular en respuesta a señales de estrés, generando una respuesta coordinada que induce parada del ciclo celular y mecanismos de reparación del DNA. Si estos procesos fallan, promueve la senescencia y/o la muerte celular programada (apoptosis) (Collavin *et al.*, 2010; Levine, 1997). En su conjunto, estas funciones señalan a p53 como el "guardián del genoma" (Lane, 1992). Sin embargo, la función de p53 no solo se limita a prevenir el desarrollo de tumores. Varios estudios han demostrado que p53 desempeña un papel activo durante el desarrollo y la diferenciación (Armstrong *et al.*, 1995). Asimismo, también está implicado en otros procesos celulares, incluyendo el metabolismo, la autofagia, la migración celular, la auto-renovación y la reprogramación celular (Figura 18) (Bieging *et al.*, 2014; Spike and Wahl, 2011).

La compleja organización estructural de los miembros de la familia de p53 confiere flexibilidad y permite la regulación de numerosos procesos biológicos mediante una red de señalización interconectada entre sí (Murray-Zmijewski *et al.*, 2006), en la que p63 y p73 tienen muchas funciones compartidas con p53, pudiendo actuar de forma sinérgica, aunque también pueden tener funciones específicas propias y, en ocasiones, antagónicas (Collavin *et al.*, 2010).



**Figura 18. Red funcional de la familia de p53.** Los miembros de la familia de p53 se activan por diferentes señales de estrés. Una vez activados generan un conjunto de procesos celulares que constituyen la respuesta supresora tumoral. Tomado de Biegging *et al.*, 2014.

En concreto, la función dual de p73 se basa en la existencia de las isoformas TAp73 y  $\Delta$ Np73. Las isoformas completas de TAp73 ( $\alpha$  y  $\beta$ ) son capaces de unirse a los p53RE y transactivar genes diana de p53 (De Laurenzi *et al.*, 1998; Jost *et al.*, 1997; Kaghad *et al.*, 1997; Marques-Garcia *et al.*, 2009), llevando a cabo funciones de supresión tumoral, induciendo parada del ciclo celular, diferenciación, apoptosis y senescencia (De Laurenzi *et al.*, 2000b; Fang *et al.*, 1999; Jost *et al.*, 1997). Por el contrario, las formas truncadas  $\Delta$ Np73, en ciertos contextos celulares, pueden actuar como dominantes negativos sobre p53, TAp73 y TAp63 e inhibir su función (Murray-Zmijewski *et al.*, 2006; Zaika *et al.*, 2002). Esta dominancia puede desarrollarse a través de dos mecanismos, bien  $\Delta$ Np73 se une a p53, TAp73 y TAp63 y forma hetero-tetrámeros transcripcionalmente inactivos (Zoric *et al.*, 2013), o bien, compite por la unión a p53RE en los promotores de sus genes diana (Ishimoto *et al.*, 2002), inhibiendo sus funciones, y, por consiguiente, demostrando su función anti-apoptótica, que resulta en la

supervivencia celular. Además,  $\Delta Np73$  ( $\alpha$  y  $\beta$ ) puede transactivar genes dianas específicos, de manera independiente de p53 (Alvarez *et al.*, 2006; Kartasheva *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2004a; Tanaka *et al.*, 2004; Tanaka *et al.*, 2006), ejerciendo sus propias funciones. Asimismo, también puede cooperar con p53 en ciertos contextos celulares para realizar funciones fisiológicas a través de la activación de genes diana específicos (Goldschneider *et al.*, 2005; Marques-Garcia *et al.*, 2009). Por otra parte, se ha descrito un bucle de retroalimentación negativa mediante el cual TAp73 y p53 inducen la expresión de las isoformas de  $\Delta Np73$  por unión directa al promotor P2, que regula y mantiene el ratio de expresión entre las distintas isoformas (Grob *et al.*, 2001; Zaika *et al.*, 2002).

### 5.2.1 FUNCIÓN DE LA FAMILIA DE P53 EN EL DESARROLLO

Los modelos de ratones *Trp73*<sup>-/-</sup> y *Trp63*<sup>-/-</sup> revelan que ambos genes son necesarios para la embriogénesis (Mills *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2000), ya que mientras que los ratones *Trp53*<sup>-/-</sup> son capaces de completar su desarrollo embrionario, los ratones *Trp73*<sup>-/-</sup> y *Trp63*<sup>-/-</sup> muestran importantes problemas durante el mismo.

Más concretamente, los ratones *Trp53*<sup>-/-</sup> se desarrollan con normalidad, pero presentan una alta predisposición a desarrollar tumores en edad temprana (Donehower *et al.*, 1992). Por el contrario, los ratones *Trp73*<sup>-/-</sup> nacen viables a pesar de que generalmente mueren dentro de los dos primeros meses, en la mayoría de los casos a causa de hemorragias gastrointestinales, craneales, así como por infecciones crónicas (Yang 2000). Según datos publicados por nuestro grupo, tanto los embriones E14,5, como ratones de 15 días *Trp73*<sup>-/-</sup>, muestran anemia leve, sugiriendo un defecto en el sistema eritroide, además de otros defectos en diferentes compartimentos hematopoyéticos (Marques-Garcia *et al.*, 2009). Asimismo, estos ratones demostraron que p73 es necesario para el mantenimiento del sistema nervioso y olfativo (Yang *et al.*, 2000), ya que presentan malformaciones en el hipocampo, donde se encuentra el giro dentado del hipocampo, que es uno de los nichos de células troncales neurales (NSC), hidrocefalia, corteza cerebral reducida y anomalías en las vías sensoriales de feromonas (Pozniak *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2000). En este contexto, nuestro grupo publicó, de forma independiente, junto con otros tres laboratorios, que p73 es necesario para mantener la capacidad de auto-renovación de las NSCs (Fujitani *et al.*, 2010; Gonzalez-Cano *et al.*, 2010; Talos *et al.*, 2010), así como para la maduración de las células endoteliales y el desarrollo de la citoarquitectura de los nichos neurogénicos (Gonzalez-Cano *et al.*,

2016). La mayoría de estos defectos neurológicos pueden explicarse por una ausencia o pérdida de neuronas. También, estos ratones presentan problemas inmunológicos, como infecciones crónicas e inflamación (Yang *et al.*, 2000).

Los ratones *Trp63* *-/-* nacen vivos, pero mueren poco después del nacimiento por deshidratación. Muestran un fenotipo severo, carecen de extremidades e incluyen alteraciones en varias estructuras epiteliales, incluyendo la piel, próstata, glándula mamaria y salival, dientes y folículos pilosos, indicando que se requiere de p63 para mantener la proliferación de las células troncales epiteliales durante el desarrollo (Mills *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1999).

Por otra parte, todos los miembros de la familia tienen funciones importantes en el control de la fertilidad materna, de hecho, la función del ancestro común encontrado en invertebrados era proteger la línea germinal de posibles daños en el DNA (Levine *et al.*, 2011). En este sentido, los tres miembros de la familia desempeñan funciones específicas, p63 controla la calidad y la maduración del óvulo, p73 mantiene la estabilidad genómica de los ovocitos y asegura una mitosis normal en el blastocisto en desarrollo y p53 regula la implantación del embrión a través del control de la transcripción de LIF (Hu *et al.*, 2011; Levine *et al.*, 2011).

### **5.2.2 FUNCIÓN DE LA FAMILIA DE P53 EN DIFERENCIACIÓN**

La diferenciación es un mecanismo de supresión tumoral, crucial durante el desarrollo (Sherr, 2004). Se describe como un proceso mediante el cual una célula se especializa para realizar una función específica, implica la división asimétrica de las células troncales y la adquisición gradual de características especializadas, mediante la activación de programas transcripcionales de especialización, así como mediante el silenciamiento de programas transcripcionales de pluripotencia y auto-renovación (Pasque *et al.*, 2011). Normalmente, las alteraciones en el programa de diferenciación pueden correlacionarse con enfermedades. Por ejemplo, las consecuencias de la pérdida de un fenotipo neural, o las dificultades para poder asegurar el estado diferenciado neural, han sido relacionadas con enfermedades neurodegenerativas como Parkinson y Alzheimer. De hecho, es probable que muchos de los síntomas tempranos de estas enfermedades se deban a la pérdida de función neuronal más que a la muerte celular (Liu *et al.*, 2010). Así, numerosas investigaciones relacionan el grado

de malignidad tumoral con el grado de diferenciación celular o con un incremento de la capacidad de auto-renovación (Ben-Porath *et al.*, 2008; Holmberg *et al.*, 2011).

Los miembros de la familia de p53 regulan varios procesos de diferenciación celular. p53 y p73 desempeñan un papel fundamental en la regulación de la auto-renovación y diferenciación de las células troncales neurales. Mientras que p53 es un regulador negativo de la proliferación de las NSCs (Meletis *et al.*, 2006), p73 es un regulador positivo (Gonzalez-Cano *et al.*, *Cell Death Disease*, 2010). En concreto, datos de nuestro grupo indican que la falta de TAp73 induce la diferenciación neuronal prematura (Gonzalez-Cano *et al.*, 2010). Asimismo, p53 promueve la maduración de las células B (Shaulsky *et al.*, 1991) y regula la diferenciación de neuronas y oligodendrocitos (Eizenberg *et al.*, 1996). Por el contrario, es un regulador negativo de la diferenciación adipogénica y osteoblástica (Molchadsky *et al.*, 2010). Por otra parte, se ha descrito que p73 mantiene algunas funciones únicas no compartidas con p53. Por ejemplo, p73 es suficiente para inducir la diferenciación de células de neuroblastoma *in vitro*, de forma independiente de p53 (De Laurenzi *et al.*, 2000a), y también se ha relacionado con la diferenciación mielóide (Tschan *et al.*, 2000) y monocítica (Morena *et al.*, 2002). p63 es necesario para la formación inicial de la epidermis durante el desarrollo y para la regeneración posterior del epitelio estratificado en el adulto (Koster and Roop, 2004).

En las ESCs, p53 garantiza la estabilidad genómica a través de la inducción de la diferenciación después del daño en el DNA (Zhao and Xu, 2010), mediante la inhibición directa de la expresión de *Nanog* (Lin *et al.*, 2005), permitiendo la parada del ciclo celular y una subsecuente reparación del DNA dañado, o alternativamente, en caso de daño persistente, la muerte celular programada (Spike and Wahl, 2011). Así, es posible que la pérdida funcional de p53 desestabilice el estado diferenciado y permita la reversión a un estado más pluripotente (Spike and Wahl, 2011). Por ello, es lógico considerar que un supresor tumoral puede ejercer su función controlando la diferenciación o impidiendo el regreso a un estado indiferenciado. En este sentido, numerosos estudios han demostrado que p53 actúa como una barrera importante en el proceso de reprogramación celular, como se explicará en el apartado 6.1.

El resultado de las interacciones p53/p73/p63, a veces sinérgicas y otras antagónicas, va a depender del contexto celular. Por ello, es importante tener en cuenta que el balance de la expresión de estas proteínas tiene un papel crucial en el desarrollo y mantenimiento de las estructuras multicelulares organizadas. Por tanto, conocer la regulación diferencial de cada proteína y de sus funciones específicas según

el tipo celular, contribuirá a una mejor comprensión de las funciones que desempeñan estos genes durante el desarrollo y la diferenciación celular (Molchadsky *et al.*, 2010).

### 5.2.3 FUNCIÓN DE LA FAMILIA DE P53 EN LA REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR

La regulación del ciclo celular es un proceso conservado evolutivamente, desde los organismos unicelulares hasta los animales superiores. La precisión en la regulación del ciclo asegura la supervivencia, mientras que errores en esa precisión aumentan la inestabilidad genómica, constituyendo un importante factor oncogénico (Nurse, 2000).

El ciclo celular consiste en una serie de eventos estrechamente regulados, organizados temporal y espacialmente, que resultan en la división celular. En 1951, Howard y Pele describieron el ciclo celular y sus fases (Golias *et al.*, 2004). Las etapas del ciclo celular son la fase G<sub>0</sub>, la interfase (G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> y fase S) y la fase mitótica. Las proteínas reguladoras que controlan la progresión del ciclo celular son las ciclinas, quinasas dependientes de ciclinas (CDK), sus proteínas sustrato, los inhibidores de CDK (CKI), p53 y Retinoblastoma. La existencia de los puntos de control, no solo asegura que el ciclo celular avance de modo adecuado, sino que también lo haga en las circunstancias apropiadas. En este contexto, p73 y p53 ejercen un control sobre el ciclo celular por medio de diferentes mecanismos.

p53 y TAp73 paran el ciclo celular en los puntos de control G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> cuando se reconoce el daño en el DNA, permitiendo la reparación del DNA antes de su replicación o de la división celular, respectivamente (Allocati *et al.*, 2012). La parada en G<sub>1</sub>/S está principalmente mediada por la activación de p57<sup>KIP2</sup>, que coordina la salida mitótica y la transición a G<sub>1</sub> (Balint *et al.*, 2002; Merlo *et al.*, 2005), y por p21<sup>CIP1</sup>, que inhibe los complejos CDK/ciclina, evitando así la fosforilación de Rb, que permanece unido a E2F, e impide la progresión del ciclo a la fase S (Jost *et al.*, 1997). TAp73 puede actuar también en el punto de control G<sub>2</sub>/M a través de la inhibición del complejo ciclinaB/CDK1 (quinasa dependiente de ciclina 1) y de la topoisomerasa IIa (Damia and Broggin, 2004; Innocente and Lee, 2005). Por el contrario, las isoformas ΔNp73 por interferencia con la actividad de TAp73 y p53 promueven la progresión del ciclo celular (Allocati *et al.*, 2012; Buhlmann and Putzer, 2008).

p73 también tiene un papel en mitosis. Aunque p73 está hiper-fosforilado durante esta fase, retiene la capacidad para activar la transcripción de genes como p57<sup>KIP2</sup>. Se ha descrito que TAp73 ejerce una función en el punto de control de la mitosis, ya que

interacciona y coopera con quinasas implicadas en el ensamblaje del huso mitótico, como BUB1 y BUB3. Por ello, alteraciones en la expresión de p73 resultan en inestabilidad genómica (Tomasini *et al.*, 2009; Vernole *et al.*, 2009)

#### **5.2.4 FUNCIÓN DE LA FAMILIA DE P53 EN APOPTOSIS**

En 1970, Kerr y colaboradores describieron la apoptosis como un proceso de muerte celular programada, mediada por una cascada de activación de caspasas y caracterizado por una serie de cambios morfológicos como la condensación de la cromatina, fragmentación del DNA y formación de cuerpos apoptóticos (Cheung *et al.*, 2012). La apoptosis representa la última barrera protectora que tiene la célula contra la tumorigénesis, ya que, si el daño en el DNA generado es irreparable, se activa esta respuesta para evitar la propagación de células con aberraciones genéticas (Elmore, 2007).

p73 ejerce una función en la regulación de la apoptosis, determinada por los niveles relativos de TAp73 y  $\Delta$ Np73. TAp73 ( $\alpha$  y  $\beta$ ) se consideran isoformas pro-apoptóticas, mientras que las isoformas  $\Delta$ Np73 desarrollan funciones anti-apoptóticas (Allocati *et al.*, 2012).

Al igual que p53, TAp73 y TAp63 pueden controlar la vía mitocondrial intrínseca transactivando los genes pro-apoptóticos *Bax* y *Puma* (Ramadan *et al.*, 2005). TAp73 también puede inducir apoptosis independiente de p53, activando la transcripción de *Gramd4* y *Noxa* (Flinterman *et al.*, 2005; John *et al.*, 2011). Por otra parte, TAp73 puede modular la ruta apoptótica extrínseca mediante la inducción de la expresión del receptor de muerte CD95 y, también, puede inducir la muerte celular a través de la vía de estrés del retículo endoplásmico mediante la regulación de SCOTIN, una proteína transmembrana localizada en el retículo endoplásmico. Por ello, se sugiere una función directa de p73 exonuclear, siendo independiente de sus actividades transcripcionales (Yoon *et al.*, 2015).

Sin embargo, como las isoformas  $\Delta$ Np73 actúan como dominantes negativas de las isoformas de TAp73, así como de p53,  $\Delta$ Np73 puede inhibir la apoptosis y promover la progresión del ciclo celular. Así, las isoformas  $\Delta$ Np73 confieren resistencia a la quimioterapia mediante la inhibición de la transactivación de CD95, *Bax* y *Scotin* (Damia and Brogginì, 2004; Muller *et al.*, 2005). Es interesante que, en respuesta al daño del DNA,



las isoformas  $\Delta Np73$  pueden degradarse, permitiendo que las isoformas TAp73 ejerzan su función (Allocati *et al.*, 2012).

### 5.2.5 FUNCIÓN DE LA FAMILIA DE P53 EN SENESCENCIA

La senescencia ha sido descrita como un mecanismo que implica la parada irreversible y permanente del ciclo celular (Rodier and Campisi, 2011). Se considera un mecanismo de supresión tumoral, aunque recientemente se ha propuesto que también contribuye al envejecimiento, la progresión tumoral y a la reparación de tejidos (Munoz-Espin and Serrano, 2014). Existen dos tipos de senescencia: la senescencia replicativa, que tiene lugar tras un número determinado de divisiones celulares progresivas, y la senescencia prematura, independiente del número de divisiones, que sucede como respuesta a señales de daño irreparable en el DNA, incluyendo daño telomérico, compuestos quimioterapéuticos o la activación de la expresión de oncogenes (Shay and Roninson, 2004). Las células senescentes *in vitro* se caracterizan por presentar una morfología más aplanada, extendida y aumentada, expresar  $\beta$ -galactosidasa asociada a la senescencia y presentar cambios dramáticos en la expresión génica y la estructura de la cromatina (Qian and Chen, 2013).

La senescencia está regulada por dos rutas interconectadas pero independientes: la ruta de p53-p21 y la ruta p16-Rb. p21 y p16, son CDKI que, entre otras actividades, previenen la fosforilación, y por tanto la inactivación, de Rb. El resultado es la supresión de la actividad de E2F, factor de transcripción que promueve la expresión de genes necesarios para la progresión del ciclo celular (Collado *et al.*, 2007; Sherr, 2012).

Los miembros de la familia de p53, p53, TAp63 y TAp73, están implicados en el control de la senescencia en respuesta al estrés genotóxico mediante la inducción del promotor de  $p21^{CIP1}$  (Nicolai *et al.*, 2015). Y en concreto,  $\Delta Np63$  inhibe los miRs específicos de senescencia, miR-138, miR-181a, miR-181b y miR-130b, por unión directa a los p63RE. Por ello, la supresión de la expresión de estos miRs es considerado un mecanismo de regulación para ajustar equilibrio entre la proliferación celular y la senescencia (Candi *et al.*, 2014).

Por otra parte, la producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS, *reactive oxygen species*), como respuesta al estrés oxidativo, inducen senescencia. En este sentido, la función de la familia de p53 en el control de ROS ha sido muy importante, ya que inducen la expresión de varios genes antioxidantes, como la enzima glutamina 2

(GLS2), clave en la ruta mitocondrial anti-oxidante (Giacobbe *et al.*, 2013; Vigneron and Vousden, 2010). Asimismo, los estudios con ratones TAp73 *-/-* demuestran que TAp73 protege contra el envejecimiento, mediante la regulación de la actividad mitocondrial, previniendo la acumulación de ROS (Rufini *et al.*, 2012).

En su conjunto, p53, p63 y p73 pueden cooperar para regular el balance entre la supervivencia, muerte celular y senescencia, teniendo en cuenta que los miembros de la familia de p53 dependen de otros reguladores y más en general del contexto celular.

### 5.3 LA FAMILIA DE P53 EN CÁNCER

p53 es considerado el supresor tumoral por excelencia y, como prueba de ello, el ratón carente de todas las isoformas de *Trp53* muestra una alta tasa de tumores espontáneos (Donehower *et al.*, 1992). Además, se ha documentado que *TP53* se encuentra mutado en la mayoría de los tumores humanos, con una tasa de incidencia superior al 50% en la mayoría de los casos (Olivier *et al.*, 2010).

La naturaleza de *TP73* y *TP63* como genes supresores tumorales fue inicialmente controvertida ya que, aunque pueden llevar a cabo funciones de supresión de crecimiento e inducción de apoptosis (Jost *et al.*, 1997), no suelen estar mutados en tumores humanos (su frecuencia de mutación es menor al 1%), y como comentamos, los ratones *Trp73 -/-* y *Trp63 -/-* mueren a edades tempranas sin desarrollar tumores (Mills *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2000).

No obstante, una gran cantidad de datos demuestran que tanto p63 como p73 tienen una función en la supresión tumoral. La primera evidencia es que pueden inducir la parada del ciclo celular, la reparación del DNA, la senescencia y la apoptosis en respuesta a drogas quimioterapéuticas, independientemente de p53 (Gressner *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2009b; Jost *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 2009). Por otra parte, análisis exhaustivos de la predisposición tumoral durante el envejecimiento de ratones heterocigotos *Trp73 +/-* y *Trp63 +/-* revelaron que estos ratones desarrollaban tumores espontáneos y el tiempo de supervivencia media era tan sólo unos pocos meses más que los ratones *Trp53 +/-* (Flores *et al.*, 2005). En particular, los tumores derivados de ratones *Trp73 +/-* mostraban pérdida de heterocigosidad en los alelos p73wt, característica típica de inactivación supresora tumoral en el cáncer (Rufini *et al.*, 2012). Además, la supervivencia de los ratones dobles heterocigotos *Trp53 +/-; Trp73 +/-* se redujo de 10 a 6 meses, debido al incremento del número de tumores que presentaban y a una

metástasis más agresiva. En la mayoría de los animales analizados, esa pérdida de heterocigosidad de p73 fue más frecuente que la pérdida del alelo de p53wt, demostrando la fuerte función supresora tumoral de p73 (Flores *et al.*, 2005).

La función de TAp73 en supresión tumoral está avalada por la caracterización fenotípica de los ratones carentes de TAp73 (TAp73  $-/-$ ), que reveló que la predisposición a la tumorigénesis espontánea y carcinogénesis inducida aumenta por pérdida específica de TAp73 *in vivo*, desarrollando principalmente adenocarcinomas de pulmón y generando infertilidad causada por la inestabilidad genómica del oocito, acentuando así la función de TAp73 como supresor tumoral que mantiene la integridad genómica (Tomasini *et al.*, 2008). Por el contrario, los ratones  $\Delta$ Np73  $-/-$  no desarrollan tumores. Sin embargo, diferentes estudios han puesto de manifiesto su potencial oncogénico en determinados contextos celulares (Bailey *et al.*, 2011), ya que  $\Delta$ Np73 se encuentra sobreexpresado en una amplia gama de tumores como próstata, tiroides, neuroblastomas o gliomas (Rufini *et al.*, 2012; Soldevilla *et al.*, 2013), en los que se correlaciona con mal pronóstico (Deyoung and Ellisen, 2007).

En resumen, los miembros de la familia de p53 ejercen una función de supresión tumoral a través del control de procesos celulares como el ciclo celular, apoptosis, senescencia, diferenciación, y las distintas combinaciones de ellos. No obstante, en ausencia de estrés, p63 y p73 están principalmente implicados en la regulación de procesos del desarrollo (Rufini *et al.*, 2012).

#### **5.4 LA FAMILIA DE P53 EN ANGIOGÉNESIS**

La angiogénesis es un proceso que ocurre durante el desarrollo y consiste en la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros pre-existentes, ampliando la red vascular mediante la formación de nuevos brotes vasculares (Folkman, 1971). Este proceso está dirigido tanto por señales locales procedentes de las células endoteliales, como por señales extrínsecas del microambiente tisular (Lee and Bautch, 2011). Implica la coordinación de múltiples procesos, como la diferenciación de precursores mesodérmicos hacia células endoteliales y la migración conjunta de células endoteliales polarizadas en el plano tisular, para llevar a cabo la morfogénesis vascular (Lee and Bautch, 2011).

En el adulto, la mayoría de los vasos sanguíneos permanecen quiescentes, pero las células endoteliales mantienen la capacidad de recibir y responder a estímulos

angiogénicos. Por lo tanto, es necesario que exista un balance entre factores pro- y anti-angiogénicos durante la homeostasis vascular. Así, en el adulto, la angiogénesis se restringe a determinadas condiciones fisiológicas, como la cicatrización de heridas, el ciclo menstrual o el desarrollo de la placenta durante el embarazo (Hoeben *et al.*, 2004; Weis and Cheresh, 2011). Sin embargo, las alteraciones en el potencial angiogénico pueden generar situaciones de crecimiento vascular incontrolado, como puede ser en cáncer y muchas patologías oculares e inflamatorias, o en el caso contrario, por defectos de vascularización, como en situaciones de isquemia o enfermedades coronarias (Schmidt and Carmeliet, 2011). En los últimos años, la angiogénesis ha sido objeto de intensas investigaciones y, debido a la elevada incidencia del cáncer, la angiogénesis tumoral, en concreto, ha suscitado especial interés (Hanahan and Weinberg, 2011).

Las pequeñas lesiones tumorales pueden permanecer latentes durante largos periodos de tiempo si se mantiene un adecuado equilibrio entre factores pro- y anti-angiogénicos. Sin embargo, en un momento dado, algunas células tumorales pueden adquirir la capacidad de inducir neovascularización, es decir "la habilidad de inducir la formación de vasos sanguíneos a voluntad" (Weinberg, 2013). Esto se denomina "activación de la angiogénesis" (*angiogenic switch*) y constituye un momento clave en la progresión tumoral, condicionado por la presencia de ciertos estímulos, como puede ser la inducción de la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A) en condiciones de hipoxia (Krock *et al.*, 2011). A su vez, la propia vasculatura tumoral, que es muy irregular, tortuosa y desorganizada, condiciona un ineficiente transporte de oxígeno y nutrientes, pudiendo contribuir a la inducción de la angiogénesis (Jain, 2005).

La red de señalización implicada en el control de la angiogénesis tumoral se regula de manera similar a la angiogénesis que opera durante el desarrollo (Ziyad and Iruela-Arispe, 2011). Por lo tanto, es probable que los genes supresores que regulan negativamente el crecimiento del tumor sean potentes inhibidores de la angiogénesis, mientras que oncogenes que impulsan la formación de tumores también induzcan la expresión de factores pro-angiogénicos (Bergers and Benjamin, 2003). En este contexto, la activación de p53 puede inhibir la angiogénesis tumoral mediante distintos mecanismos, como inhibir el factor inducible por hipoxia (HIF), incrementar la producción de factores inhibidores de la angiogénesis o reprimir factores pro-angiogénicos, como VEGF o bFGF (Farhang Ghahremani *et al.*, 2013). No obstante, también se ha descrito que  $\Delta 133p53$ , una variante de p53, estimula la angiogénesis

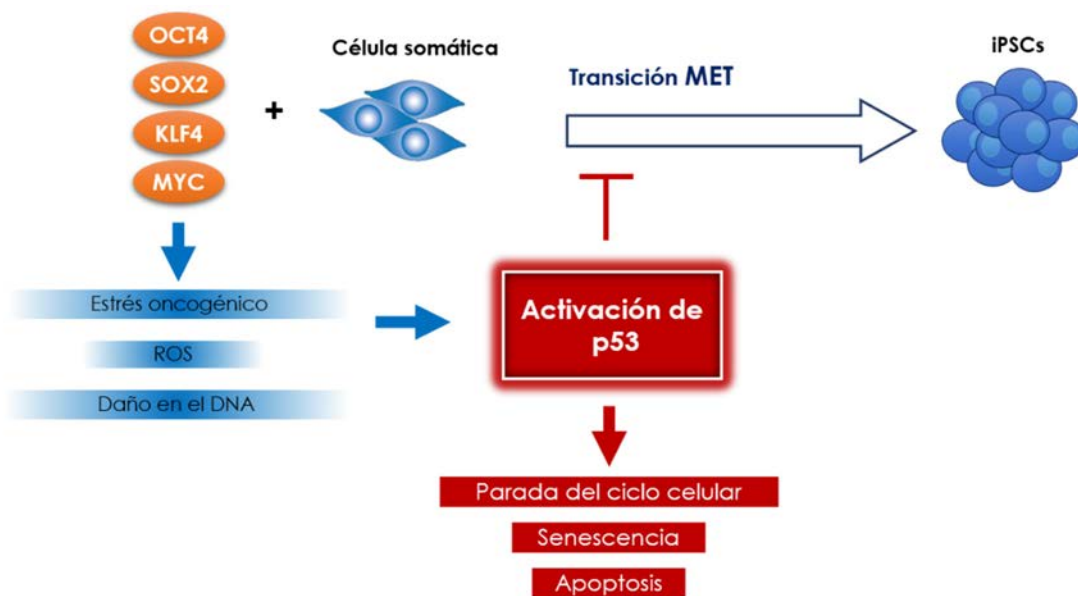
(Bernard *et al.*, 2013). Por el contrario, la función de p73 en angiogénesis tumoral es mucho menos conocida que la de p53; sólo algunas publicaciones atribuyen una función a p73 en la regulación de VEGF, y lo hacen de manera contradictoria. Por un lado, Salimath y colaboradores proponen que p73 es un regulador negativo de VEGF mediante interacción con SP1, en ausencia de p53 (Salimath *et al.*, 2000), mientras que, por otro lado, otras publicaciones describen a p73 como un factor pro-angiogénico. En células humanas de carcinoma ovárico con p53 funcional, la sobreexpresión de p73 induce la expresión de VEGF (Vikhanskaya *et al.*, 2001), además de la producción de otros factores angiogénicos como PIGF (*placental growth factor*), FGF-2 y PDGF-B (*platelet-derived growth factor*), al mismo tiempo que reduce la expresión de TSP-1 (*thrombospondin-1*). En este sentido, Guan y colaboradores demostraron una correlación entre p73 y el estado de vascularización en tumores colorrectales, sugiriendo que p73 está implicado en angiogénesis tumoral mediante la regulación de factores angiogénicos (Guan *et al.*, 2003). Por tanto, parece que los miembros de la familia de p53 tienen un papel importante en la angiogénesis tumoral, aunque los mecanismos moleculares que subyacen no se conocen.

Recientemente, con el fin de identificar proteínas relacionadas con la angiogénesis, y utilizando herramientas bioinformáticas, se generó el "Angioma" (Rivera *et al.*, 2011), una red constituida por el conjunto de proteínas actualmente identificadas o matemáticamente asociadas con la angiogénesis. Curiosamente, tanto p63 como p73 se encuentran incluidas en dicha red, y como manifiesta el "Angioma", la angiogénesis es un proceso en cuya regulación convergen numerosas vías moleculares. Por ello, los reguladores descritos en estas vías pueden ser reguladores potenciales de la angiogénesis. Por tanto, uno de los objetivos de este proyecto será evaluar la función de p73 en la angiogénesis.

## **6. LA FAMILIA DE p53 EN REPROGRAMACIÓN CELULAR**

La relación existente entre p53 y la reprogramación celular ha sido propuesta por diferentes grupos de investigación que sostienen que los mecanismos de supresión tumoral, como la parada del ciclo celular, inducción de senescencia o apoptosis, pueden funcionar como barreras para restringir el proceso de reprogramación celular, limitando así la pluripotencia (Brosh *et al.*, 2013; Hong *et al.*, 2009; Kawamura *et al.*, 2009; Marion *et al.*, 2009; Utikal *et al.*, 2009b; Zhao *et al.*, 2008).

Inicialmente se demostró que la falta de p53 incrementa la cinética y eficiencia del proceso de reprogramación debido a un aumento de la tasa de proliferación celular (Hanna), identificándose que p53 bloquea la reprogramación de células que presentan daño en el DNA mediante la activación de la senescencia y apoptosis (Marion *et al.*, 2009; Takahashi *et al.*, 2007; Takahashi and Yamanaka, 2006; Zhao *et al.*, 2008). Más recientemente, se demostró que p53 puede bloquear la transición MET mediante la inhibición de la activación de los genes epiteliales dependientes de KLF4 (Brosh *et al.*, 2013). En su conjunto, estas investigaciones no solo revelaron que p53 actúa como barrera en el proceso de reprogramación celular, sino que también se demostró la conexión existente entre la reprogramación celular y la tumorigénesis (Tapia and Schöler, 2010). Teniendo en cuenta que p53 bloquea ambos procesos, estudiar los mecanismos de regulación del proceso de reprogramación celular puede proporcionar un nuevo conocimiento en la biología del cáncer.



**Figura 19. Mecanismos de regulación del proceso de reprogramación celular mediados por p53.** La activación de p53 bloquea el proceso de reprogramación mediante la inducción de la parada del ciclo celular, senescencia y apoptosis. Paralelamente impide la transición mesénquima-epitelio durante el inicio del proceso de reprogramación.

## **6.1 MECANISMOS DE REGULACIÓN DEL PROCESO DE REPROGRAMACIÓN POR LA FAMILIA DE P53**

### **A) CONTROL DEL CICLO CELULAR**

La proliferación celular es crucial en el proceso de reprogramación, ya que durante las primeras etapas del proceso se requieren divisiones celulares rápidas para alcanzar la reprogramación de forma eficiente (Hong *et al.*, 2009; Marion *et al.*, 2009; Utikal *et al.*, 2009b). Sin embargo, una de las principales barreras a superar en la fase de iniciación es la activación de la parada del ciclo celular mediada por p53.

La sobreexpresión de los factores de reprogramación en las células somáticas induce la expresión endógena de c-MYC en la fase de iniciación del proceso (Nakagawa *et al.*, 2008). Este oncogén es capaz de acelerar la cinética de reprogramación, ya sea aumentando la tasa de proliferación celular o suprimiendo la senescencia (Hong *et al.*, 2009; Nakagawa *et al.*, 2008; Wernig *et al.*, 2008). Sin embargo, como respuesta al oncogén, se induce la parada del ciclo celular mediada por la activación de la expresión de p53, reduciéndose así la eficiencia del proceso (Hong *et al.*, 2009; Nakagawa *et al.*, 2008; Utikal *et al.*, 2009b). No obstante, la parada del ciclo celular es transitoria, ya que la acción de p53 es contrarrestada por KLF4 en el cóctel de reprogramación. KLF4 inhibe p53, y como resultado disminuye la expresión de sus dianas transcripcionales, p21 y miR-34a, induciéndose así la expresión de Nanog (Abdelalim and Tooyama, 2014; Muchkaeva *et al.*, 2012).

Por tanto, la inhibición de la vía p53/p21/miR-34a incrementa la eficiencia de reprogramación mediante el aumento de la tasa de división celular, que resulta en una cinética acelerada en la formación de iPSCs, siendo indirectamente proporcional a la parada del ciclo celular y la apoptosis.

### **B) APOPTOSIS Y SENESCENCIA**

La apoptosis es otra de las barreras a superar durante el inicio del proceso de reprogramación. En respuesta a los factores de reprogramación se induce la expresión de factores pro-apoptóticos como PUMA (Li *et al.*, 2013) y BAX (Kawamura *et al.*, 2009), dianas transcripcionales de p53, que contribuyen a la baja eficiencia del proceso de reprogramación (Cheung *et al.*, 2012; Esteban *et al.*, 2012; Mahmoudi and Brunet, 2012).

El grupo de María Blasco demostró que la activación de la apoptosis, como respuesta a los factores de reprogramación, está mediada por p53. Describieron que p53 está involucrado en la regulación de la parada del ciclo celular y la apoptosis mediante la prevención de la propagación de células con DNA dañado, incluyendo aquellas células con disfunción telomerasa. Marion y colaboradores demostraron que un alto porcentaje de MEFs carentes de actividad telomerasa (*Terc -/-*) morían durante la reprogramación celular debido a la inducción de la apoptosis, en un proceso p53 dependiente (Marion *et al.*, 2009). De hecho, demostraron que disminuir la expresión de p53 o sobre-expresar el factor anti-apoptótico Bcl2 (antagonista de PUMA y Bax), suprimía la apoptosis en el inicio de la inducción de la reprogramación, permitiendo que las células con telómeros dañados o disfuncionales pudieran ser reprogramados (Marion *et al.*, 2009). Estos estudios indican que p53 limita la reprogramación mediante la inducción de la apoptosis.

Por otra parte, Zhao y colaboradores propusieron que los factores de reprogramación, como c-MYC, podían inducir senescencia y apoptosis mediante la activación de p53 (Zhao *et al.*, 2008), ya que podría ser un mecanismo por parte de las células para prevenir la posible transformación oncogénica (Spike and Wahl, 2011). De hecho, Banito y colaboradores demostraron que la activación de los cuatro factores de reprogramación OSKM, bien individual o conjuntamente, inducen senescencia (Banito *et al.*, 2009). Además, el locus *Ink4a/Arf*, que codifica para los supresores tumorales p16 y ARF, cuya principal función es prevenir la propagación de células senescentes, actúa como una barrera en el proceso de reprogramación celular (Li *et al.*, 2009a). Estas investigaciones también implicaron a p53 como regulador del proceso, ya que la primera función de ARF es activar p53 mediante la inhibición de su degradación mediada por Mdm2, una enzima desestabilizadora de p53 (Sherr, 2012).

### **C) TRANSICIÓN MESÉNQUIMA-EPITELIO**

La transición MET es un requisito necesario durante la reprogramación de fibroblastos (Li *et al.*, 2010; Samavarchi-Tehrani *et al.*, 2010). Recientemente, también se ha demostrado la existencia de una transición epitelio-mesénquima corta y transitoria, durante los primeros estadios de la reprogramación, que precede la transición MET; pero al contrario de lo esperado, esta EMT es beneficiosa para el proceso de reprogramación (Liu *et al.*, 2013b).



Por un lado, los miembros de la familia de p53 están implicados en la regulación de la migración celular y la EMT (Zaravinos, 2015). Estudios recientes posicionan a p53 como la conexión entre los estados de diferenciación epitelial y mesenquimal, revelando un papel fundamental en el control de la EMT (Shiota *et al.*, 2008). Se describió que, bajo condiciones de estrés, las células pancreáticas carentes de p53 pierden sus características epiteliales, pudiendo desarrollar EMT (Pinho *et al.*, 2011). También, se describió que es necesario la disminución de la expresión de p53 para la delaminación de la cresta neural, un proceso mediado por EMT (Rinon *et al.*, 2011). En este sentido, tanto p53, como TAp73, contribuyen a mantener un programa transcripcional que impide la EMT mediante la regulación de *Snail/Slug*, *Zeb* y *Twist* (Zhang *et al.*, 2012a). Mientras que, por el contrario,  $\Delta$ Np73 facilita EMT mediante la inducción de la expresión de *Slug*, acompañado de una reorganización del citoesqueleto, la pérdida de *E-cadherina* y la inducción de la expresión de *N-cadherina* y *vimentina* (Steder *et al.*, 2013). Además, p53 controla EMT mediante mecanismos adicionales, como la regulación de las proteínas de la matriz extracelular (Guo and Zheng, 2004; Muller *et al.*, 2011), proteasas extracelulares (Mukhopadhyay *et al.*, 2009) y microRNAs, especialmente miR-200, miR-192 y miR-143 (Quintavalle *et al.*, 2010).

Por otro lado, los miembros de la familia de p53 también pueden regular el proceso contrario, la transición MET. En el caso de p53, se describió que bloquea la transición MET en la fase de iniciación del proceso de reprogramación celular mediante la inhibición de la activación de los genes epiteliales dependientes de KLF4 (Brosh *et al.*, 2013). Esta barrera mediada por p53, puede ser superada por los factores de reprogramación, que son capaces de contrarrestar el bloqueo de la transición MET, impidiendo la transición EMT, mediante la inhibición de la vía de señalización de TGF $\beta$  (Li *et al.*, 2010; Maherli and Hochedlinger, 2009). En particular, SOX2 y OCT4 reprimen *Snail* (Li *et al.*, 2010), mientras que KLF4 induce el programa transcripcional epitelial mediante la inducción directa de la expresión de genes epiteliales como *E-cadherina* (Yori *et al.*, 2010).

Por el contrario, se publicó que p63 es un regulador positivo de la reprogramación celular, actuando a través de varios mecanismos. Se demostró que la pérdida de p63 resulta, por una parte, en la reducción de la expresión de genes relacionados con la transición MET y por otra, en la disminución de la expresión de genes relacionados con la pluripotencia (Alexandrova *et al.*, 2013). Por tanto, p63 es necesario para conseguir una máxima eficiencia durante el proceso, aunque no se necesita para la capacidad de reprogramación *per sé*, y no afecta la estabilidad ni la pluripotencia de las colonias

de iPSCs establecidas. En concreto,  $\Delta Np63$ , pero no TAp63, es la principal isoforma involucrada.

La función de p73 durante el proceso de reprogramación celular nunca ha sido descrita. Por ello, teniendo en cuenta que p73 puede tener funciones compartidas con p53 y p63, o funciones específicas propias, (Collavin *et al.*, 2010); en este trabajo de investigación nos planteamos estudiar si p73 puede desempeñar una función, bien sinérgica, o bien antagónica, con los miembros de la familia de p53, durante el proceso de reprogramación celular e identificar el/los mecanismos moleculares regulados por p73 durante el proceso.



# Objetivos



El proceso de reprogramación celular comparte muchas similitudes con el proceso de progresión tumoral. Es por ello que genes asociados con el cáncer, como *Myc* (Nakagawa *et al.*, 2008) o *Terc* (Marion *et al.*, 2009) han estado implicados en la reprogramación celular. Investigaciones recientes han demostrado que los supresores tumorales como *p53* (también conocido como *TP53* en humano y *Trp53* en ratón) (Hong *et al.*, 2009; Kawamura *et al.*, 2009; Marion *et al.*, 2009; Utikal *et al.*, 2009b), *p16<sup>INK4a</sup>* (Li *et al.*, 2009a) o *Rb* (Kareta *et al.*, 2015) actúan como barreras del proceso de reprogramación celular a través de los distintos mecanismos relacionados con su función supresora tumoral, como son la apoptosis, diferenciación o la inducción de la senescencia, limitando de esta manera la auto-renovación y pluripotencia, y manteniendo el estado diferenciado y la estabilidad genómica.

La familia de *p53* es considerada una red de señalización interconectada entre sí (Murray-Zmijewski *et al.*, 2006), en la que *p63* y *p73* tienen muchas funciones compartidas con *p53*, pudiendo actuar de forma sinérgica, aunque también pueden tener funciones específicas propias y, en ocasiones, antagónicas (Collavin *et al.*, 2010). A pesar de que la función de la proteína supresora tumoral *p53* ha sido descrita como una potente barrera del proceso de reprogramación celular, la función de su homólogo *p73* nunca ha sido descrita.

Nuestra hipótesis de trabajo es que *p73* puede tener una función en la regulación del proceso de reprogramación celular. Por tanto, el **objetivo general** de este proyecto de Tesis Doctoral es evaluar la función del gen *Trp73* durante el proceso de reprogramación celular, en presencia o ausencia del gen *Trp53*, e identificar los mecanismos moleculares regulados por el gen *Trp73* durante el proceso de reprogramación celular.

Los objetivos específicos de este trabajo son:

1. Analizar el papel del gen *Trp73*, y su relación funcional con el gen *Trp53*, en el proceso de reprogramación celular y en el mantenimiento de la auto-renovación y la pluripotencia.
2. Identificar los mecanismos moleculares regulados por el gen *Trp73* durante el proceso de reprogramación celular.
3. Estudiar la función del gen *Trp73* en la generación de células de estirpe mesodérmica a partir de líneas celulares pluripotentes inducidas (iPSCs).



# **Materiales y Métodos**





## 1. TRABAJO CON ANIMALES

### 1.1 CEPAS Y CRUCES DE RATONES

Todas las manipulaciones y procedimientos experimentales con animales fueron llevados a cabo siguiendo la legislación vigente europea (Directiva 2010/63/UE) y nacional (RD 53/2013) sobre la utilización de animales con fines científicos. Se utilizaron ratones de genotipo silvestre (WT, *Wild-type*), ratones carentes del gen *Trp53* (p53KO; *Trp53*<sup>-/-</sup>), ratones carentes del gen *Trp73* (p73KO; *Trp73*<sup>-/-</sup>) y ratones carentes de ambos genes o dobles mutantes (DKO; *Trp53*<sup>-/-</sup>; *Trp73*<sup>-/-</sup>). Los ratones p53KO son de la cepa C57BL/6, mientras que los ratones WT, p73KO y DKO presentan un fondo genético mixto C57BL/6\_129/svJae.

Los ratones *Trp73*<sup>-/-</sup> no suelen alcanzar la madurez sexual (Yang *et al.*, 2000); por ello, para obtener los ratones p73KO se cruzaron ratones heterocigotos *Trp73*<sup>+/-</sup>. En el caso de los ratones p53KO (Donehower *et al.*, 1992), puesto que las hembras homocigotas *Trp53*<sup>-/-</sup> frecuentemente presentan problemas de fertilidad, los ratones p53KO se obtuvieron mediante cruzamiento de machos *Trp53*<sup>-/-</sup> con hembras homocigotas *Trp53*<sup>-/-</sup> o heterocigotas *Trp53*<sup>+/-</sup>. Finalmente, para generar los ratones mutantes DKO, los animales heterocigotos *Trp73*<sup>+/-</sup> se cruzaron, inicialmente, con ratones p53KO obteniendo ratones doble heterocigotos *Trp73*<sup>+/-</sup>; *Trp53*<sup>+/-</sup> que, posteriormente, se utilizaron para generar los animales DKO (*Trp73*<sup>-/-</sup>; *Trp53*<sup>-/-</sup>).

Los ratones se mantuvieron en condiciones de luz artificial (12:12 h), temperatura controlada (22 ± 2 °C), humedad relativa de 55 ± 10 % y ciclos de renovación de aire de 15 veces por hora, en jaulas tipo III de policarbonato con cama de viruta de madera, agua y comida *ad libitum*.

### 1.2 GENOTIPADO DE LOS RATONES

El DNA genómico para el genotipado se aisló de un pequeño fragmento de la porción distal de la cola (≈2 mm), en el caso de ratones de más de 21 días, o de la cabeza, en el caso de los embriones. La extracción se realizó siguiendo el protocolo de Laird (Laird *et al.*, 1991) con algunas modificaciones. El tejido se homogeneizó en tampón de lisis [100 mM de Tri-(hidroximetil)aminometano pH 8,5 (Tris, Merk#33621.260); 200 mM NaCl (Merk#27800.360); 5 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, SIGMA#E5134) pH 8,0; 0,2 % de dodecilsulfato sódico (SDS, SIGMA#L3771); 150 µg/mL proteinasa K (SIGMA#P2308)] y se incubó durante toda la noche a 65 °C. Pasado este tiempo, el lisado se centrifugó a 14000 revoluciones por minuto (rpm) y se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio. El DNA se precipitó añadiendo un volumen de

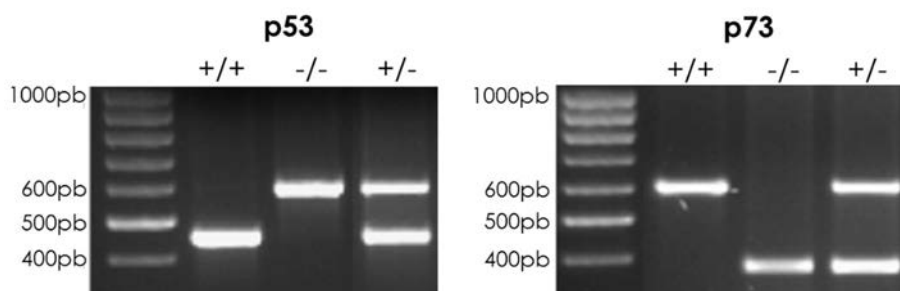
isopropanol y centrifugando a 14000 rpm durante 5 min. A continuación, se resuspendió en tampón TE [Tris-EDTA: 10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA pH 8,0] y se determinó la concentración de DNA utilizando un espectrofotómetro NANODROP™ ND, 1000 (THERMO FISHER SCIENTIFIC).

El genotipo se determinó de acuerdo a protocolos previamente establecidos (Flores *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2000), mediante un análisis por PCR. La mezcla de PCR se preparó en un volumen final de 20 µL incluyendo 500 ng DNA, 0,25 mM dNTPs, (BIOTOOLS#20037), 0,4 µM de cada cebador o *primer* específico (Tabla 5) y 1 U de DNA polimerasa (BIOTOOLS#10222). La reacción de PCR se realizó en un termociclador *Gene Amp®PCR System 2700* (APPLIED BIOSYSTEMS) en las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 min, seguida de 30 ciclos (desnaturalización a 94 °C durante 1 min, anillamiento a 60 °C durante 1,5 min y elongación a 72 °C durante 2 min) y elongación final a 72 °C durante 5 min.

Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa (PROMOCEL#8017) al 1,8 % en tampón Tris-acético-EDTA [TAE: 40 mM TrisBase; 1 mM EDTA y 0,1 % ácido acético glacial (Merk 1.00063)], utilizando *SimplySafe™* (EURX#E4600) diluido 1:20000 para visualizar el DNA, y un marcador de 100 pares de bases (pb) (EURX#E3141) como estándar de tamaño. Los geles fueron visualizados en un transiluminador de ultravioleta acoplado a un sistema de documentación y análisis de geles (*ChemIDoc™ & GelDoc™ imaging XR System*, BIO-RAD). El genotipo de cada animal fue determinado en función del tamaño de los productos de PCR (Figura 20).

**Tabla 5. Secuencias de *primers* para el genotipado de *Trp53* y *Trp73*.**

Nombre del <i>primer</i> - Orientación	Secuencia (5'→3')
<b>p53 g1 (p53X6.5) - Sentido</b>	ACA GCG TGG TGG TAC CTT AT
<b>p53 g2 (p53X7) - Antisentido</b>	TAT ACT CAG AGC CGG CCT
<b>p53 gNeo (Neo 18.5) - Antisentido</b>	TCC TCG TGC TTT ACG GTA TC
<b>p73 g1 (I1) - Sentido en exón 5 de <i>Trp73</i></b>	GGG CCA TGC CTG TCT ACA AAG AA
<b>p73 g2 (I2) - Antisentido en exón 6 de <i>Trp73</i></b>	CCT TCT ACA CGG ATG AGG TG
<b>p73 g3 (I3) - Sentido en pGK Neo</b>	GAA AGC GAA GGA GCA AAG CTG



**Figura 20. Ejemplo de genotipado de ratones *Trp53* y *Trp73*.** Electroforesis en gel de agarosa (1,8 %) de los productos de PCR característicos en el caso de ratones p53WT (450 pb), p53KO (625 pb), p73WT (600 pb) y p73KO (375 pb).

## 2. TRABAJO CON LÍNEAS CELULARES

Todas las manipulaciones de los cultivos celulares se llevaron a cabo en condiciones de asepsia, en una cabina de seguridad biológica de flujo laminar vertical (TELSTAR CYTOSTAR). Las células se mantuvieron en un incubador HEPA Class100 (THERMO FISHER SCIENTIFIC) con atmósfera húmeda, a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>. El estado de los cultivos se comprobó diariamente utilizando un microscopio invertido de contraste de fases (LEICA DMI3000 B).

### 2.1 FIBROBLASTOS EMBRIONARIOS DE RATÓN (MEFs)

Los cultivos primarios de fibroblastos embrionarios de ratón se derivaron a partir de embriones E13,5. En este proyecto de Tesis se establecieron líneas de MEFs WT, p73KO, p53KO y DKO. Por otra parte, se utilizaron MEFs WT para la obtención de los denominados *feeders* o fibroblastos inactivados mitóticamente que sirven como soporte y sustento de las células troncales embrionarias en cultivo.

#### 2.1.1 AISLAMIENTO Y CONDICIONES DE CULTIVO DE MEFs

Para la obtención de cultivos primarios de MEFs, se sacrificaron hembras gestantes (13,5 días *post coito*) mediante dislocación cervical y se procedió a extraer los embriones en una cabina de flujo laminar vertical, con material quirúrgico estéril. Los embriones se lavaron para eliminar los restos de sangre con tampón fosfato salino 0,1M [PBS: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,4], suplementado con una solución comercial antibiótica-antimitótica: 100 U/mL penicilina, 0,1 mg/mL estreptomicina y 0,25 µg/mL de anfotericina B (SIGMA#A5955). Una vez retirada la cabeza (para genotipar el embrión) y los órganos internos "rojos", el tejido restante se disgregó en fragmentos pequeños con un bisturí y se transfirió a una placa *Petri* de 6 cm. A continuación, se incubó el tejido en 1 mL de Tripsina-EDTA (SIGMA#T3924) durante 30 min a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub>. Transcurrido este tiempo, la muestra se pipeteó varias veces para conseguir una suspensión de células independientes y se añadió medio completo (4mL) para inactivar la tripsina.

Finalmente, la suspensión celular homogénea se sembró en un frasco de cultivo celular con medio de MEF (Tabla 6) y se cultivó a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub>. Al día siguiente, se cambió el medio para eliminar las células muertas y restos de tejido. Los cultivos se expandieron y se congelaron en pase 2, utilizando como medio de congelación FBS con 10 % dimetilsulfóxido (DMSO, SIGMA#2650). En total se establecieron seis líneas primarias

de MEFs WT (E27, E34, E49, E60, E118, E127), tres de MEFs p73KO (E61, E62, E64), seis de MEFs p53KO (E11, E12, E14, E21, E126, E133) y tres de MEFs DKO (E84, E134, E136).

**Tabla 6. Medio de cultivo de MEF.**

Componente (concentración final)	Número de catálogo
<b>DMEM</b> ( <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> )	SIGMA#D5671
<b>10 % FBS</b>	SIGMA#F7524
<b>2 mM L-Glutamina</b>	GIBCO#2503
<b>100 U/mL penicilina-0,1 mg/mL Estreptomina</b>	SIGMA#P4333

### 2.1.2 CURVA DE CRECIMIENTO DIARIA Y ACUMULATIVA

Con todos los MEFs generados se realizaron curvas de crecimiento diarias y curvas acumulativas. Se llevaron a cabo dos experimentos independientes, cada uno por triplicado. El recuento del número de células se llevó a cabo utilizando una cámara de Neubauer y la viabilidad celular se determinó mediante la exclusión celular del colorante azul tripán (SIGMA#T8154).

En estos experimentos, se partió de MEFs en un pase temprano (pase 4-5). Para la curva de crecimiento diaria se sembraron  $1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> y las células viables se contaron a las 24, 48, 72 y 96 horas. Para la curva de crecimiento acumulativa, se sembraron  $2 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> y las células viables se contaron y subcultivaron a la densidad de siembra especificada cada tres días, durante 6-7 pases.

El número de duplicaciones de la población o PDs se calculó entre dos puntos de tiempo de la fase exponencial de la curva de crecimiento mediante la fórmula:

$$PD = \log_{10}(n_1/n_0) \times 1/\log_{10} 2$$

Donde  $n_1$  y  $n_0$  son el número de células totales en los puntos de tiempo inicial ( $n_0$ ) y final ( $n_1$ ) considerados.

### 2.1.3 INACTIVACIÓN DE MEFs PARA GENERAR FEEDERS

Los MEFs WT fueron cultivados hasta pase 3-4 y los cultivos confluentes se inactivaron mitóticamente con 10 µg/mL de mitomicina C (SIGMA#M4287) durante 2 horas a 37°C. Posteriormente, se realizaron al menos tres lavados con PBS, y se congelaron  $1,4 \times 10^6$  feeders/mL en FBS y 10 % DMSO.

Como rutina de trabajo, los feeders se sembraron a una densidad de  $2 \times 10^4$  feeders/cm<sup>2</sup>, en medio de MEFs y placas recubiertas con 0,1 % de gelatina durante 20 min a 37 °C (SIGMA#G2500). Los feeders no se utilizaron hasta pasadas, al menos 12 horas desde su siembra.

## 2.2 CÉLULAS P19

Las células P19 son células pluripotentes de teratocarcinoma testicular embrionario de ratón (McBurney and Rogers, 1982). Estas células fueron amablemente proporcionadas por la Dra. Han Li (Grupo del Dr. Manuel Serrano, Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, Madrid, España). Para el cultivo de rutina de las células P19 se utilizó el medio completo indicado en la Tabla 7 y el sub-cultivo se realizó cada dos días, empleando tripsina-EDTA.

Tabla 7. Medio de cultivo de células P19.

Componente (concentración final)	Número de catálogo
DMEM	SIGMA#D5671
10 % FBS	SIGMA#F7524
2 mM L-Glutamina	Gibco#2503

### 2.2.1 TRATAMIENTO CON BMP4

Las células P19 presentan elevados niveles de expresión de SMAD6 en respuesta a BMPs (Ishida *et al.*, 2000; McBurney, 1993). En los experimentos con BMP, se sembraron 16250 células/cm<sup>2</sup> en medio completo. Al día siguiente, se realizó un lavado con PBS y las células se mantuvieron en medio con 0,2 % de FBS (condiciones de bajo suero) durante 24 horas. Transcurrido ese tiempo, las células se trataron con 0,5, 5, 10, 20 y 80 ng/mL de BMP4 humano (PEPROTECH#120-05).

## 2.3 CÉLULAS H1299

La línea celular H1299 proviene de células humanas tumorales de pulmón carentes de expresión endógena del gen *TP53*, constituyendo por tanto un buen modelo celular para el estudio de dianas transcripcionales de *TP73* (Chen *et al.*, 1996). En estas células la vía de señalización de BMP activa de forma basal y son capaces de producir y secretar al medio BMP2 y BMP4 (Langenfeld *et al.*, 2013).

Junto con las células parentales, se utilizaron las líneas celulares inducibles H1299 HA-TAp73 $\beta$  clon 22 y H1299 HA- $\Delta$ Np73 $\beta$  clon 15. Estas células fueron generadas por el grupo del Dr. Xinbin Chen a partir de células H1299 parentales en las que se introdujo de manera estable un sistema inducible Tet-OFF, que regula la expresión de TAp73 $\beta$  y  $\Delta$ Np73 $\beta$  (Liu *et al.*, 2004b). Estas células fueron amablemente proporcionadas por el Dr. Xinbin Chen (*Center for Comparative Oncology*, Universidad de California, Estados Unidos).

La composición del medio de cultivo de las células H1299 parentales figura en la Tabla 8. En el caso de las células H1299 inducibles, este medio se suplementó con 2

µg/mL tetraciclina (SIGMA#T7660), 250 µg/mL geneticina (G418, GIBCO#11811) y 1 µg/mL puromicina (SIGMA#P8833). Para la inducción de la expresión de TAp73β y ΔNp73β, se retiró la tetraciclina del medio de cultivo y se realizaron varios lavados con DMEM. A partir de ese momento las células se mantuvieron en medio completo sin tetraciclina. La expresión de la proteína se detectó en las siguientes 24-48 horas.

**Tabla 8. Medio de cultivo de células H1299.**

Componente (concentración final)	Número de catálogo
<b>DMEM</b>	SIGMA#D5671
<b>10 % FBS</b>	SIGMA#F7524
<b>2 mM L-Glutamina</b>	GIBCO#2503
<b>2 µg/mL tetraciclina</b>	SIGMA#T7660
<b>250 µg/mL G418</b>	GIBCO#11811
<b>1 µg/mL puromicina</b>	SIGMA#P8833

## 2.4 CÉLULAS TRONCALES PLURIPOTENTES INDUCIDAS (iPSCs) MURINAS

Las iPSCs de ratón generadas en el transcurso de este proyecto de Tesis se cultivaron sobre *feeders*, en presencia de LIF en el medio de cultivo (Tabla 9). Para el cultivo de rutina, el medio se cambió cada día y las células se subcultivaron cada segundo día, reemplazando el medio una hora antes del proceso. Para el subcultivo, las células se incubaron con tripsina-ácido etilenglicoltetraacético (EGTA), (ver composición en la Tabla 10) durante aproximadamente 3 min a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub>. Tras comprobar al microscopio de contraste de fases que las colonias comenzaban a disociarse, se inactivó la proteasa mediante la adición de medio de cultivo completo, y las colonias se disgregaron con la pipeta hasta conseguir una suspensión de células independientes. La suspensión celular se recogió en un tubo de 15 mL y se centrifugó a 1000 rpm durante 5 min. Finalmente, las células se resuspendieron en medio completo de iPSC y se sembraron sobre *feeders*, a la concentración adecuada para cada experimento.

**Tabla 9. Medio de cultivo de iPSC.**

Componente (concentración final)	Número de catálogo
<b>DMEM</b>	SIGMA#D5671
<b>15 % FBS</b>	SIGMA#F7524
<b>2 mM L-Glutamina</b>	GIBCO#2503
<b>1 mM aminoácidos no esenciales (NEAAs)</b>	GIBCO#11140
<b>1 mM piruvato sódico</b>	GIBCO#11360
<b>0,1 mM β-mercaptoetanol</b>	GIBCO#31350
<b>1000 U/ml ESGRO/LIF</b>	Chemicon#ESG1107

**Tabla 10. Composición de la Tripsina-EGTA.**

Componente (para 500 ml)	Número de catálogo
<b>3,15 g NaCl</b>	Merck #1.06404.1000
<b>0,06 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	Merk#106586
<b>0,108 g KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub></b>	Merk#104873
<b>0,166 g KCl</b>	Merck#4936.0500
<b>0,45 g D-Glu</b>	SIGMA#G7021
<b>1,35 g Trizma base</b>	SIGMA#T6066
<b>0,45 mL Rojo fenol (stock 1 %)</b>	SIGMA#P0290
<b>50 ml Trypsina 2,5 % 10X</b>	Life technologies#15090-046
<b>0,2 g EGTA</b>	SIGMA#E3889
<b>0,05 g Polivinil alcohol</b>	SIGMA#P8136

### 2.4.1 CURVA DE CRECIMIENTO DIARIA Y ACUMULATIVA

Los procedimientos de realización de las curvas de crecimiento fueron los mismos que los indicados en el apartado 3.1.2 para los MEFs, con la salvedad de que se sembraron  $5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> (pase 20) sobre *feeders*. Se llevaron a cabo dos experimentos independientes, por triplicado, utilizando al menos tres clones por genotipo.

### 2.5 CÉLULAS HM-1

La línea HM-1 es una línea de ESCs murinas, derivada de la línea E14Tg2a (Hooper *et al.*, 1987), ambas deficientes en el gen de la hipoxantina fosforribosiltransferasa (*Hprt*) y con fondo genético 129 (Magin *et al.*, 1992). Las células HM-1-GFP utilizadas en este trabajo expresan, de manera constitutiva, el gen indicador de la proteína verde fluorescente (GFP, *Green Fluorescent Protein*), dirigido por el promotor humano del factor de elongación EF1 $\alpha$ . Esta línea estable fue establecida por la Dra. Marta Fernández Baro (Universidad de León, 2012).

Las células se cultivaron en medio de ESCs (Tabla 11), sobre placas gelatinizadas, a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>. El medio de cultivo se cambió diariamente y las células se sub-cultivaron cada dos días utilizando tripsina-EGTA. Para el experimento de co-cultivo de células HM-1 con iPSCs, las células se mantuvieron en medio de iPSC (Tabla 9).

**Tabla 11. Medio de cultivo de células HM-1 (ESCs).**

Componente (concentración final)	Número de catálogo
<b>Glasgow minimal essential medium (GMEM)</b>	SIGMA#G5154
<b>10 % FBS</b>	SIGMA#F7524
<b>2 mM L-Glutamina</b>	GIBCO#2503
<b>1 mM NEAAs</b>	GIBCO#11140
<b>1 mM piruvato sódico</b>	GIBCO#11360
<b>0,1 mM <math>\beta</math>-mercaptoetanol</b>	GIBCO#31350
<b>500 U/ml ESGRO/LIF</b>	Chemicon#ESG1107
<b>200 <math>\mu</math>g/mL de sulfato de genetecina (G-418)</b>	GIBCO#11811



## 2.6 TRANSFECCIÓN CON VECTORES DE EXPRESIÓN

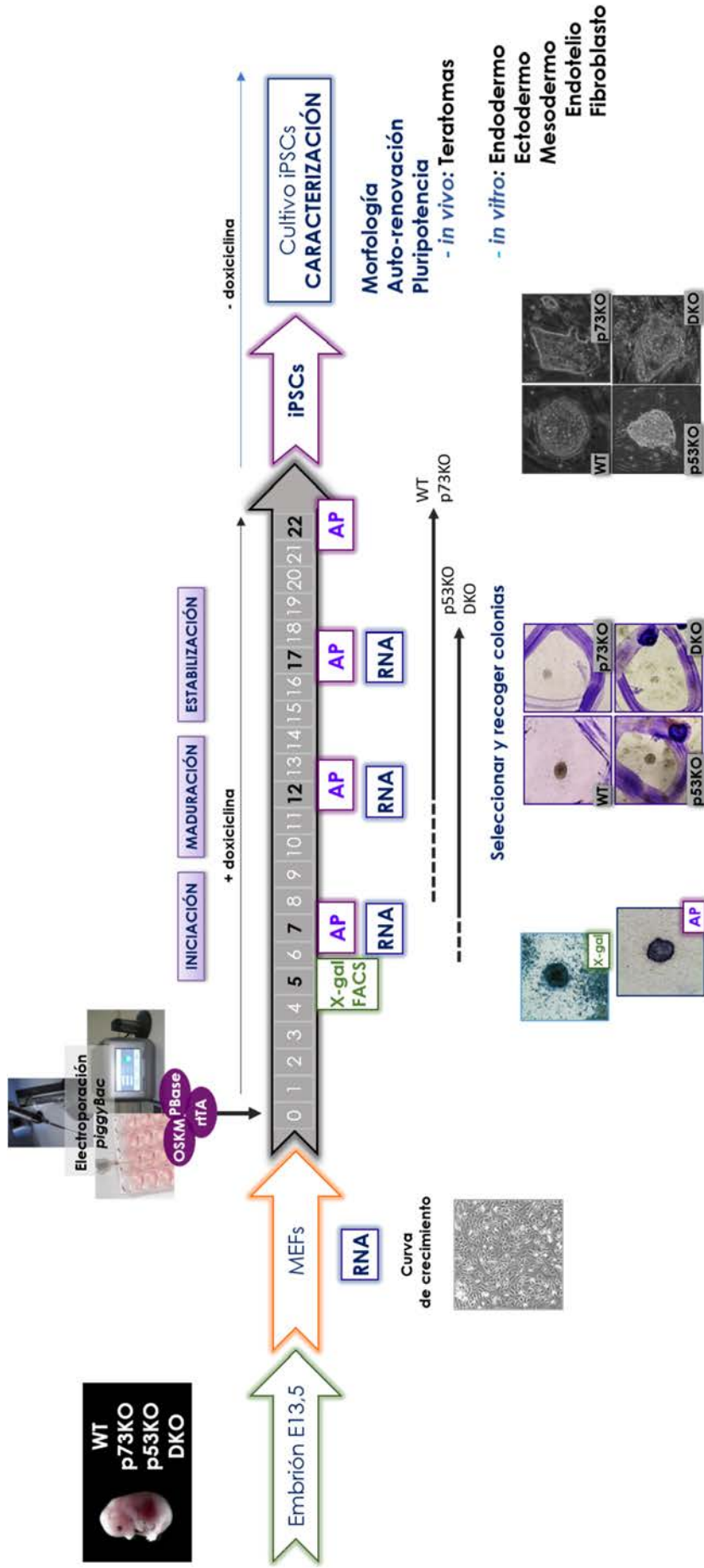
Las células se lipofectaron en medio libre de suero (OptiMEM®, GIBCO#31985-070) utilizando el reactivo Lipofectamina™2000 (INVITROGEN#11668). Se sembraron 16250 células/cm<sup>2</sup> en medio completo y, al día siguiente, se transfectaron siguiendo las instrucciones del fabricante. El DNA y la lipofectamina, en un ratio 1:2,5, se diluyeron en volúmenes iguales de OptiMEM® y cada tubo se incubó durante 5 min a RT. A continuación, el DNA se mezcló con el reactivo de transfección y se incubó durante 20 min a RT permitiendo la formación de los complejos DNA-lipofectamina. Finalmente, el medio de cultivo fue reemplazado por OptiMEM® y se añadieron los complejos, gota a gota, sobre las células. Tras 5 horas de incubación, el medio de transfección se reemplazó por medio completo.

En los experimentos con BMP, las células fueron transfectadas con los vectores de expresión constitutiva pcDNA3·CMV-HA-TAp73a, pcDNA3·CMV-HA-ΔNp73a y el correspondiente vector vacío, pcDNA3, descritos previamente por (Fernandez-Garcia *et al.*, 2006). Para activar la vía de señalización de BMP, a las 18 horas post-transfección, las células se lavaron con PBS y se sustituyó el medio completo por medio bajo en suero (0,2 % FBS). Transcurridas 24 horas en condiciones de bajo suero, las células se trataron con 5 ng/mL de BMP4 humano. La extracción de RNA o proteína para posteriores análisis se llevó a cabo a las 12, 18 y 24 horas tras el tratamiento con BMP4.

## 3. GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS REPROGRAMADAS

### 3.1 PROCESO DE REPROGRAMACIÓN CELULAR

Se reprogramaron fibroblastos embrionarios murinos mediante la expresión de los factores de reprogramación de Yamanaka, utilizando los cuatro factores, OSKM (OCT4, SOX2, KLF4, MYC), o bien tres factores, OSK (OCT4, SOX2, KLF4). Para la expresión de los factores se utilizó el sistema de transposición *piggyBac*, asociado a un sistema Tet-ON inducible por doxiciclina (Woltjen *et al.*, 2009), amablemente cedido por la Dra. Riikka Hämäläinen (*Biomedicum Stem Cell Centre*, Helsinki, Finlandia). Se realizaron dos experimentos de reprogramación independientes, por duplicado para cada línea de MEFs. Estos experimentos se llevaron a cabo durante una estancia de 6 meses en el grupo de investigación del Dr. Timo Otonkoski (*Biomedicum Stem Cell Centre*, Helsinki, Finlandia). El diseño experimental llevado a cabo se muestra en la Figura 21.



**Figura 21. Diseño experimental del proceso de reprogramación.** A partir de embriones de 13,5 días post coito WT, p73KO, p53KO y DKO se generaron MEFs. Los MEFs E13,5 en fase 4 fueron electroporados con el transposón PB-ITR-TetO-OSKM-IRES-βgeo-ITR, junto con vectores de expresión para la transposasa, el transactivador reverso rTA y PB-ITR-TetO-GFP-IRES-βgeo-ITR (Knut Wolffjen 2009). Tras 24 horas, fueron tratados con doxiciclina durante 22 días para inducir el transgén. A día 5 de la reprogramación se determinó la eficiencia de la electroporación midiendo el porcentaje de células que expresaban GFP, mediante citometría de flujo, y determinando la actividad β-galactosidasa. La eficiencia de reprogramación se analizó cuantificando el número de células con actividad fosfatasa alcalina a distintos tiempos durante el proceso de reprogramación (día 7, 12, 17 y día 22). También se recogió RNA de los MEFs (día 0, T0) y a día 7 (T7: iniciación), 12 (T12: maduración) y 17 (T17: estabilización) desde la inducción con doxiciclina para análisis mediante qRT-PCR. Cuando comenzaron a aparecer las colonias (líneas negras discontinuas), estas se aislaron (líneas negras continuas) y cultivaron en ausencia de doxiciclina. Los clones de iPSCs generados se caracterizaron para demostrar que eran auténticas células iPSCs, mediante análisis de morfología, auto-renovación y pluripotencia.

El sistema de transposición *piggyBac* requiere del empleo de tres vectores (Figura 22):

- ✓ **PB-ITR-TetO-OSKM-IRES-βgeo-ITR**: vector que incluye las secuencias terminales repetidas e invertidas (ITRs) del transposón, flanqueando las secuencias que codifican para los factores de reprogramación **OSKM (o OSK)**. Este plásmido también contiene las secuencias **βgeo**, correspondientes a la fusión *lacZ-neo* que codifican, respectivamente, para las enzimas β-galactosidasa y neomicina fosfotransferasa. La expresión de OSKM y de βgeo está bajo el control transcripcional del elemento de respuesta **TetO**.
- ✓ **PB-ITR-CAG-rTA-ITR**: vector que lleva clonada la secuencia que codifica para el transactivador reverso (**rTA**) del sistema Tet-ON inducible por tetraciclina. La expresión del elemento rTA está dirigida por el promotor de expresión constitutiva **CAG** (*chicken actin beta-globin*). rTA se expresa constitutivamente y, cuando las células son tratadas con doxiciclina (1,5 µg/ml), puede unirse al operador TetO y activa la expresión de MKOS y β-geo.
- ✓ **CAG-PBase**: vector de expresión de la transposasa, que reconoce los elementos ITR, escinde las secuencias contenidas entre ellos (TetO-mOSKM-IRES-βgeo o CAG-rTA) y las integra en el genoma en sitios específicos de 4 nucleótidos (TTAA). La expresión de la transposasa está dirigida por el promotor de expresión constitutiva **CAG**.

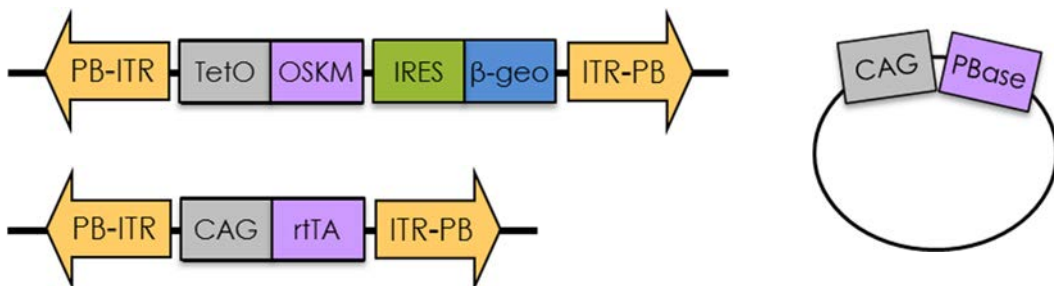


Figura 22. Vectores del sistema *piggyBac*.

Para la reprogramación se utilizaron las líneas generadas previamente de MEFs WT, p73KO, p53KO y DKO. Para cada línea, se electroporaron  $2 \times 10^5$  células (pase 4) con 1 µg del plásmido PB-ITR-TetO-OSKM-IRES-βgeo-ITR o PB-ITR-TetO-OSK-IRES-βgeo-ITR, junto con 0,5 µg de PB-ITR-CAG-rTA-ITR y 0,5 µg del vector de expresión de la transposasa. Para la electroporación se utilizó el sistema *Neon® Transfection System*, según las instrucciones del fabricante (LIFE TECHNOLOGIES#MPK5000). Las condiciones de electroporación fueron

un pulso de 1300 V y 30 ms. Como control, se utilizó un sistema *piggyBac* en el que se había clonado GFP en lugar de las secuencias OSKM (PB-ITR-TetO-GFP-IRES- $\beta$ geo-ITR).

Tras la electroporación, las células se sembraron en un pocillo de placa de 6 pocillos, previamente recubierto con 0,1 % de gelatina, con medio de MEFs sin antibióticos. Después de 24 horas, el medio de MEFs se sustituyó por medio completo de iPSC (Tabla 9) suplementado con 1,5  $\mu$ g/mL de doxiciclina (SIGMA#D9391) para inducir la expresión de los factores OSKM, OSK y GFP. El medio de cultivo se reemplazó cada dos días, manteniéndose el tratamiento con doxiciclina.

### **3.1.1 RECOGIDA DE COLONIAS DE iPSCs**

Las colonias se seleccionaron observando las placas con una lupa binocular (Modelo SMZ1000, NIKON) y se procedió a la recogida de las mismas trabajando en campana de flujo laminar vertical. Para ello, tras lavar las células con PBS, se realizaron cuatro cortes con un bisturí bordeando la colonia seleccionada, para levantarla y aspirarla con una pipeta en el menor volumen posible de PBS. Después, se transfirió la colonia a una placa de 96 pocillos y se incubó con 50  $\mu$ l de TrypLE (GIBCO#12563) durante al menos 5-8 min a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub>. A continuación, la colonia se disgregó mecánicamente y se sembró sobre una monocapa de *feeders* en una placa de 24 pocillos, con medio de iPSCs suplementado con doxiciclina 1,5  $\mu$ g/mL. El medio se cambió todos los días y cuando las colonias comenzaron a tener un tamaño adecuado se procedió a la expansión del cultivo en medio de iPSCs en ausencia de doxiciclina.

En total, se seleccionaron y aislaron 43 colonias WT (E34, E60, E118, E127), 26 colonias p73KO (E61, E62, E64), 23 colonias p53KO (E126, E133) y 58 colonias DKO (E84, E134, E136).

### **3.2 ENSAYOS DE ACTIVIDAD FOSFATASA ALCALINA (AP)**

La detección de la actividad fosfatasa alcalina, característica de las ESCs, se realizó de forma rutinaria los días 7, 12, 17 y 22 durante el proceso de reprogramación, así como en los clones iPSCs establecidos. Las células se fijaron con 4 % de paraformaldehído (PFA) durante 10 min a RT. Después de tres lavados de 5 min con PBS, se añadió la solución de tinción AP [(para 1 mL): 1 M Tris-HCl pH 9,5 (100  $\mu$ L); 5 M NaCl (20  $\mu$ L); 1 M MgCl<sub>2</sub> (50  $\mu$ L); reactivo NBT/BCIP (20  $\mu$ L) y 810  $\mu$ L de agua] y se incubó durante 15 min en oscuridad y RT. La reacción se paró con PBS y las placas se observaron al microscopio y se escanearon con un escáner EPSON *Perfection V370 Photo*. La eficiencia del proceso de reprogramación se determinó contando el número de colonias AP<sup>+</sup> (color azul/morado).

### **3.3 ENSAYOS DE ACTIVIDAD $\beta$ -GALACTOSIDASA**

La detección de la actividad  $\beta$ -galactosidasa, indicativa de la expresión de los transgenes OSKM, se evaluó en presencia y ausencia de doxiciclina. Las células se lavaron y fijaron con 4 % de PFA durante 30 min a RT. Después de tres lavados de 5 min con PBS, se añadió la solución de tinción  $\beta$ -gal [4 mM ferricianuro potásico,  $K_3Fe(CN)_6$  (SIGMA#P4066); 4 mM ferrocianuro potásico,  $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$  (SIGMA#P3289); 2 mM  $MgCl_2$  (Merck#1.05833) y 1mg/mL 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido (X-gal, Promega#V394A) en PBS] y se incubó a 37 °C durante toda la noche, protegiendo las placas de la deshidratación y en oscuridad. Al día siguiente, la reacción se detuvo con PBS y las placas se observaron al microscopio y se escanearon con un escáner EPSON Perfection V370 Photo. Las células  $\beta$ -gal<sup>+</sup> adquirieron coloración azul.

### **3.4 ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO**

El análisis del ciclo celular se realizó mediante tinción con ioduro de propidio (IP). Las células se tripsinizaron hasta conseguir una suspensión celular homogénea, y después de un lavado con PBS, se fijaron con etanol al 70 % en PBS durante 2 horas a 4 °C. Una vez fijadas, se realizaron al menos dos lavados con PBS y, finalmente, se procedió al marcaje con la solución de ioduro de propidio [0,3 M citrato sódico; 0,2 mg/mL RNasa A (Thermo Fisher#EN0531); 0,2 mg/mL IP (SIGMA#P4170) en PBS] durante 15 min a RT y oscuridad. El análisis de las muestras se realizó mediante citometría de flujo en un citómetro CyAn™ ADPy (BECKMAN COULTER) y los datos fueron analizados utilizando el programa Summit™ v4.3 (DAKO).

### **3.5 ENSAYOS DE PLURIPOTENCIA IN VITRO**

#### **3.5.1 DIFERENCIACIÓN A PARTIR DE CUERPOS EMBRIOIDES (EBs) FORMADOS MEDIANTE EL MÉTODO DE LA GOTA COLGANTE**

El análisis de la capacidad de pluripotencia *in vitro* de las iPSCs se realizó mediante la formación de cuerpos embrioides, por el método de la gota colgante (Doetschman *et al.*, 1985; Kurosawa, 2007; Wang and Yang, 2008), y su posterior diferenciación a tipos celulares de las tres capas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo).

Como paso previo, fue necesario eliminar los *feeders* del cultivo. Para ello, las células se tripsinizaron, se transfirieron a una placa recubierta con 0,1 % de gelatina y se cultivaron en medio de iPSC durante 30 min a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub>. Pasado este tiempo, se

recogió el sobrenadante y se realizó el recuento del número de células viables en una cámara de Neubauer, utilizando el método de exclusión celular con azul tripán.

Para formar los EBs (Figura 23), se preparó una suspensión celular de  $3 \times 10^4$  células/mL en medio iPSC sin LIF. Esta suspensión se sembró con una pipeta multicanal en gotas de 20  $\mu$ L (600 células) sobre la superficie interna de la tapa de una placa *Petri* bacteriológica no adherente de 10 cm, en la que se habían añadido 15 mL de PBS con 1,5% FBS, para contrarrestar la evaporación. Las gotas colgantes se incubaron a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub> durante 4 días en medio de iPSC sin LIF. Al cuarto día, los EBs se recogieron de la tapa con medio de cultivo de iPSC sin LIF y se transfirieron a una placa *Petri* bacteriológica de 10 cm donde crecieron en suspensión hasta el día 7. En ese momento se recogieron y se sembraron en placas gelatinizadas, cambiando cada dos días el medio hasta el día 15, momento en el que las células diferenciadas se fijaron con 3,7 % de PFA (SIGMA#P6148) durante 15 min a RT.

### **3.5.2 DIFERENCIACIÓN ENDOTELIAL EN TRES DIMENSIONES (3D)**

El protocolo de diferenciación endotelial fue adaptado a partir del método de diferenciación en tres dimensiones (3D) descrito por Li y colaboradores (Li *et al.*, 2008). La formación de los EBs se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en el apartado anterior, a excepción de que se preparó una suspensión celular de  $6 \times 10^4$  células/mL en medio de EBs 3D (Tabla 12) y que los EBs crecieron en suspensión durante 4 días.

Para la formación de los brotes vasculares, se recogieron los EBs formados en las gotas y se sembraron embebidos entre dos capas de colágeno I (Jakobsson *et al.*, 2006). Para preparar la matriz de colágeno [medio Ham F12; 6,26 mM NaOH; 12,5 mM de tampón 4-(2-hidroxietil)1-piperazina-etanosulfónico (HEPES); 0,073 % NaHCO<sub>3</sub>; 1 % Glutamax™ I y 1,5 mg/mL colágeno I], los reactivos se mezclaron en un tubo de 50 mL colocado en hielo, en el orden que se muestra en la Tabla 13. Posteriormente, se añadieron 600  $\mu$ L de la solución a cada pocillo de una placa de 12 pocillos, dejando polimerizar durante toda la noche a 37 °C.

Al día siguiente, sobre la primera capa de colágeno polimerizado, se sembraron unos 5-8 EBs por pocillo, en no más de una gota de 20  $\mu$ L de medio. Inmediatamente después, se añadieron 600  $\mu$ L de solución de colágeno recién preparada. Tras dejar polimerizar durante unas 4 horas a 37 °C, se añadieron 800  $\mu$ L de medio de EBs suplementado con 50 ng/mL de VEGF<sub>165</sub> humano (PEPROTECH#100-20). El medio suplementado con VEGF<sub>165</sub> se cambió cada dos días. A partir de 12 días, los EBs fueron fijados con 3,7 % de PFA durante 40 min y se procedió a su análisis mediante inmunofluorescencia.

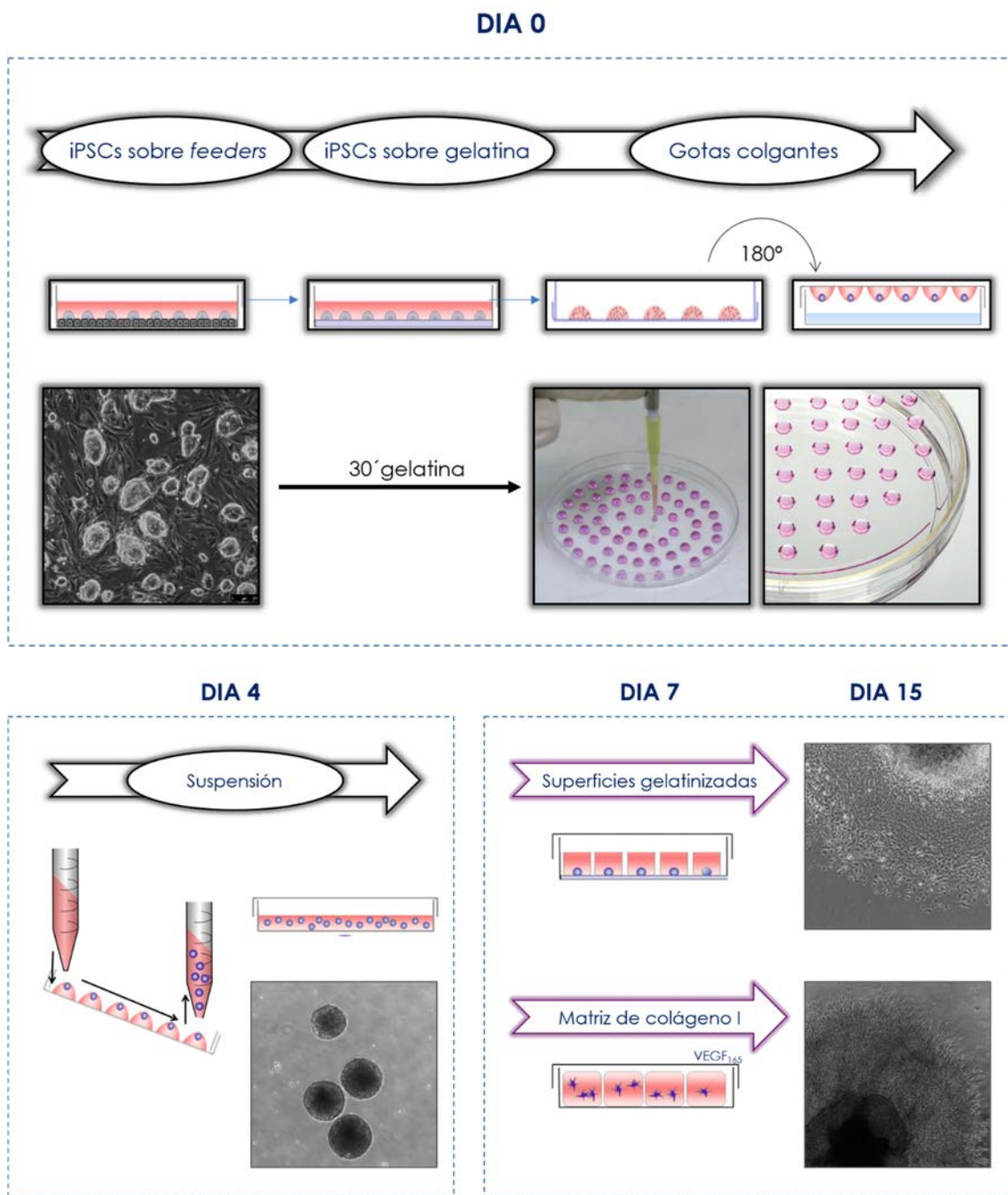


Figura 23. Proceso de diferenciación de las iPSCs mediante el cultivo de cuerpos embrioides (EBs) en gota colgante.

Tabla 12. Medio de cultivo de EB 3D.

Componente (concentración final)	Número de catálogo
81,3 % DMEM/Glutamax	GIBCO#61965-026
15 % FBS	SIGMA#F7524
25 mM tampón HEPES	GIBCO#15360-056
1,2 mM piruvato sódico	GIBCO#11360-039
19 mM monioglicerol 98 %	SIGMA#M6145

Tabla 13. Composición de la solución de colágeno I.

Reactivo (stock)	Volumen del stock	Número de catálogo
0,1 M NaOH	0,5 mL	Preparar
10X F12	0,5 mL	PromoCell#C96211
1 M tampón HEPES	100 µL	GIBCO#15360-056
7,5 % NaHCO <sub>3</sub>	78 µL	Preparar
Glutamax	50 µL	GIBCO#35050-038
1 X F12	2,772 mL	GIBCO#31765-027
3 mg/mL colágeno I	4 mL	Advances Biomatrix#5005-B

### 3.6 ENSAYOS DE PLURIPOTENCIA *IN VIVO*: FORMACIÓN DE TERATOMAS

El ensayo de formación de teratomas fue llevado a cabo en colaboración con el grupo del Dr. Pablo Menéndez Buján (Instituto de Investigación contra la Leucemia Josep Carreras, Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona). Los experimentos fueron aprobados por *The Institutional Animal Care and Use Committee* (IACUC) de la Universidad de Barcelona, y el protocolo de utilización de animales fue el número#170/13, autorizado por la Comisión de Experimentación Animal del Gobierno de Cataluña.

Se utilizaron ratones inmunodeficientes NSG<sup>TM</sup> (*NOD scid gamma*) de la cepa JAX<sup>TM</sup> *NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup> Il2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ*, (adquiridos a los laboratorios CHARLES RIVER). Para cada una de las inyecciones, se partió aproximadamente de  $4,5 \times 10^6$  iPSCs (sembradas sobre  $5 \times 10^5$  feeders) que se inyectaron subcutáneamente en el costado dorsal de ratones NSG adultos, de 5-6 semanas y unos 23-25 g de peso. Los ratones fueron distribuidos al azar en cuatro grupos. Se inyectaron tres clones diferentes de iPSCs WT (seis ratones como grupo control), seis clones de iPSCs p73KO (diez ratones), dos clones de iPSCs p53KO (tres ratones), y tres clones de iPSCs DKO (cuatro ratones).

Los ratones se pesaron una vez por semana y el tamaño del teratoma fue medido diariamente con un calibrador electrónico. La salud general de los ratones fue monitorizada por un veterinario especializado y, después de 27 días desde la inyección de las iPSCs, los ratones fueron sacrificados y se extrajeron y pesaron los teratomas.

Los teratomas fueron cuidadosamente diseccionados y fijados con 10 % de formalina tamponada con fosfato a pH 6,8 durante 24 horas, tras lo cual se embebieron en parafina. Se realizaron secciones consecutivas de 4 µm de grosor que fueron teñidas



con hematoxilina y eosina, VEGF-A y la molécula de adhesión celular endotelial plaquetaria (CD31 o PECAM-1) en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital de León de acuerdo con procedimientos estándares. El estudio de los cortes histopatológicos de los teratomas fue llevado a cabo por la empresa ALTHIA HEALTH SL (Barcelona).

## **4. TRABAJO CON ÁCIDOS NUCLEICOS**

### **4.1 TRANSFORMACIÓN BACTERIANA Y PURIFICACIÓN DE DNA PLASMÍDICO**

Para la amplificación de DNA plasmídico (Tabla 14), las bacterias competentes *Escherichia coli* DH5a™ (LIFE TECHNOLOGIES#18265017) fueron transformadas mediante el método de choque térmico. Brevemente, a una alícuota de 50 µL de bacterias se le añadió 250 ng de DNA y se incubó durante 30 min en hielo. Después, las bacterias se sometieron a un choque térmico a 37 °C durante 20 segundos, seguido de una incubación de 2 min en hielo. A continuación, se añadieron 900 µL de medio Luria Bertani (LB, SIGMA#1900) sin antibióticos y los cultivos se incubaron en un agitador orbital durante 1 hora a 37 °C con agitación (225 rpm). Finalmente, se sembraron 50-150 µL del cultivo bacteriano en placas de LB-agar (SIGMA#2025) con el antibiótico de selección correspondiente y se incubaron durante toda la noche a 37 °C.

Al día siguiente, se inoculó un cultivo *starter* de 3-5 mL de medio LB con antibiótico, con una colonia de bacterias de *E. coli* transformadas con el plásmido de interés. Los minicultivos se incubaron en agitación durante 8 horas a 37 °C y 220 rpm. Transcurrido este tiempo, el DNA plasmídico fue purificado con el sistema comercial *NucleoSpin Plasmid Miniprep kit* (MACHEREY-NAGEL#40588), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para las maxipreparaciones de DNA plasmídico se utilizó el sistema *NucleoSpin Plasmid Midiprep Kit* (MACHEREY-NAGEL#740420.5). La concentración de DNA fue determinada en un espectrofotómetro NANODROP® ND-1000.

El DNA obtenido fue analizado por mapeo de restricción mediante digestión con endonucleasas de restricción específicas (FERMENTAS y NEW ENGLAND BIOLABS), y el resultado de las digestiones enzimáticas se comprobó por electroforesis en gel de agarosa.

**Tabla 14. Plásmidos utilizados**

Nombre	Característica	Referencia
<b>PB-ITR-TetO-OSKM-IRES-βgeo-ITR</b>	Vector que lleva clonado las secuencias que codifican para los factores de reprogramación OSKM y βgeo bajo el control transcripcional del sistema Tet-ON inducible por tetraciclina	(Woltjen <i>et al.</i> , 2009)
<b>PB-ITR-TetO-OSK-IRES-βgeo-ITR</b>	Vector que lleva clonado clonado las secuencias que codifican para los factores de reprogramación OSK y βgeo bajo el control transcripcional del sistema Tet-ON inducible por tetraciclina	(Woltjen <i>et al.</i> , 2009)
<b>PB-ITR-TetO-GFP-IRES-βgeo-ITR</b>	Vector que lleva clonado la secuencia que codifica para GFP y βgeo bajo el control transcripcional del sistema Tet-ON inducible por tetraciclina	(Woltjen <i>et al.</i> , 2009)
<b>PB-ITR-CAG-rTA-ITR</b>	Vector que lleva clonado la secuencia que codifica para la proteína transactivadora reversa controlada por tetraciclina	(Woltjen <i>et al.</i> , 2009)
<b>CAG-pBase</b>	Vector que lleva clonado la secuencia que codifica para la enzima transposasa.	(Woltjen <i>et al.</i> , 2009)
<b>pcDNA3 CMV-HA-TAp73a</b>	Vector de expresión que lleva clonado la secuencia que codifica para el factor de transcripción TAp73a humano	(De Laurenzi <i>et al.</i> , 1998)
<b>pcDNA3 CMV-HA-ΔNp73a</b>	Vector de expresión que lleva clonado la secuencia que codifica para el factor de transcripción ΔNp73a	
<b>pcDNA3</b>	-	Clontech
<b>Smad6-luc pGL2-basic</b>	Vector indicador que lleva clonado la secuencia de 3213 pb del promotor de Smad6 de ratón	(Ishida <i>et al.</i> , 2000)
<b>FLAG-SMAD5-pcdef3</b>	Vector de expresión que lleva clonado la secuencia que codifica SMAD5	(Goldman <i>et al.</i> , 1996)
<b>pRL-null</b>	Vector indicador que lleva clonado el gen luciferasa de <i>Renilla sp</i>	Comercial (Promega)

## 4.2 EXTRACCIÓN DE RNA

El RNA total de los cultivos celulares se extrajo añadiendo *TRIZOL®Reagent* (INVITROGEN#15596-026) directamente sobre la monocapa celular (1 mL/10 cm<sup>2</sup> de área de cultivo), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los cultivos celulares se homogeneizaron en presencia de *TRIZOL®Reagent* y los homogeneizados se transfirieron a un tubo de microcentrífuga y se incubaron 5 min a RT. A continuación, se añadieron 200 μL de cloroformo por muestra y, tras agitar vigorosamente, se incubaron 15 min a RT. Las muestras se centrifugaron durante 15 min a 12000 rpm a 4 °C y la fase acuosa que contenía el RNA se transfirió a un tubo limpio. Para precipitar el RNA, se añadieron 500 μL de isopropanol por muestra y se incubó 10 min a RT. Seguidamente, la mezcla se centrifugó 15 min a 12000 rpm a 4 °C y se descartó el sobrenadante. Los *pellets* de RNA obtenidos se lavaron con 1 mL de etanol 75 % preparado en agua con 0, 1% de dietil pirocarbonato (DEPC, SIGMA#D5758). Finalmente, tras centrifugar durante 5 min a 7500 rpm a 4 °C, se eliminó el etanol y se dejaron secar los *pellets*, a RT durante 5 min. El RNA fue resuspendido en 30 μL de agua- DEPC.

El tratamiento para degradar el posible DNA presente en la muestra fue llevado a cabo con la endonucleasa DNasal (*RNase-Free DNase*, PROMEGA# M6101) en presencia

de un inhibidor de RNAsas (*Protector RNase inhibitor*, ROCHE#03335399001) durante 10 min a 37 °C, según las indicaciones del fabricante. Finalmente, el RNA fue purificado con el sistema *Nucleospin RNA cleanup kit* (MACHEREY-NAGEL#740903.250) en un volumen de 30 µL de agua-DEPC y conservado a -80 °C hasta su posterior utilización.

La concentración de RNA se cuantificó por espectrofotometría y la integridad del RNA se comprobó mediante electroforesis en geles de agarosa-formaldehído al 1 %, en tampón MOPS [20 mM MOPS (Merck#1.06129.0250); 5 mM acetato sódico y 1 mM EDTA pH 7,0].

### 4.3 RT-PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL (QRT-PCR)

El DNA complementario (cDNA) se sintetizó mediante una reacción de transcripción reversa (RT) utilizando el sistema comercial *High Capacity RNA-to-cDNA™* (APPLIED BIOSYSTEMS#4377406) a partir de 1 µg de RNA, siguiendo las instrucciones del fabricante. La reacción de transcripción reversa se llevó a cabo en un termociclador *GeneAmp PCR System 2700* (APPLIED BIOSYSTEMS), con las condiciones siguientes: 37 °C durante 60 min y 95 °C durante 5 min. Las muestras de cDNA se conservaron a -20 °C hasta su posterior utilización.

Después de la síntesis del cDNA, se llevó a cabo una PCR cuantitativa a tiempo real utilizando el equipo *StepOnePlus Real-Time PCR System* (APPLIED BIOSYSTEMS). Para las reacciones de PCR, se mezcló 1X *FastStart Universal SYBR Green Master (ROX)*, (ROCHE#049138500001), 175 nM de cada *primer* específico y 1 µL de cDNA de cada muestra en un volumen final de 20 µL de agua. Las secuencias de las parejas de *primers* utilizados presentaban una temperatura de fusión o *melting* similar (58-60 °C) y aparecen detalladas en la Tabla 15.

El programa de PCR fue el siguiente: un paso de 50 °C durante 2 min, desnaturalización inicial a 95 °C durante 10 min, seguidos de 40 ciclos (proceso de desnaturalización a 95 °C durante 15 segundos, proceso de anillamiento a 60 °C durante 30 segundos y proceso de elongación a 72 °C durante 30 segundos), finalizando con una elongación final a 72 °C durante 10 min. Para la curva de *melting* en tiempo real se realizaron 80 ciclos a 65 °C durante 10 segundos, disminuyendo medio grado de temperatura en cada ciclo.

Los resultados de la PCR cuantitativa fueron analizados con el software *StepOne Software v2.0* (APPLIED BIOSYSTEMS). Los ciclos umbrales (*Ct*, *Cycles threshold*) fueron determinados automáticamente al comienzo de la amplificación del DNA en la fase exponencial de la curva.

Para el análisis de la expresión génica, los valores de expresión relativa fueron calculados utilizando el método de cuantificación comparativa de Delta Ct ( $\Delta Ct$ ), de acuerdo a la fórmula: expresión relativa del gen =  $2^{-(Ct \text{ control interno} - Ct \text{ gen de interés})}$ . Como control interno se utilizó el gen de expresión constitutiva 18S (RNA ribosomal). Todas las reacciones de amplificación se llevaron a cabo por duplicado y, al menos, se realizaron tres veces de forma independiente.

**Tabla 15. Secuencias de los primers para el análisis por qRT-PCR.** S: secuencia forward o sentido 5' a 3'. R: secuencia reverse o antisentido 5' a 3'.

RNAm diana	Secuencia	Referencia
<b>18S</b>	S5'AGTCCAGCACATTTGCGAG3'	(Grespi and Melino, 2012)
	R5'TCATCCTCCGTGAGTCTCCA3'	
<b>Pecam1 (CD31)</b>	S5'TACTGCAGGCATCGGCAAA3'	(Magnusson <i>et al.</i> , 2004)
	R5'GCATTTCGCACACCTGGAT3'	
<b>Cdh1 (E-CADHERINA)</b>	S5'CCCCCTACGACTCTCTGTGGTGT3'	Base de datos Primer Bank
	R5'TCGGTGCCCCACTCGTTCAGATA3'	
<b>Epcam (EpCAM)</b>	S5'GCGGCTCAGAGAGACTGTG3'	Base de datos Primer Bank
	R5'CCAAGCATTAGACGCCAGTT3'	
<b>Id1</b>	S5'GGCTGCTACTCAGCCTCAA3'	Base de datos Primer Bank
	R5'GATCGTCGGCTGGAACAC3'	
<b>Lin28</b>	S5'GGCATCTGTAAGTGGTCAACG3'	Base de datos Primer Bank
	R5'CCCTCCTTGAGGCTCGGA3'	
<b>Nanog</b>	S5'CTCATCAATGCCCTGCAGITTTCA3'	(Rivlin <i>et al.</i> , 2014)
	R5'CTCCTCAGGGCCCTGTGACG3'	
<b>Nog (NOGGIN)</b>	S5'GCCAGCACTATCTACACATCC3'	(Kim <i>et al.</i> , 2013)
	R5'GCGTCTCGTTCAGATCCTTCTC3'	
<b>p21<sup>CIP1</sup></b>	S5'CCTGGTGATGCCGACCTG3'	Base de datos Primer Bank
	R5'CCATGAGCGCATCGCAATC3'	
<b>pri-miR34a (miR-34a)</b>	S5'CTGTGCCCTCTGCAAAAGG3'	(He <i>et al.</i> , 2007)
	R5'GGACATTCAGGTGAGGGTCTTG3'	
<b>Smad6</b>	S5'GGCTGCTCCTCTGACCACTG3'	Base de datos de Primer Bank
	R5'CAATGTAGAATCGGACAGATC3'	
<b>Smad7</b>	S5'GAAGGTGGTGGCCACTTTCA3'	(Caprio and Baldini, 2014)
	R5'AACGAGAGTCAGCACTGCCA3'	
<b>Snail1</b>	S5'CACACGCTGCCTTGTGTCT3'	Base de datos Primer Bank
	R5'GGTCAGCAAAAGCACGGTT3'	
<b>TAp73</b>	S5'GCACCTACTTTGACCTCCCC3'	(Tomasini <i>et al.</i> , 2008)
	R5'GCACCTGCTGAGCAAATGAAC3'	
<b><math>\Delta Np73</math></b>	S5'ATGCTTTACGTCGGTGACCC3'	(Tomasini <i>et al.</i> , 2008)
	R5'GCACCTGCTGAGCAAATGAAC3'	
<b><math>\Delta Np63</math></b>	S5'AGATCCCTGAACAGTCCGAC3'	(Tomasini <i>et al.</i> , 2008)
	R5'CGACGAGAATCCATGTCAAAG3'	

## 5. ENSAYOS DE ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL

Para los ensayos transcripcionales de actividad luciferasa, las células P19 se transfectaron con Lipofectamine™ 2000, por triplicado, según el protocolo descrito previamente en el apartado 3.6. Las células se sembraron en placa de 24 pocillos y se transfectaron con 0,125 µg del vector pSMAD6-*luc*-pGL2-basic (que lleva clonado el promotor de SMAD6 dirigiendo la expresión del gen de la luciferasa de luciérnaga), junto con 0,6 µg del vector de expresión correspondiente (CMV-HA-TAp73a-pcDNA3, CMV-HA-ΔNp73a-pcDNA3 o vector vacío pcDNA3) y 0,0625 µg del vector pRL-Null (para la expresión constitutiva del gen de la luciferasa de renilla). El vector pSMAD6-*luc*-pGL2-basic (Ishida *et al.*, 2000) fue proporcionado amablemente por el Dr. Kohei Miyazono (Universidad de Tokio, Japón).

A las 5 horas de la transfección, el medio se reemplazó por medio completo. Al día siguiente, las células se lavaron con PBS y se cultivaron en medio al 0,2 % de FBS. Tras 24 horas de cultivo en bajo suero, las células se trataron con 5 ng/mL de BMP4 humano.

Los extractos celulares se prepararon 20 horas después del tratamiento con BMP4 usando el sistema comercial *Dual-Luciferase Reporter Assay System* (PROMEGA#E1960). Siguiendo las recomendaciones del fabricante, las células se lisaron con el tampón de lisis pasivo (PLB), incubando durante 15 min a RT y agitación. Posteriormente, las células se homogeneizaron y disociaron mediante pipeteo para permitir su lisado completo. Los lisados celulares se recogieron y centrifugaron 5 min a 14000 rpm a 4 °C. Finalmente, se recuperaron los sobrenadantes, descartando los restos del lisado celular.

Para determinar la actividad luciferasa (FF), 15 µL de muestra se mezclaron con 50 µL del sustrato de luciferasa (luciferina, LARII) y se cuantificó la bioluminiscencia emitida. Después, se paró la reacción añadiendo 50 µL del tampón *Stop&Glo* junto con 1 µL del sustrato de renilla, para determinar la actividad renilla (FR). Las medidas se realizaron con un luminómetro (BERTHOLD) y, en todos los casos, los valores de la actividad FF fueron normalizados por la actividad FR.

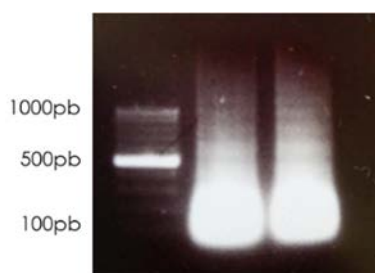
## 6. ENSAYO DE INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA (CHIP)

Se fijaron 20x10<sup>6</sup> células H1299 parentales con 1 % PFA (THERMO FISHER SCIENTIFIC#28906) en PBS durante 10 min, con agitación, para conseguir la reticulación o *cross-linking* de las proteínas y el DNA. Para detener la reacción se añadió glicina (SIGMA#G8898) a una concentración final de 125 mM. Las células se lavaron con PBS, se recogieron con un raspador celular y se centrifugaron a 1500 rpm durante 3 min. El pellet celular fue resuspendido en 200 µL de tampón de lisis CHIP [20 mM Tris HCl pH 8, 2 mM EDTA; 150 mM NaCl; 0,7 % SDS], suplementado con el cóctel de inhibidores de proteasas (1:100)

(CALBIOCHEM#539131). Los agregados celulares fueron disgregados pasándolos unas 4-5 veces a través de una aguja de jeringa G20 y, posteriormente, la suspensión celular se homogeneizó mediante pipeteo arriba y abajo en hielo durante 10 min.

A continuación, el lisado celular fue sonificado para fragmentar la cromatina a un tamaño de unas 200-600 pb usando el sonicador *Bioruptor® Plus sonication device* (DIAGENODE). La sonicación fue llevada a cabo a máxima potencia. Se realizó una primera sonicación de 15 ciclos, 30 segundos ON y 30 segundos OFF. Posteriormente, se agitaron las muestras con vórtex, seguido de una pequeña centrifugación, para volver a repetir los mismos ciclos de sonicación. Tras la sonicación, el lisado celular fue centrifugado durante 5 min a 14000 rpm y se recogió el sobrenadante conteniendo la cromatina. Se utilizaron 30  $\mu$ L para comprobar el tamaño del DNA y el resto del producto de sonicación se guardó a -80 °C hasta su posterior utilización.

Para comprobar el tamaño del DNA, los 30  $\mu$ L de muestra de cromatina fueron diluidos con 170  $\mu$ L de tampón de dilución ChIP [0,01 % SDS; 1,1 % Triton X-100; 1,2 mM EDTA; 20 mM Tris-HCl pH 8; 150 mM NaCl] y se añadieron 12  $\mu$ L de solución 5 M NaCl y 6  $\mu$ L de 10 mg/ml RNaseA. La mezcla fue incubada en agitación a 65 °C durante la noche para revertir el *crosslinking* de la proteína con el DNA y degradar el RNA. Al día siguiente, los fragmentos de DNA fueron purificados con el kit comercial *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up* (MACHEREY-NAGEL#740609.10), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras, diluidas en un 30 % de glicerol en agua, se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1,5 %, durante 40 min a 50 V, para comprobar el tamaño del DNA fragmentado (Figura 24).



**Figura 24. Comprobación de la cromatina sonicada de células H1299.** Comprobación del tamaño de la cromatina fragmentada de células H1299 separados mediante electroforesis en gel de agarosa 1,5 %. Condiciones de sonicación: 2 ciclos consecutivos de 15 pulsos 30 ON/30 OFF.

Para la inmunoprecipitación, se partió de 200  $\mu$ L del producto de sonicación, que se diluyeron con tampón de dilución (1:10). Se añadieron 3  $\mu$ g del anticuerpo específico o bien, de la inmunoglobulina G inespecífica como control (IgG), Tabla 19. La mezcla se incubó en rotación en una noria toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, se utilizó proteína G unida a bolas magnéticas (*Dynabeads®-protein G*, INVITROGEN# 10004D) para capturar

los inmuno-complejos de DNA-proteína-anticuerpo. Para ello, previamente, se lavaron 30  $\mu\text{L}$  de *Dynabeads®-protein G* con el tampón de dilución y se recogieron usando un imán *DynaMag™ Magnetic particle concentrator* (DYNALBIOTECH#20.20). Las bolas magnéticas fueron resuspendidas en 200  $\mu\text{L}$  de tampón de dilución y se incubaron con 14  $\mu\text{L}$  de DNA de esperma de salmón (INVITROGEN#15632-011) durante una hora, con rotación a 4 °C, para bloquear las uniones inespecíficas al DNA. Después de esta incubación, las bolas magnéticas se añadieron a la mezcla anticuerpo-lisado y se incubaron con rotación durante 3-4 horas a 4 °C.

Los inmuno-complejos unidos a las bolas fueron recogidos con el imán y se realizaron lavados secuenciales de 1 mL durante 5 min en rotación a 4 °C, con los siguientes tampones de lavado: tampón de lavado de baja sal [0,1 % SDS; 1 % Triton X-100; 2 mM EDTA; 20 mM Tris-HCl pH 8; 150 mM NaCl], tampón de lavado de alta sal [0,1 % SDS; 1 % Triton X-100; 2 mM EDTA; 20 mM Tris-HCl pH 8; 500 mM NaCl], tampón de lavado de LiCl [0,25 M LiCl (SIGMA#L9650); 1 % NP-40 IGEPAL (Appllichem#UN3082); 1 % deoxicolato sódico (SIGMA#D6750); 1 mM EDTA; 10 mM Tris-HCl pH 8] y dos lavados con tampón de lavado TE [10 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA].

Los inmuno-complejos fueron eluidos de las bolas magnéticas con 200  $\mu\text{L}$  de tampón de elución ChIP [1 % SDS; 50 mM Tris-HCl pH 7,5]. En este punto, 30  $\mu\text{L}$  del lisado no inmunoprecipitado fue diluido con 170  $\mu\text{L}$  de tampón de elución para ser usado como DNA total (*input*) en la reacción de PCR. Se añadieron 12  $\mu\text{L}$  5 M NaCl y 6  $\mu\text{L}$  10 mg/ml RNase A a todas las muestras y se incubaron en agitación a 65 °C durante toda la noche para revertir el *crosslinking* proteína-DNA y degradar el RNA.

Al día siguiente, las bolas magnéticas fueron retiradas usando el imán y se recogieron los sobrenadantes conteniendo el DNA y las proteínas. Se añadieron 2  $\mu\text{L}$  10 mg/mL proteinasa K, 2  $\mu\text{L}$  0,5 M EDTA y 4  $\mu\text{L}$  1 M Tris-HCl pH 6,8 y la mezcla fue incubada durante al menos 3 horas a 45 °C en agitación para degradar las proteínas. Después de la degradación de las proteínas, el DNA fue purificado con el sistema comercial *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up* y se eluyó en 30  $\mu\text{L}$  de agua libre de DNA.

El DNA inmunoprecipitado fue analizado por qPCR (de manera similar a la descrita en el apartado 5.3). Las secuencias de las parejas de *primers* utilizados aparecen detalladas en la Tabla 16. Se utilizaron 3  $\mu\text{L}$  de DNA eluido y 3  $\mu\text{L}$  de *input* para la qPCR. El DNA inmunoprecipitado fue normalizado con la cantidad de DNA total en el lisado (*input*) usando el método comparativo Delta Ct ( $\Delta\text{Ct}$ ):  $\Delta\text{Ct}=2$  (Ct *Input*-Ct *inmunoprecipitación de DNA*). Finalmente, el DNA inmunoprecipitado específico, fue normalizado con el DNA inmunoprecipitado contra las IgGs inespecíficas. La reacción con agua, en lugar de DNA fue utilizada como control negativo para detectar posibles

señales de amplificación de DNA contaminado o la formación de posibles dímeros de primers.

**Tabla 16. Primers utilizados en ChIP**

Región génica	Nombre del primer	Secuencia
Promotor Smad6	p53RE Fw	CACTTTGGGAGGCTAGGG
	p53RE Rv	CCGCCAAGTAGCTGGAAC
Promotor p21	p21RE Fw	AGTTTGCAACCATGCACTTG
	p21RE Rv	CTGATGCATGTGTGCTTGTG

## 7. TRABAJO CON PROTEÍNAS

### 7.1 WESTERN BLOT

La extracción de proteínas se realizó en todo momento en hielo. Las células se lavaron con PBS frío y se lisaron con tampón de lisis EBC [50 mM Tris pH 8 (Merck#1.08382.2500), 120 mM NaCl, 0,5 % Nonidet P-40 (SIGMA#A1694)] con inhibidores de proteasas: 10 µg/mL aprotinina (SIGMA#A6279), 20 µg/mL leupeptina (SIGMA#L9783), 1 mM ortovanadato de sodio (SIGMA#S6508) y 0,1 mg/mL de fluoruro de sulfonilmetilfenilo (PMSF, SIGMA#P7626), durante 30 min a 4 °C. Posteriormente, las células se recogieron con un raspador y se disgregaron mecánicamente mediante pipeteo. Las muestras se centrifugaron a 14000 rpm durante 12 min a 4 °C y los sobrenadantes se transfirieron a un tubo limpio.

La concentración proteica se determinó mediante el método colorimétrico de Bradford (BIORAD#500-0006) (Bradford, 1976), utilizando albúmina de suero bovina (BSA) como patrón. Se determinó la absorbancia a 595 nm con un espectrofotómetro (GeneQuant™ pro, GE HEALTHCARE) y se calculó la concentración proteica en función de la recta patrón.

Las muestras se prepararon con cantidades iguales de proteína (entre 50-100 µg/carril) diluidas en tampón de carga 3XLB [50 mM Tris-Cl pH 6,8; 100 mM ditiotreitolo (DTT, Calbiochem#233156); 2 % SDS; 0,1 % azul de bromofenol (Merck#1.59108.0001); 10 % glicerol (Prolabo#24387292)] y se hirvieron a 100 °C durante 3 min antes de cargarlas en el gel. Las proteínas se separaron mediante electroforesis vertical en geles de poliacrilamida:bis-acrilamida (37,5:1; BIORAD#161-0158) con SDS al 10 % (Laemmli, 1970), Tabla 17 y Tabla 18, en tampón de electroforesis [25 mM Tris-HCl; 250 mM glicina pH 8,3; 1 % SDS], utilizando un equipo Mini-PROTEAN III (Bio-RAD) y aplicando un voltaje de 80-100 V. Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa de 0,45 µm (Bio-RAD#162-0115) (Burnette, 1981) utilizando el sistema *Mini Trans-Blot®* (Bio-RAD), a una



intensidad constante de 350 mA durante 85 min a 4 °C, en tampón de transferencia [25 mM glicina; 250 mM Tris base; 20% metanol (Merck#1.06012)].

**Tabla 17. 10 % Resolving gel (gel separador, 10 mL).**

10 % Resolving Gel (10 mL)	Volumen	Número de catálogo
<b>Agua</b>	4 mL	-
<b>30 % acrilamida</b>	3,3 mL	Biorad#1610158
<b>1,5 M Tris (pH 8,8)</b>	2,5 mL	-
<b>10 % SDS</b>	0,1 mL	SIGMA#L3771
<b>10 % APS (Persulfato Amónico)</b>	0,1 mL	Merck#101201
<b>TEMED (N,N,N,N'-tetrametiletilendiamina)</b>	0,004 mL	SIGMA#T9281

**Tabla 18. 5 % Stacking gel (gel apilador, 5 mL).**

5 % Stacking Gel (5 mL)	Volumen	Número de catálogo
<b>Agua</b>	3,4 mL	-
<b>30 % acrilamida</b>	0,83 mL	Biorad#1610158
<b>1,5 M Tris (pH 8,8)</b>	0,63 mL	-
<b>10 % SDS</b>	0,05 mL	SIGMA#L3771
<b>10 % APS</b>	0,05 mL	Merck#101201
<b>TEMED</b>	0,005 mL	SIGMA#T9281

Tras la transferencia se llevó a cabo el bloqueo de los sitios de unión inespecíficos de la membrana de nitrocelulosa. Para ello, las membranas se incubaron en solución de bloqueo: 5 % de leche desnatada en polvo y 1 de % suero de cabra en TBS-T [50 mM Tris-HCl pH 7,4; 150 mM NaCl; 0,05 % Tween-20] durante 1 hora a RT. Seguidamente, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario, diluido en 2,5 % de leche desnatada en polvo, a 4 °C durante toda la noche en agitación.

Al día siguiente, tras realizar tres lavados de 5 min en TBS-T, las membranas se incubaron con 25 ng/mL de anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (PIERCE), diluida en 2,5 % de leche desnatada en polvo, en TBS-T durante 1 hora a RT y en oscuridad. Finalmente, tras lavar tres veces durante 5 min, las membranas se incubaron con el sustrato quimioluminiscente *ECL Super Signal West Pico* (Pierce#34087), siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante. La señal se detectó mediante la exposición de las membranas sobre películas de autorradiografía (*Hyperfilm ECL*, AMERSHAM BIOSCIENCES#29096837) que se revelaron de forma manual.

Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados, así como su dilución de uso, se indican en la Tabla 19 y 20, respectivamente.

**Tabla 19. Anticuerpos primarios utilizados para inmunodetección.** Se indica el anticuerpo primario utilizado, la especie contra la que se ha generado el anticuerpo, la dilución y técnica de uso, así como la referencia. WB: western blot; IF: inmunofluorescencia; IP: inmunoprecipitación

Antígeno	Especie	Dilución	Técnica	Número de catálogo
<b>AFP (clon 3H8)</b>	Mouse	1:1000	IF	Inmunostep#mAFP
<b>Actina (20-33)</b>	Conejo	1:10.000	WB	SIGMA#A5060
<b>CD31</b>	Rata	1:1000	IF	BD#553370
<b>E-cadherina (24E10)</b>	Conejo	1:60	IF	Cell signaling#3195S
<b>GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein)</b>	Conejo	1:400	IF	Neomarkers#RB-087A1
<b>HA(Y11)</b>	Conejo	1:1000	WB/IP	Santa Cruz#sc-805
<b>Nanog</b>	Conejo	1:1000	IF	Millipore#AB5731
<b>PECAM1 (M20)</b>	Conejo	1:50	IF	Santa Cruz#sc-1506-R
<b>p73 Delta N (38c674)</b>	Ratón	1:50	IP	Abcam#ab13649
<b>p73 N terminal</b>	Conejo	1:50	IP	Abcam#ab14430
<b>pSMAD1/5/8 (41D10)</b>	Ratón	1:1000	WB	Cell signaling#9516S
<b>SSEA-1 (MC-480)</b>	Ratón	1:100	IF	Pierce#MA1-022
<b>Tuj1</b>	Mouse	1:1000	IF	Covance#PRB435P-01
<b>Vimentina</b>	Cobaya	1:100	IF	Fitzgerald#20R-VP004

**Tabla 20. Anticuerpos secundarios utilizados para inmunodetección.** Se indica el anticuerpo secundario utilizado, la especie en la que se ha generado el anticuerpo, la dilución y técnica de uso, así como el número de catálogo. WB: western blot; IF: inmunofluorescencia.

Anticuerpo	Especie	Dilución	Técnica	Número de catálogo
<b>Anti-rata Alexa594</b>	Asno	1:1000	IF	Molecular Probes#A-21209
<b>Anti-cobaya-Cy3</b>	Asno	1:1500	IF	Jackson Lab#
<b>Anti-conejo Alexa594</b>	Asno	1:1000	IF	Molecular Probes#A11037
<b>Anti-conejo-FITC</b>	Asno	1:100	IF	Jackson Lab#711-095-152
<b>Anti-ratón-FITC</b>	Asno	1:100	IF	Jackson Lab#715-095-150
<b>Anti-conejo-Cy3</b>	Asno y	1:500	IF	Jackson Lab#715-165-152
<b>Anti-ratón HRP</b>	Cabra	1:20000	WB	Pierce#31430
<b>Anti-conejo HRP</b>	Cabra	1:20000	WB	Pierce#31460

## 7.2 INMUNOCITOQUÍMICA

Para la detección por inmunocitoquímica de la expresión de marcadores de pluripotencia o de marcadores de diferenciación de cada una de las capas germinales, las células se sembraron sobre cubreobjetos de plástico de 15 mm de diámetro (SARSTEDT#83.1840.002) previamente gelatinizados.

Las células se fijaron con 3,7 % de PFA durante 15 min a RT. Tras un lavado con PBS, las células se permeabilizaron con 0,5 % de TritónX-100 en PBS durante 15 min y se bloquearon con 0,5 % de Tween-20 más 10 % de suero de asno en PBS durante una hora. El marcaje con los anticuerpos primarios específicos, diluidos en solución de bloqueo, se realizó durante toda la noche a 4 °C (ver Tabla 19). Al día siguiente, se realizaron tres lavados de 5 min con 0,5 % de Tween-20 en PBS y se procedió a la incubación con los anticuerpos secundarios conjugados con los fluoróforos, diluidos en solución de

bloqueo, durante 45 min a RT en oscuridad y cámara húmeda. Posteriormente, los cubres se lavaron al menos tres veces con 0,5 % de Tween-20 en PBS durante 5 min. Los núcleos se marcaron con 1 µg/mL de 4', 6-diamino-2-fenilindol (DAPI, SIGMA#D9542) durante 1 min y, finalmente, las preparaciones se montaron sobre portaobjetos con el medio de montaje *Fluoromount G* (ELECTRON MICROSCOPY SCIENCE#17984-25). El análisis se realizó con un microscopio invertido (Nikon Eclipse TE300) y en un microscopio láser confocal (Nikon EclipseTE2000).

El análisis por inmunocitoquímica de la diferenciación endotelial a partir de EBs en condiciones 3D tuvo las siguientes peculiaridades. Los EBs embebidos en colágeno se lavaron dos veces con PBS y se fijaron con 4 % de PFA en PBS durante 30 min a RT. La capa superior del colágeno se retiró con unas pinzas y se colocó en un pocillo de una placa de 24 pocillos con PBS. Tras dos lavados de 15 min con PBS, se llevó a cabo el bloqueo y la permeabilización con 3 % de BSA (SIGMA#B4237) y 0,2 % de Tritón-X100 en PBS durante 2 horas a RT. A continuación, los EBs se incubaron con el anticuerpo primario (ver Tabla 19) en solución PBT [3 % BSA; 0,1 % Tween-20 en PBS] a 4 °C durante toda la noche. El segundo día, se realizaron al menos tres lavados de 1 hora con PBS-0,01 % Tween-20 (PROLABO#28.829.296) y, a continuación, se incubaron con el anticuerpo secundario (ver Tabla 20) en PBT a 4 °C durante toda la noche en oscuridad. El tercer día se volvieron a realizar al menos tres lavados de 1 hora con PBS-0,05 % Tween-20 y seguidamente, se tiñeron los núcleos con 1 µg/mL de DAPI en PBS durante 10 min a RT. Finalmente, se realizaron varios lavados intensivos con PBS y la capa de colágeno se colocó sobre una placa con base de cristal *WillCo-dish®* (WILLCOWELLS#GWSt-5040) con unas gotas de PBS. Las preparaciones se analizaron en un microscopio confocal Nikon EclipseTE2000 con el software EZ-C1 3.60.

## 8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y PROGRAMAS UTILIZADOS

El análisis estadístico se realizó con el programa *GraphPad Prism 5.0* (*GraphPad Software, Inc.*). Para determinar diferencias significativas entre las medias se efectuó la prueba “*t de Student*” para datos no pareados e independientes. Los valores de *p* menores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos. Los experimentos se repitieron al menos dos veces, y en los experimentos correspondientes, con al menos tres embriones por genotipo, a menos que se indique lo contrario. Los valores representados corresponden a la media aritmética junto con el error estándar de la media (SEM).

Los programas informáticos de libre acceso utilizados fueron los siguientes:

- Base de datos *primerBank* (<https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>), para la selección de *primers* para qRT-PCR.

- Programa informático *Primer 3. Plus* (<http://primer3plus.com>), para el diseño de *primers*.
- Programa informático *p53FamTag* (<http://p53famtag.ba.itb.cnr.it/>), para la detección de sitios de respuesta a p53 (p53RE) en genes humanos.
- Programa *Pairwise Sequence Alignment* (<http://www.ebi.ac.uk/>) del Instituto Europeo de Bioinformática (EMBL-EBI), para el alineamiento local de secuencias.
- Base de datos *Ensembl* (<http://www.ensembl.org/index.html>), para el acceso a los genomas anotados de eucariotas.



# **Resultados y Discusión**



**OBJETIVO 1. Analizar el papel del gen *Trp73*, y su relación funcional con el gen *Trp53*, en el proceso de reprogramación celular y en el mantenimiento de la auto-renovación y la pluripotencia.**

### **1.1 Análisis de la falta de p73 en la eficiencia del proceso de reprogramación, en presencia o ausencia de p53**

El silenciamiento o eliminación de genes supresores tumorales como *p53*, *p16<sup>INK4a</sup>* (Li *et al.*, 2009a) o *Rb* (Kareta *et al.*, 2015), incrementa significativamente la eficiencia del proceso de reprogramación, demostrándose que actúan como una barrera para la reprogramación celular y sugiriendo que los mecanismos de supresión tumoral tienen como función restringir el proceso de reprogramación celular. En este sentido, p73 comparte muchas funciones con p53 y, evolutivamente, ha realizado funciones semejantes (Belyi *et al.*, 2010b). Sin embargo, nuestro grupo ha demostrado que, en algunos contextos celulares, p73 lleva a cabo funciones antagónicas a p53 (Gonzalez-Cano *et al.*, 2010; Marques-Garcia *et al.*, 2009). Este es el caso de la regulación del mantenimiento de la auto-renovación de las células troncales neurales, donde p73 actúa como un regulador positivo, necesario para el mantenimiento de la auto-renovación (Gonzalez-Cano *et al.*, 2010), mientras que p53 es un regulador negativo (Meletis *et al.*, 2006). Por todo ello, nos propusimos analizar si la falta de p73, por sí misma o en ausencia de p53, tiene un efecto en la eficiencia del proceso de reprogramación celular.

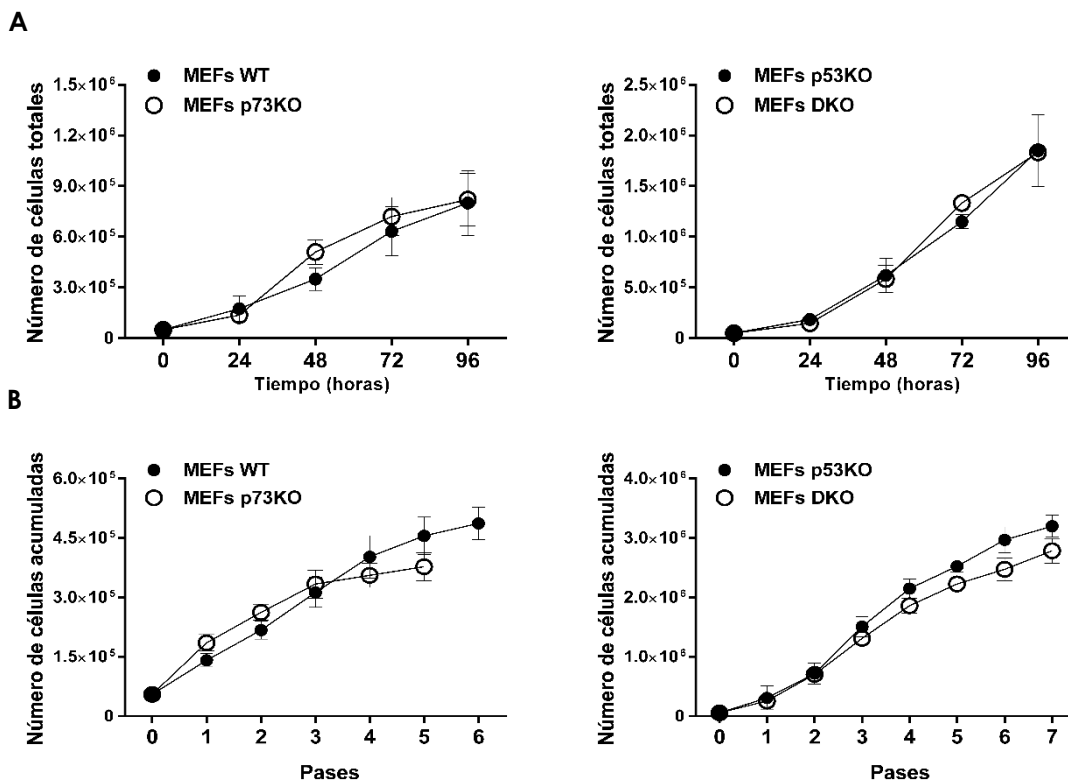
#### **1.1.1 Reprogramación de fibroblastos embrionarios de ratones WT, p73KO, p53KO y DKO**

Para analizar el papel de p73, y su relación funcional con p53, en el proceso de reprogramación celular nos planteamos generar líneas celulares iPSCs a partir de fibroblastos embrionarios de ratón de genotipo WT, p73KO (carentes del gen *Trp73*), p53KO (carentes del gen *Trp53*) y DKO (carentes de los genes *Trp73* y *Trp53*) que nos permitiesen analizar los efectos de la falta de p73, en presencia o ausencia de p53, durante el proceso de reprogramación celular.

Se ha demostrado que el índice de proliferación celular es un parámetro clave en el control de la reprogramación de las células somáticas, comprobándose que el incremento en la tasa de proliferación de las células a reprogramar determina que la cinética del proceso de reprogramación se pueda acelerar (Hanna *et al.*, 2009b). Por ello, con el fin de descartar que la falta de p73 pudiese tener un efecto en la tasa de proliferación de los cultivos de MEFs utilizados para la reprogramación, se realizaron



curvas de crecimiento diarias y acumulativas. Los datos obtenidos indicaron que no existen diferencias entre las curvas de crecimiento de los MEFs WT y los MEFs p73KO, ni entre los MEFs p53KO y DKO (Figura 25), indicando que la eliminación de p73 no afecta los índices de proliferación, permitiendo, por tanto, la comparación de las cinéticas de reprogramación entre estas parejas. Sin embargo, en consonancia con lo descrito por Flaminia Talos y colaboradores, la eliminación de p53 acelera la proliferación celular (Talos *et al.*, 2007), por lo que cabría esperar que la cinética de reprogramación en los MEFs carentes de p53 esté acelerada respecto a los MEFs WT y p73KO (Hanna *et al.*, 2009b; Hong *et al.*, 2009).



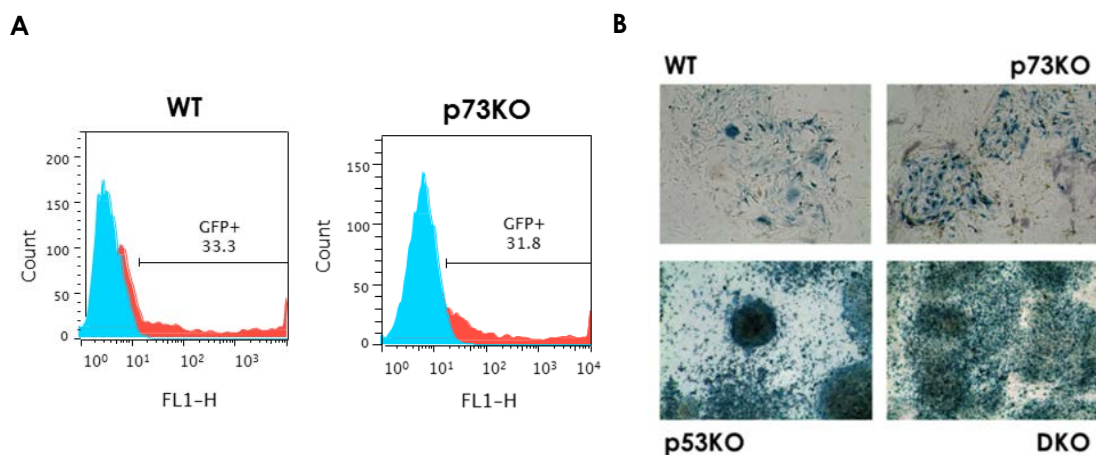
**Figura 25.** El efecto de la falta de p73 durante la reprogramación celular no está mediado por una desregulación de la tasa de proliferación celular. **A)** Curvas de crecimiento diaria y **B)** acumulativa de MEFs WT, p73KO, p53KO y DKO, en pase 4-5. Los datos representan la media  $\pm$  SEM; los experimentos se realizaron, al menos con tres MEFs de distintos embriones por genotipo, dos experimentos independientes, por triplicado. Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante la prueba t de Student: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

Una vez realizado este análisis previo, se reprogramaron fibroblastos embrionarios de ratón E13.5; procedentes de ratones WT y de ratones genéticamente modificados p73KO, p53KO y DKO. El método elegido para la expresión de los factores de reprogramación (OCT4, SOX2, KLF4, MYC) en las células fue la utilización del transposón piggyBac asociado a un sistema Tet-On (Woltjen *et al.*, 2009), inducible por doxiciclina. Siguiendo el diseño experimental indicado en el apartado 4.1 de Materiales y Métodos, los cultivos de MEFs en un pase temprano fueron electroporados con el transposón PB-

ITR-TetO-OSKM-IRES- $\beta$ geo-ITR, junto con vectores de expresión para la transposasa, el transactivador reverso rTA y PB-ITR-TetO-GFP-IRES- $\beta$ geo-ITR, para el gen indicador de GFP. Pasadas 24 horas, se indujo la expresión de los transgenes mediante tratamiento con doxiciclina durante 22 días, tras lo cual, el proceso de reprogramación se consideró completado.

Con el fin de excluir la posibilidad de que variaciones en la eficiencia de la electroporación de los MEFs afectasen la eficiencia de reprogramación, se analizó el porcentaje de células que expresaban el gen marcador GFP electroporado junto con el sistema de transposición mediante citometría de flujo, cinco días después de la inducción de la expresión de OSKM por tratamiento con doxiciclina (Sarig *et al.*, 2010). Como se muestra en la Figura 26.A, la eficiencia de electroporación fue similar en los MEFs WT y p73KO.

En paralelo, se confirmó la expresión del transgén en los MEFs de los cuatro genotipos mediante un análisis de actividad  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -gal). La expresión del gen *LacZ*, que codifica para la enzima  $\beta$ -galactosidasa, sirve como indicador de la expresión de los transgenes OSKM, puesto que se encuentran bajo el mismo control transcripcional y se expresan a partir de un mRNA policistrónico (PB-ITR-TetO-OSKM-IRES- $\beta$ geo-ITR). Los resultados de la tinción de actividad  $\beta$ -galactosidasa (Figura 26.B) confirmaron la expresión de los transgenes.



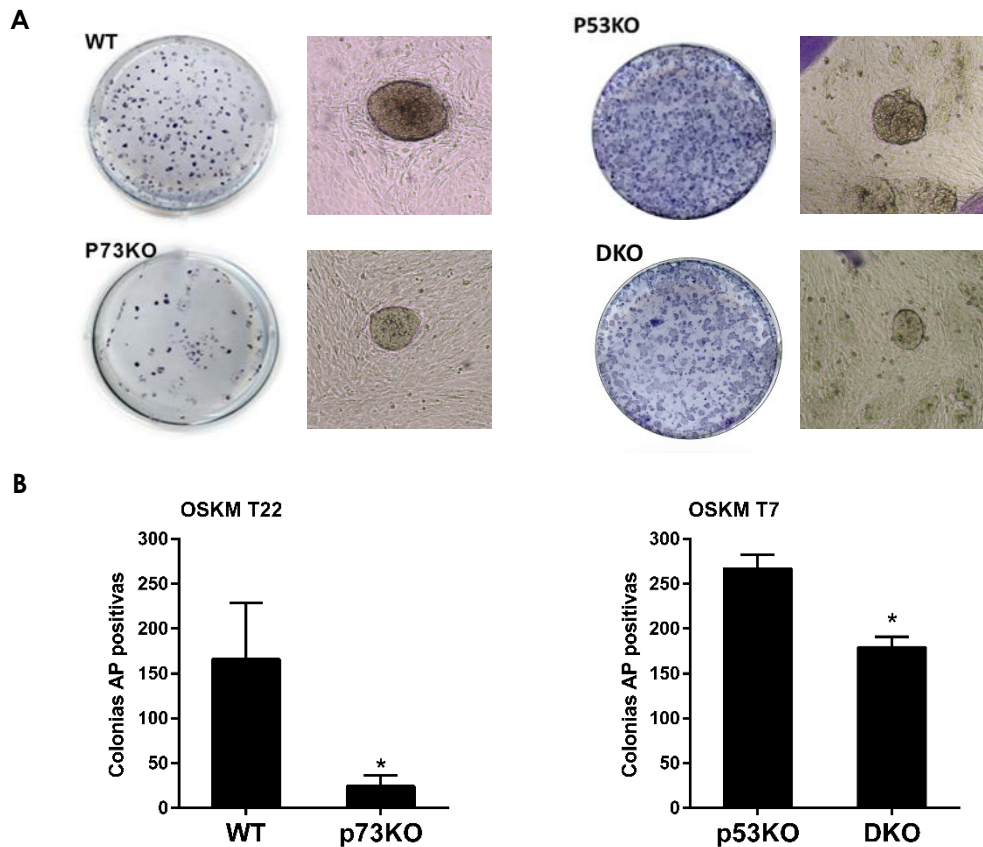
**Figura 26. La eficiencia de electroporación de los MEFs WT y p73KO no está afectada por la ausencia de p73.**  
**A).** Porcentaje de células que expresan el vector PB-ITR-TetO-GFP-IRES- $\beta$ geo-ITR, en presencia de doxiciclina, 5 días después de la electroporación de los fibroblastos mediante análisis de citometría de flujo. **B)** Actividad  $\beta$ -galactosidasa de las células que expresan el vector PB-ITR-TetO-OSKM-IRES- $\beta$ geo-ITR, en presencia de doxiciclina, 5 días después de la electroporación de los fibroblastos.

### 1.1.2 Eficiencia del proceso de reprogramación celular con cuatro factores (OSKM)

Se realizó un análisis comparativo de la eficiencia del proceso de reprogramación, mediante la monitorización por microscopía de la morfología de las colonias, a lo largo del proceso (tres semanas) y la cuantificación de colonias con actividad fosfatasa alcalina (AP) a tiempo final, ya que la actividad AP es indicadora del estado de pluripotencia en las ESCs.

La formación de colonias WT y p73KO comenzó a detectarse en torno a la segunda semana después del inicio de la inducción de la expresión de OSKM con doxiciclina (día 8-10). Se detectó la aparición de células con la morfología típica de las ESCs: células redondeadas, con nucléolos grandes y poco citoplasma, agrupadas en colonias compactas de bordes muy delimitados (Takahashi and Yamanaka, 2006). Como se muestra en la Figura 27, la cuantificación de las colonias AP<sup>+</sup> al final del proceso (día 22) reveló que la eficiencia de la reprogramación era significativamente menor en los MEFs p73KO que en los MEFs WT, indicando que p73 es necesario para el proceso de reprogramación celular.

Sin embargo, las colonias p53KO y DKO comenzaron a aparecer en torno al día 6, en consonancia con lo descrito en células carentes de p53, en las que el proceso de reprogramación se encuentra acelerado (Hanna *et al.*, 2009b; Nakagawa *et al.*, 2008). La falta de p53 aceleró la cinética de reprogramación y aumentó la eficiencia del proceso (Hong *et al.*, 2009; Kawamura *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2009a; Marion *et al.*, 2009; Utikal *et al.*, 2009b), generándose mayor número de colonias con morfología ESC, incluso a los 7 días desde el inicio de la inducción con doxiciclina. Sorprendentemente, este efecto "acelerante" disminuyó significativamente al eliminar p73, ya que la eficiencia de reprogramación de los MEFs DKO fue significativamente menor que la de los MEFs p53KO. En conjunto, los resultados obtenidos demuestran que p73 es necesario para el proceso de reprogramación celular, incluso en ausencia de p53.



**Figura 27. La falta de p73 disminuye la eficiencia del proceso de reprogramación celular con OSKM, incluso en ausencia de p53. A)** Actividad fosfatasa alcalina en las colonias reprogramadas WT, p73KO, p53KO y DKO. Imagen de la tinción en las placas (tamaño 1X) y detalle mediante microscopía de contraste de fases (objetivo: 5X) de las colonias formadas durante el proceso de reprogramación. **B)** Recuento del número de colonias WT, p73KO, p53KO y DKO, con actividad fosfatasa alcalina a los 7 y 22 días desde la inducción de los factores OSKM con doxiciclina. Los datos representan la media  $\pm$  SEM; los experimentos se realizaron, al menos, con tres MEFs de distintos embriones por genotipo, dos experimentos independientes, por duplicado. Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante la prueba t de Student: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

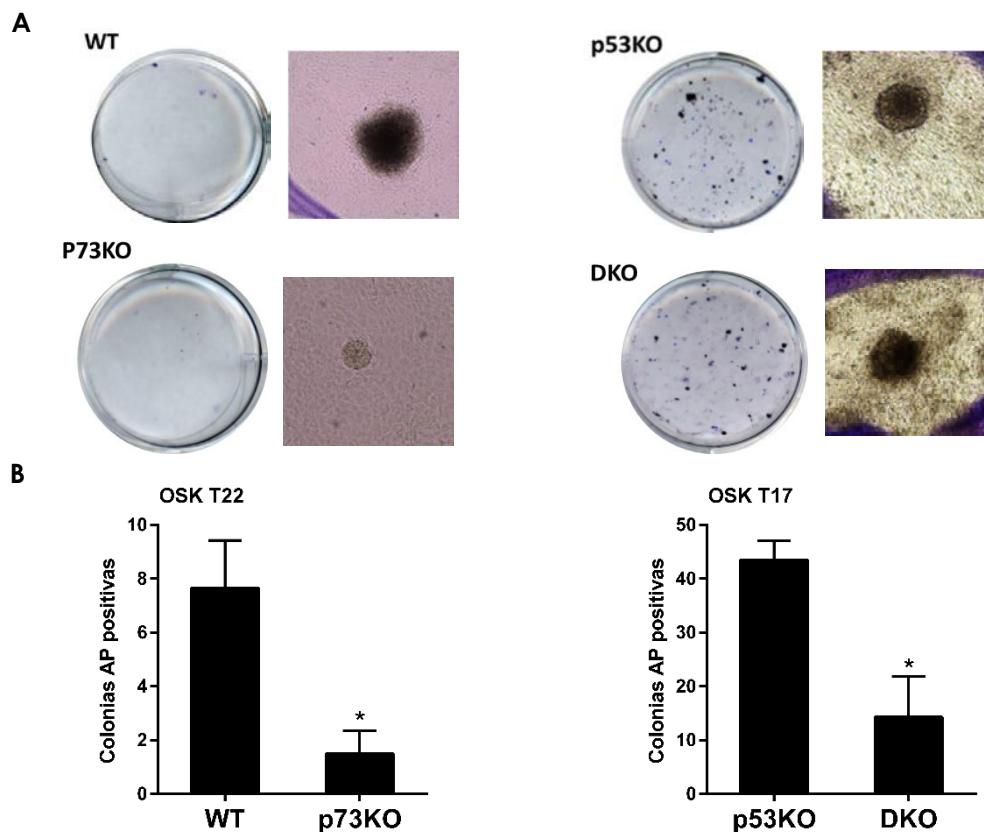
### 1.1.3 Eficiencia del proceso de reprogramación celular con tres factores (OSK)

Se ha demostrado que c-MYC es dispensable en el cóctel de reprogramación (Nakagawa *et al.*, 2008; Wernig *et al.*, 2008), aunque su eliminación retrasa la cinética del proceso y disminuye significativamente la eficiencia del proceso de reprogramación, generándose colonias planas con morfología distinta a las colonias ESCs (Takahashi and Yamanaka, 2006). No obstante, la expresión endógena de c-MYC se activa durante el proceso (Nakagawa *et al.*, 2008) y es capaz de acelerar la cinética de reprogramación, ya sea aumentando la tasa de proliferación celular o suprimiendo la senescencia (Hong *et al.*, 2009; Nakagawa *et al.*, 2008; Wernig *et al.*, 2008). La eliminación de p53 acelera el proceso de reprogramación en ausencia de c-MYC, al menos en parte debido a su función como inductor de la parada del ciclo celular y la senescencia (Brosh *et al.*, 2013). Por tanto, nos interesaba saber si la falta de p73

afectaría la eficiencia del proceso de reprogramación solo con los tres factores de reprogramación, OSK.

Para abordar este objetivo, se procedió de la misma manera a la descrita en el apartado 1.1.1, salvo que, en este caso, los MEFs se electroporaron con el transposón PB-ITR-TetO-OSK-IRES- $\beta$ geo-ITR. En consonancia con lo publicado por Takahashi y Yamanaka, la cinética de reprogramación con tres factores estuvo ralentizada con respecto a la utilización de cuatro factores y, por ello, el tratamiento con doxiciclina tuvo que mantenerse durante 44 días. Además, el número de colonias generadas con OSK (Figura 28) fue menor en todos los genotipos con respecto a OSKM.

Los resultados obtenidos coinciden con datos previos publicados que indican que la generación de colonias de iPSCs sin c-MYC presenta una cinética más lenta y menos eficiente que con c-MYC (Nakagawa *et al.*, 2008; Wernig *et al.*, 2008). De hecho, la formación de las colonias iPSCs a partir de MEFs WT comenzó en torno a la tercera semana desde el inicio de la inducción con doxiciclina (frente a la segunda semana en el caso de la reprogramación con OSKM), mientras que prácticamente no detectamos colonias p73KO durante todo el proceso de reprogramación. La falta de p53 aceleró el proceso, y las colonias p53KO y DKO aparecieron en torno a la segunda semana (con un retraso de una semana respecto a la reprogramación con cuatro factores). Sin embargo, también en el contexto DKO, la falta de p73 disminuyó significativamente la eficiencia del proceso de reprogramación respecto a la de los p53KO (Figura 28). Además, las colonias DKO reprogramadas con OSK no presentaban la morfología típica de colonia-ESC y no pudieron ser establecidas a largo plazo en cultivo, todo ello, indicando que p73 desempeña una función necesaria durante el proceso de reprogramación que no puede ser recuperada por la ausencia de p53.

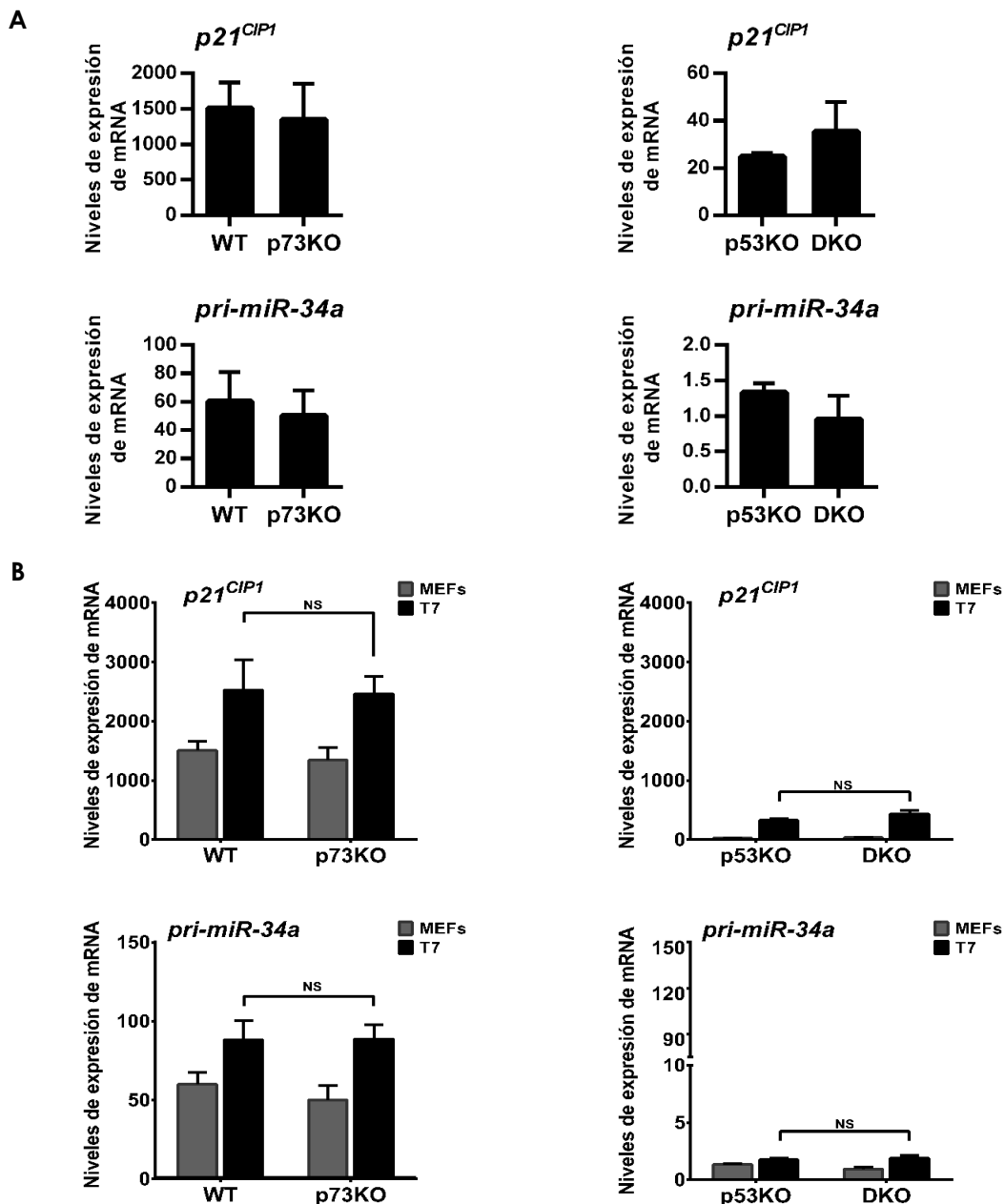


**Figura 28. La falta de p73 disminuye la eficiencia del proceso de reprogramación celular con OSK, incluso en ausencia de p53. A)** Actividad fosfatasa alcalina en las colonias reprogramadas WT, p73KO, p53KO y DKO. Imagen de la tinción en las placas (tamaño 1X) y detalle mediante microscopía de contraste de fases (objetivo: 5X) de las colonias formadas durante el proceso de reprogramación. **B)** Recuento del número de colonias WT, p73KO, p53KO y DKO, con actividad fosfatasa alcalina a los 17 y 22 días desde la inducción de los factores OSK con doxiciclina. Los datos representan la media  $\pm$  SEM; los experimentos se realizaron, al menos, con tres MEFs de distintos embriones por genotipo, dos experimentos independientes, por duplicado. Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante la prueba t de Student: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

#### 1.1.4 Análisis de la activación compensatoria de p53 en ausencia de p73

En diversos tipos celulares, la falta de la isoforma dominante negativa,  $\Delta Np73$ , puede resultar en una activación compensatoria de p53, resultando ésta en una disminución de la tasa de proliferación celular, en un incremento en los niveles basales de apoptosis o, incluso, en la senescencia prematura de los fibroblastos (Gonzalez-Cano *et al.*, 2010; Talos *et al.*, 2007). Es posible, por ello, que en células carentes de p73 se estuviese induciendo p53 y, por tanto, incrementándose las barreras de reprogramación. Puesto que  $p21^{CIP1}$  y  $miR-34a$ , dos dianas transcripcionales de p53, actúan como represores durante el proceso de reprogramación celular (Chang *et al.*, 2007; Choi *et al.*, 2011; Hong *et al.*, 2009; Kawamura *et al.*, 2009), se decidió analizar los niveles de expresión de  $p21^{CIP1}$  y del transcrito primario de  $miR-34a$ ,  $pri-miR-34a$ , en MEFs y durante el proceso de reprogramación celular.

Como se observa en la Figura 29.A (paneles izquierdos), no se detectaron diferencias significativas en los niveles de expresión de  $p21^{CIP1}$  o  $pri-miR-34a$ , entre MEFs WT y p73KO. La falta de p53 sí resulta en una disminución en los niveles de expresión en ambos genes respecto a WT (Figura 29.A). Sin embargo, la eliminación de p73, en el contexto de p53KO, no afecta significativamente estos niveles (Figura 29.A, paneles derechos).



**Figura 29. La función de p73 se encuentra aguas abajo de p21 y miR-34a.** Cuantificación de los niveles de expresión de  $p21^{CIP1}$  y  $pri-miR-34a$  mediante qRT-PCR en **A)** MEFs WT, p73KO, p53KO y DKO y **B)** líneas celulares iPSCs WT, p73KO, p53KO y DKO a los 7 días de la inducción de la expresión de los factores OSKM. Se representan los niveles absolutos. Los datos representan la media  $\pm$  SEM; los experimentos se realizaron, al menos, con tres clones por genotipo, dos experimentos independientes, por triplicado; las diferencias estadísticas se evaluaron mediante la prueba t de Student: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

Se ha descrito que, durante el proceso de reprogramación, la expresión de los factores OSKM induce transitoriamente la expresión de p53, lo cual a su vez induce la expresión de *p21<sup>CIP1</sup>* y *miR-34a*, que actúan como barreras transitorias del proceso de reprogramación aguas abajo de p53 (Choi *et al.*, 2011). En nuestros experimentos, en consonancia con lo previamente publicado, detectamos un incremento de la expresión de ambos factores a los 7 días de la inducción tanto en células WT como p73KO, indicando que, en este contexto, la falta de p73 no afecta la activación de estas barreras (Figura 29.B, paneles izquierdos). Tras la inducción de la reprogramación, en las células carentes de p53 (p53KO y DKO) los niveles de ambas dianas permanecen muy por debajo de los niveles de células detectados en células WT y/o p73KO (Figura 29.B). Estos resultados ponen de manifiesto que la falta de p73 no incrementa la actividad de p53, ni la activación de *p21<sup>CIP1</sup>* o *miR-34a* p21 durante la reprogramación. Por lo tanto, la baja eficiencia de reprogramación no puede ser explicada por un incremento en la actividad "barrera" de p53.

En resumen, los resultados expuestos hasta el momento demuestran que p73 es un factor positivo necesario para la eficiencia del proceso de reprogramación de MEFs. Nuestros datos indican que la función de p73 es independiente de p53 y se encuentra aguas abajo de las barreras de reprogramación p53-dependientes, p21 y miR-34. Una vez establecido que p73 es necesario durante el proceso de reprogramación, se quiso determinar si la función de p73 era necesaria para el establecimiento y mantenimiento de la pluripotencia y auto-renovación de las iPSCs. Para ello, se establecieron y caracterizaron líneas celulares iPSCs WT, p73KO, p53KO y DKO.

## **1.2 Análisis de la falta de p73 en el establecimiento y mantenimiento de la auto-renovación y la pluripotencia de líneas celulares iPSCs WT, p73KO, p53KO y DKO.**

El proceso de reprogramación celular permite generar células iPSCs, equivalentes a las ESCs en morfología, capacidad de auto-renovación y pluripotencia. Por tanto, para determinar si p73 es dispensable para el mantenimiento de dichas características, se intentó establecer líneas celulares (clones) a partir de las colonias obtenidas tras el proceso de reprogramación de los cuatro genotipos, cultivándolas en ausencia de doxiciclina. Para demostrar si los clones obtenidos estaban realmente reprogramados y eran comparables a células ES, analizamos los parámetros que definen la capacidad de auto-renovación y pluripotencia, condiciones *sine qua non* de las células iPS.

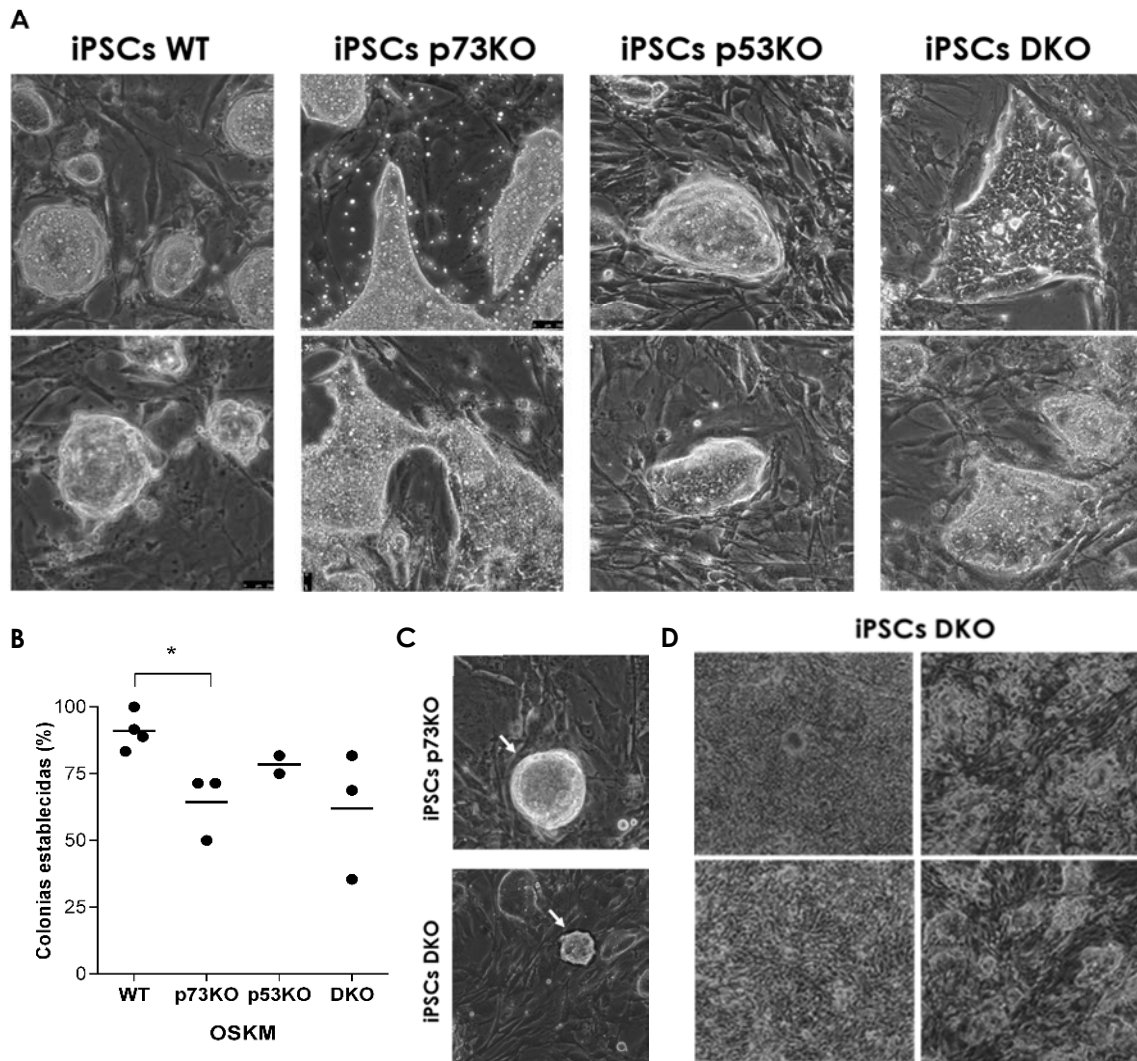


### 1.2.1 Evaluación morfológica y capacidad de auto-renovación

Las colonias de iPSCs se pueden distinguir y seleccionar en cultivo por ser morfológicamente semejantes a las de ESCs, con apariencia compacta, tridimensional, redondeada y de borde delimitado (Maherali and Hochedlinger, 2008; Meissner *et al.*, 2007). Por ello, en primer lugar, se seleccionaron, recogieron y cultivaron aquellas colonias que presentaban un tamaño y morfología adecuado y se procedió a expandir los cultivos en ausencia de doxiciclina.

Las colonias de iPSCs WT y p73KO se aislaron a partir del día 12, mientras que las colonias de iPSCs p53KO y DKO fueron recogidas a partir del día 8. En total se obtuvieron 43 colonias WT, 26 colonias p73KO, 23 colonias p53KO y 58 colonias DKO. Sorprendentemente, se observó que muchas de las colonias de iPSCs p73KO y DKO seleccionadas no eran capaces de mantenerse en cultivo después del segundo pase sin doxiciclina, confirmando que la función de p73 es necesaria en el proceso de reprogramación. La cuantificación del número de colonias recogidas, capaces de mantenerse en cultivo durante seis-siete pases (pase temprano) en ausencia de doxiciclina, respecto al número total aislado inicialmente, indicó que mientras el porcentaje de éxito de las colonias WT oscilaba en torno al 90%, en las p73KO sólo alcanzaba el 60%. El 80% de las colonias p53KO se establecieron en cultivo, pero la falta de p73 en este contexto tuvo como resultado una disminución del porcentaje de éxito de establecimiento hasta el 45% en las colonias DKO (Figura 30.B).

Como se ha comentado anteriormente, la morfología de las colonias iPSCs refleja el carácter indiferenciado y pluripotente de las células que conforman dicha colonia. Como se observa en la Figura 30.A, las colonias WT, al igual que las p53KO, presentaban la clásica morfología de colonias ESCs (Maherali and Hochedlinger, 2008; Meissner *et al.*, 2007) y, por extensión, característica de las iPSCs (Hong *et al.*, 2009; Kawamura *et al.*, 2009). Sin embargo, es importante resaltar que, tras los primeros pases en cultivo, las colonias de células carentes de p73 perdían esa morfología redondeada, brillante y compacta inicial, adquiriendo una morfología poligonal, y de apariencia mate (Figura 30.A). En algunos clones se observó que las colonias perdían la adherencia al sustrato, desprendiéndose de la capa de *feeders*, llegando a formar agregados en suspensión en el cultivo (Figura 30.C, flecha blanca).

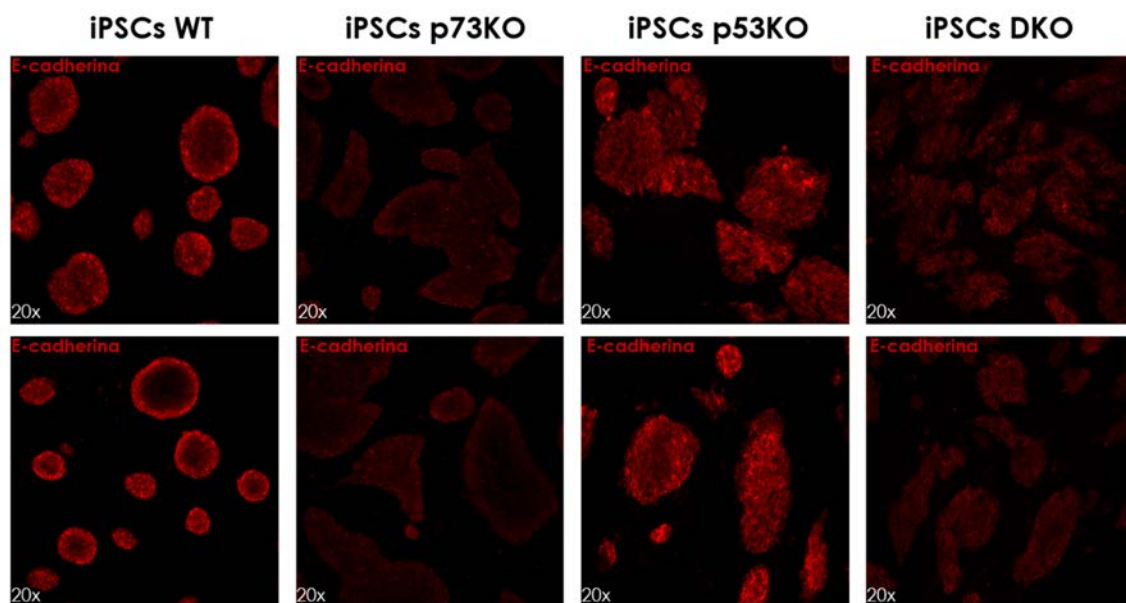


**Figura 30. La falta de p73 disminuye la eficiencia del establecimiento de líneas iPSCs y genera clones con una morfología alterada. A)** Morfología de las colonias de iPSCs WT, p73KO, p53KO y DKO en fase 17. Imágenes de microscopía de contraste de fases; objetivo: 20X. **B)** Porcentaje (%) de éxito de colonias iPSCs establecidas en cultivo. Los puntos representan la media del % de éxito de las colonias de distintos clones en cada genotipo. La raya negra horizontal representa la media del % de éxito para cada genotipo. Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante la prueba t de Student: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . **C)** Pérdida de la adherencia al sustrato de las colonias iPSCs p73KO y DKO. Las flechas blancas señalan la colonia iPSCs en suspensión. Imagen de microscopía de contraste de fases; objetivo: 20X **D)** Morfología de las colonias de iPSCs de DKO en fase tardías, fase 22. Imagen de microscopía de contraste de fases; objetivo 5X.

Sin embargo, es interesante destacar que, algunos de los clones DKO perdían la capacidad de formar colonias con morfología iPSCs en los pases más tardíos. Estas líneas formaban una monocapa compacta de células con capacidad de división ilimitada (Figura 30.D) que se asemejaba a la morfología celular dispersa observada en las ESCs carentes de *Cdh1* (Larue *et al.*, 1996), pudiendo sugerirnos que, los clones de iPSCs carentes de p73 podrían ser inestables.

Estas alteraciones en la morfología de las colonias de clones iPSCs p73KO y DKO generados podrían estar reflejando defectos en la capacidad de las células carentes

de p73 para establecer los contactos intercelulares necesarios para generar colonias compactas, así como en su capacidad de adherencia al sustrato. Se ha descrito que el establecimiento de uniones tipo *adherens*, mediado por E-cadherina, es fundamental para el mantenimiento de la pluripotencia y auto-renovación de las ESCs (Li *et al.*, 2010) y para mantener la morfología redonda y compacta de las colonias de ESCs murinas (Redmer *et al.*, 2011). Por ello, se decidió analizar la expresión de E-cadherina en los clones de células iPSCs (pase 22) de los cuatro genotipos. Como se puede observar en la Figura 31, la falta de p73, incluso en ausencia de p53, resulta en una reducción de los niveles de E-cadherina. Esto podría explicar la falta de adhesión y la formación de colonias poco compactas que pierden el fenotipo de ESC tras sucesivos pases.



**Figura 31. La falta de p73 afecta el establecimiento de contactos intercelulares generando colonias iPSCs con un fenotipo epitelial alterado.** Inmunofluorescencia para E-cadherina en las colonias de iPSCs WT, p73KO, p53KO y DKO en pase 22; objetivo: 20X.

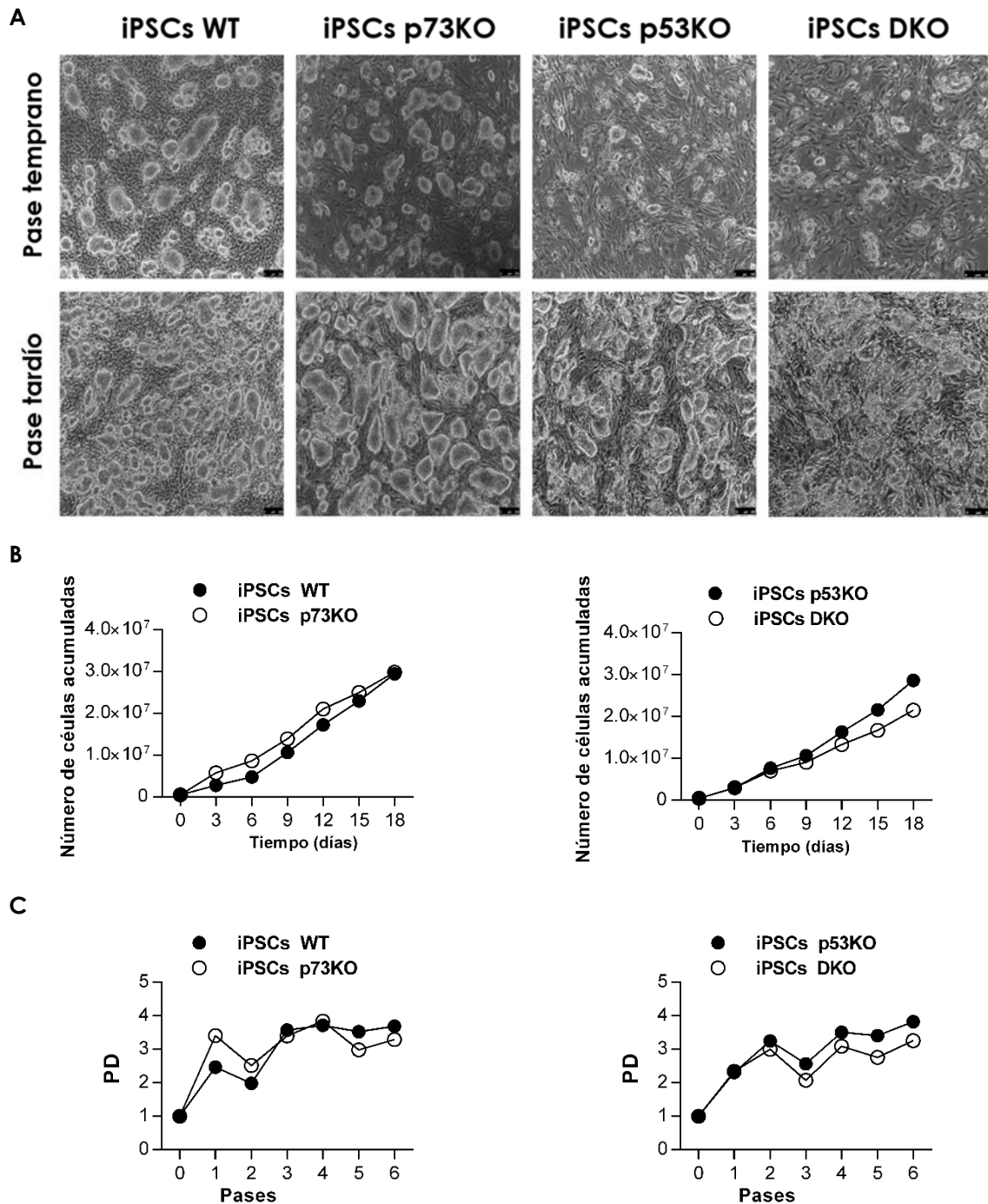
La morfología irregular observada en las colonias iPSCs carentes de p73, así como los bajos niveles de expresión de E-cadherina, podrían indicarnos que estas iPSCs no son capaces de alcanzar el estado completo de pluripotencia *naive*. Teniendo en cuenta que se han descritos diversos estados de pluripotencia durante el desarrollo (Jun Wu and Juan Carlos Izpisua Belmonte 2015), estas alteraciones morfológicas podrían hacernos pensar que se encuentran en un estado de pluripotencia alternativo distinto al estado *naive*.

Uno de ellos es el estado *primed*, característico de las EpiSCs (Nichols and Smith, 2009). Estas células tienen una morfología de colonia más plana e irregular (Nichols and Smith, 2009, De los Angeles 2012, Tim Pieters 2014) que difieren de la clásica morfología

redonda de borde delimitado de las ESCs (Maherali and Hochedlinger, 2008; Meissner *et al.*, 2007), además, presentan bajos niveles de E-cadherina. De hecho, se publicó que la expresión de E-cadherina es esencial para prevenir la conversión de las ESCs a EpiSCs murinas (Tim Pieters 2014). Por ello, ya que las iPSCs carentes de p73 presentan características similares, podríamos pensar que se encuentran en un estado alternativo *primed*, sin embargo, estas células también muestran características de célula ESC *naive*, como son altos niveles de expresión de fosfatasa alcalina y dependencia de LIF (Ying QL 2003).

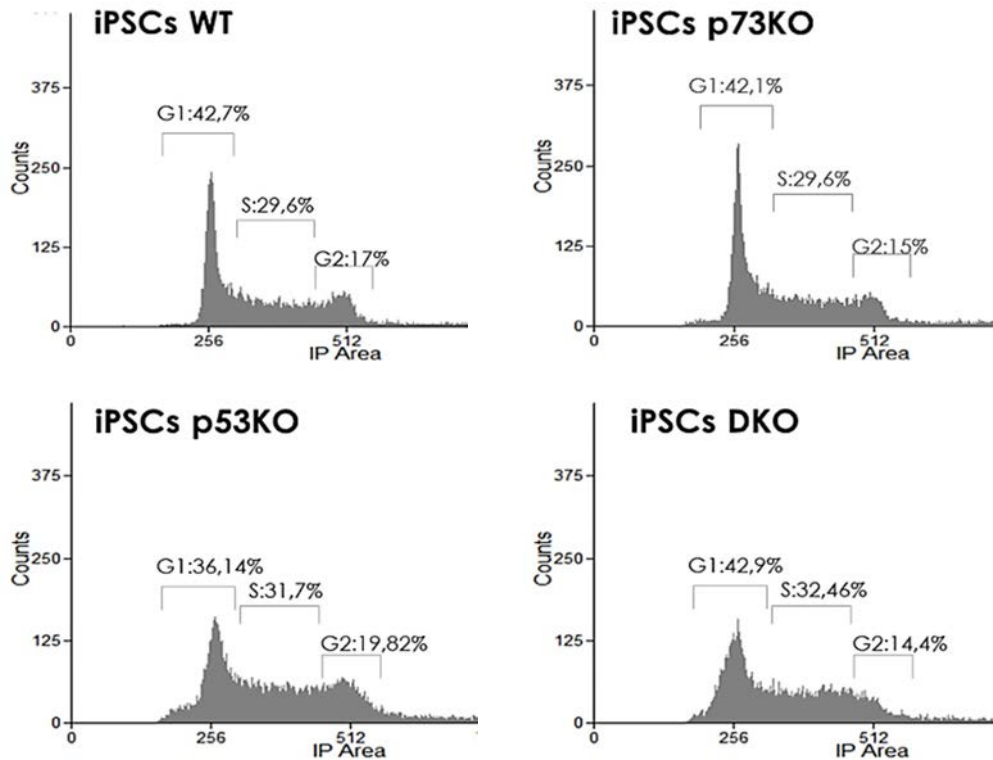
Por otra parte, se publicó recientemente que a mayores de estos dos estados de pluripotencia, *naive* y *primed*, la generación de iPSCs en cultivo puede dar lugar a otros estados alternativos *in vitro*, como es el caso del estado de pluripotencia *Fuzzy* (Jun WU & Izpisua 2014). Tonge y colaboradores identificaron las células de la clase F como un tipo celular pluripotente, distinto al de las ESCs y EpiSCs, que presentan una morfología de colonia inusual y dispersa como consecuencia de su baja adhesividad asociada a bajos niveles de E-cadherina (Tonge). Por ello, estas características anteriormente descritas de iPSCs carentes de p73, a nivel de morfología y niveles de expresión de E-cadherina, podrían indicarnos que las iPSCs carentes de p73 se encuentran en el estado pluripotente *Fuzzy*, no obstante, estas células F requieren de la expresión continuada de los factores de reprogramación para que su estado pluripotente se mantenga *in vitro* y, además, se caracterizan por presentar niveles de expresión de NANOG altos, pero como veremos más adelante, los clones carentes de p73 son independientes de la expresión de los transgenes y presentan niveles de expresión de *Nanog* bajos en cultivo. Por ello, en su conjunto, estos hechos nos indican que son necesarios más análisis para determinar el estado de pluripotencia en el que se encuentran las iPSCs carentes de p73.

Para determinar si la función de p73 es necesaria para el mantenimiento de la capacidad de auto-renovación, los clones se mantuvieron en cultivo durante pases sucesivos (Figura 32.A) y se realizaron curvas de crecimiento acumulativas con células de pases tardíos (pase 20-22), durante al menos 6 pases (Figura 32.B). Se observó que, en los cuatro genotipos, a partir del pase 3-4 se estabiliza el crecimiento del cultivo, siendo las duplicaciones poblacionales (PD) aproximadamente de 3, a partir de lo cual no se detectaron diferencias significativas en los PD de los distintos pases (Figura 32.C). También se realizaron análisis de los perfiles del ciclo celular en las líneas celulares de los cuatro genotipos, mediante tinción con ioduro de propidio y citometría de flujo (Figura 32.D).



**Figura 32. La falta de p73 no impide la generación de clones iPSCs con capacidad de auto-renovación. A)** Apariencia de las colonias de iPSCs WT, p73KO, p53KO y DKO en pases tempranos (pases 6-7) y en pases tardíos (pases 20-22). Imágenes de microscopía de contraste de fases; objetivo 5X. **B).** Curva de crecimiento acumulativa y **(C)** duplicaciones poblacionales de iPSCs WT, p73KO, p53KO y DKO a partir de células en un pase tardío (pase 20).

D



**Figura 32'. La falta de p73 no impide la generación de clones iPSCs con capacidad de auto-renovación. D)** Análisis mediante citometría de flujo del ciclo celular de las células iPSCs WT, p73KO, p53KO y DKO en fase tardía marcadas con yoduro de propidio,

No se encontraron diferencias significativas en la tasa de proliferación celular, indicada por el porcentaje de células en fase S, entre las iPSCs WT y p73KO. Sin embargo, en las iPSCs p53KO y DKO, presentaban un porcentaje más elevado de células en la fase S con respecto a células WT o p73KO, pero similar entre ellas, indicando que la presencia o ausencia de p73 no parece estar afectando la progresión del ciclo celular (Figura 32.D).

En resumen, la falta de p73 no impide la generación de células con capacidad de auto-renovación.

### 1.2.2 Evaluación de la capacidad de pluripotencia *in vivo* e *in vitro*

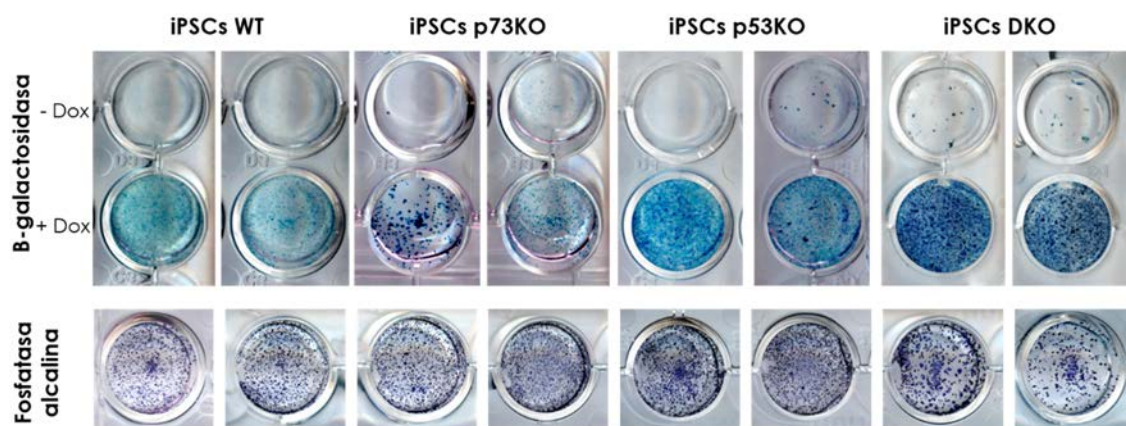
La determinación de la pluripotencia de las colonias iPSCs únicamente en base a criterios morfológicos y de presencia de actividad fosfatasa alcalina resulta insuficiente por lo que es necesario un análisis sistemático de las iPSCs seleccionadas para asegurar que cumplen los criterios de pluripotencia y capacidad de auto-renovación ilimitada (Maherali and Hochedlinger, 2008). En el apartado anterior analizamos la morfología y capacidad de auto-renovación de los clones generados. En este apartado se analiza

la expresión de marcadores de pluripotencia, así como la capacidad de diferenciación *in vitro* e *in vivo*.

### A) Expresión de los marcadores de pluripotencia: NANOG y SSEA-1

La reprogramación completa de las células para la derivación de líneas iPSCs pluripotentes requiere la activación de la expresión endógena de los genes reguladores de pluripotencia en las iPSCs y el silenciamiento eficiente de los transgenes OSKM introducidos en las células (Stadtfeld *et al.*, 2008a).

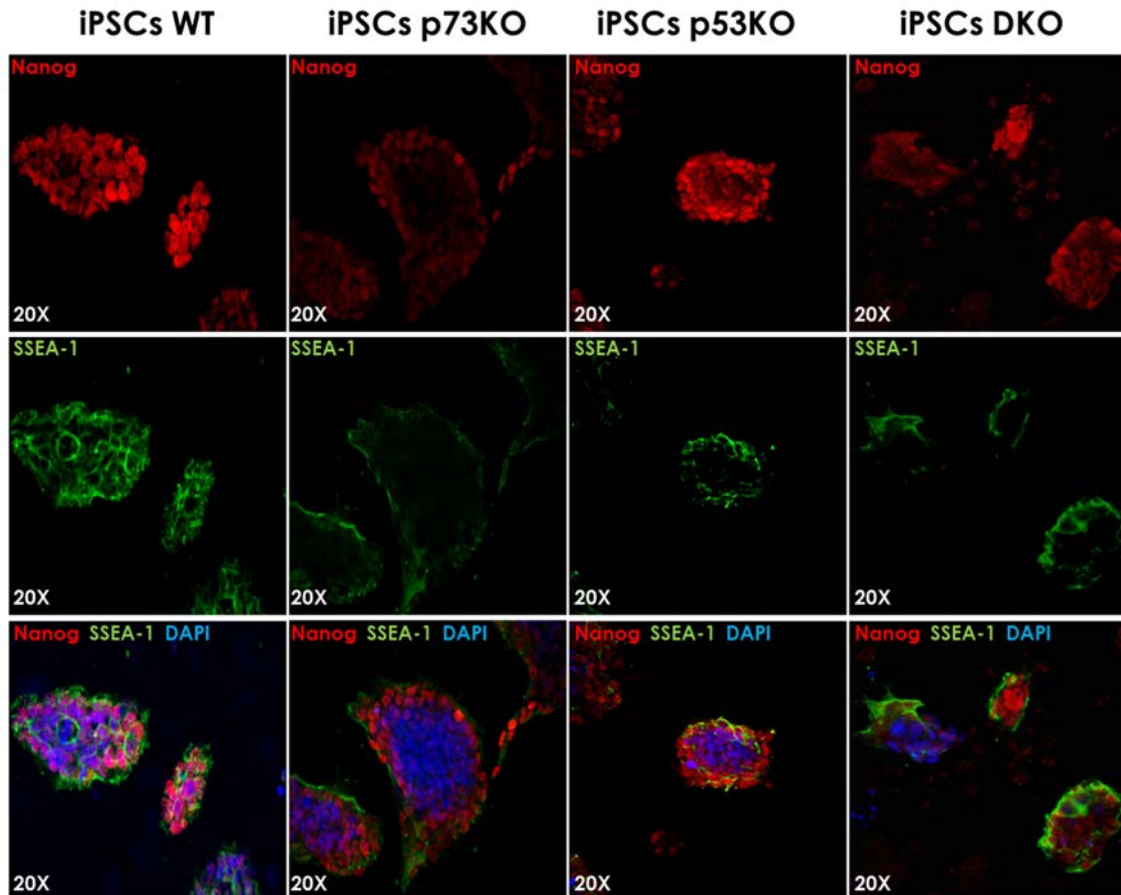
Para demostrar el silenciamiento de la expresión de los transgenes en las líneas establecidas, se analizó la expresión del gen indicador *LacZ* incluido en el transposón, realizando una tinción de actividad  $\beta$ -gal en presencia y ausencia de doxiciclina. Como se observa en la Figura 33, no se detectó actividad  $\beta$ -galactosidasa en ausencia de doxiciclina, indicando la no expresión de los transgenes, sin embargo, las colonias eran células AP<sup>+</sup>, marcando el estado de pluripotencia. Por ello podemos concluir que, en los clones generados, la pluripotencia era independiente de la expresión de los transgenes OSKM.



**Figura 33. Los clones iPSCs establecidos presentan actividad fosfatasa alcalina y no expresan  $\beta$ -galactosidasa en ausencia de doxiciclina. A)** Actividad  $\beta$ -galactosidasa en presencia (+ Dox) o ausencia (- Dox) de doxiciclina en clones iPSCs WT, p73KO, p53KO y DKO (pase 17). **B)** Actividad fosfatasa alcalina en ausencia de doxiciclina en clones iPSCs WT, p73KO, p53KO y DKO. Los ensayos de actividad AP y  $\beta$ -gal se realizaron al menos en seis clones de cada genotipo.

La expresión de los marcadores moleculares de pluripotencia, como NANOG y SSEA-1 (Martí *et al.*, 2013; Meissner *et al.*, 2007), indicó que mientras los cultivos de iPSCs WT y p53KO expresaron NANOG en el núcleo y SSEA-1 en la membrana celular, las células carentes de p73 presentaban menores niveles de expresión de ambos marcadores (Figura 34). Además, las células carentes de p73 tendían a extender pseudopodios y a migrar hacia afuera de la colonia, confiriendo a las colonias una

morfología irregular y poligonal. Conviene subrayar que, en los pases sucesivos, los dobles mutantes DKO perdieron progresivamente la expresión de los marcadores de pluripotencia, pudiendo indicar que estos clones en pases tardíos podrían ser más propensos a la diferenciación, ya que existe una estrecha relación entre la pérdida de la pluripotencia y la inducción de la diferenciación celular (Theunissen and Silva, 2011).



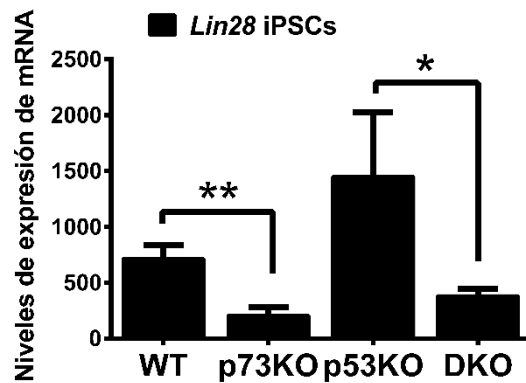
**Figura 34. La falta de p73 disminuye la expresión de los marcadores de pluripotencia NANOG y SSEA-1.** Inmunofluorescencia indirecta para la detección de/ NANOG (en rojo) y SSEA-1 (en verde) en las colonias de iPSCs WT, p73KO, p53KO y DKO (pase 17). Los núcleos se visualizaron con DAPI (azul); objetivo: 20X. Los marcadores se analizaron al menos en tres clones de cada genotipo.

Asimismo, teniendo en cuenta que la activación de la expresión de *Nanog* durante la reprogramación es imprescindible para la maduración de las iPSCs (Silva *et al.*, 2009), pero no para la adquisición del fenotipo reprogramado (Schwarz *et al.*, 2014), los resultados obtenidos podrían estar sugiriendo que p73 es necesario para obtener clones estables y alcanzar una reprogramación completa. En esta línea, se ha descrito que el silenciamiento de la expresión de NANOG induce la diferenciación celular, evitando alcanzar un estado pluripotente total (Lin *et al.*, 2005), por lo que la reducida expresión de NANOG en los clones de iPSCs p73KO y DKO podría estar generando clones más predispuestos a la diferenciación, incluso en ausencia de p53.



A fin de tener una visión más clara de si p73 es necesario para la obtención de clones estables, se decidió analizar la expresión de *Lin28* en los clones de los cuatro genotipos. *Lin28* es un factor que se expresa en altos niveles en las ESCs de ratón y se reprime durante la diferenciación celular (Yang and Moss, 2003; Yokoyama *et al.*, 2008), siendo además necesario para obtener clones totalmente reprogramados y estables (Tanabe *et al.*, 2013). En ausencia de p73, los niveles de expresión de *Lin28* disminuían respecto a las iPSCs WT y p53KO (Figura 35), indicando que p73 es necesario para mantener altos niveles de *Lin28* en iPSCs, incluso en ausencia de p53, y, por ende, para la obtención de clones estables, generando su falta clones predispuestos a la diferenciación.

Estos datos indican que p73 es necesario para la obtención de células iPSCs totalmente reprogramadas y para la adquisición del estado pluripotente en los clones, apoyando la idea de que la falta de p73 podría estar generando clones predispuestos a la diferenciación. No obstante, será necesario analizar la expresión de marcadores celulares específicos de las ESCs como *Pecam1*, *Fbxo15*, *Rex1*, *Dppa4*, *Dppa5*, *Gdf3* y *Utf1* (Araki *et al.*, 2010; Hansson *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2010; Polo *et al.*, 2012; Samavarchi-Tehrani *et al.*, 2010), para poder determinar este punto. Además, analizar la expresión endógena de *Oct4* y *Sox2*, ya que junto con *Nanog*, forman la red transcripcional de la pluripotencia (Buganim *et al.*, 2012).



**Figura 35. La falta de p73 disminuye los niveles de *Lin28* en los clones iPSCs.** Cuantificación de los niveles de expresión de mRNA de *Lin28* mediante qRT-PCR en los clones iPSCs WT, p73KO, p53KO y DKO. Los datos representan la media  $\pm$  SEM;  $n \geq 3$ , los experimentos se repitieron al menos tres veces por duplicado; las diferencias estadísticas se evaluaron mediante la prueba t de Student: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

## B) Pluripotencia *in vitro*: diferenciación a partir de cuerpos embrioides

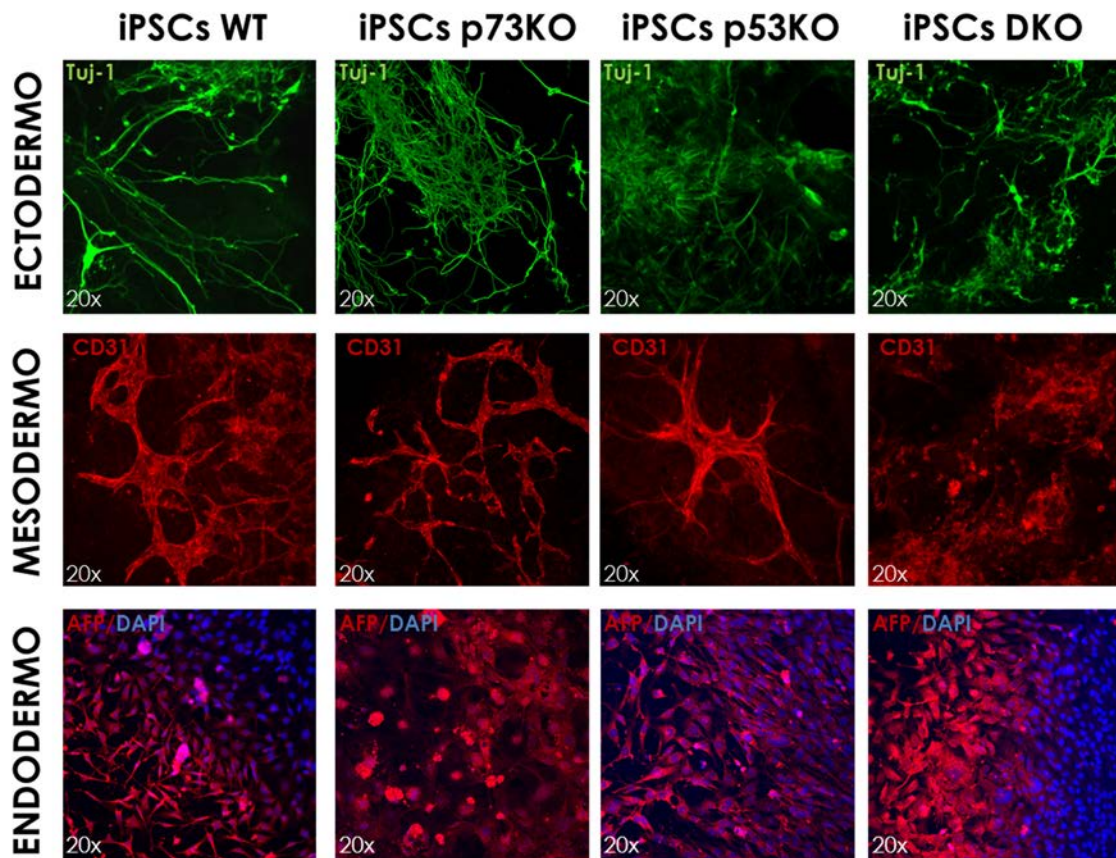
Para determinar si la reprogramación ha tenido lugar correctamente y se han obtenido células con características de ESCs, se debe demostrar la capacidad de dichas células para generar células diferenciadas de las tres capas germinales. Se llevó a cabo un protocolo de diferenciación de las iPSCs de los cuatro genotipos mediante la formación de cuerpos embrioides.

Como se indica en el apartado 4.5.1 de Materiales y Métodos, los EBs se generaron por el método de gota colgante (Doetschman *et al.*, 1985; Kurosawa, 2007; Wang and Yang, 2008), y se cultivaron en ausencia de LIF para inducir la diferenciación hacia las tres capas germinales. En estos cultivos aparecieron, progresivamente, precursores celulares de diferentes linajes que posteriormente se diferenciaron dando lugar a distintos tipos celulares, como cardiomiocitos, células endoteliales o neuronas, entre otros.

La naturaleza de las células diferenciadas se analizó mediante inmunofluorescencia, utilizando anticuerpos contra marcadores moleculares específicos:  $\beta$ III tubulina (Tuj-1), específico de neuronas, para identificar las células del linaje ectodérmico, CD31 para las células de origen mesodérmico, y alfa feto proteína (AFP), para marcar endodermo.

Utilizando este protocolo de diferenciación, las iPSCs de los cuatro genotipos, generaron células de las tres capas germinales, mostrando pluripotencia *in vitro* (Figura 36). Sin embargo, a diferencia de las células WT, pero semejante al efecto conocido de la falta de p53 (Billon *et al.*, 2004), las células carentes de p73 presentaron una mayor proporción de células con diferenciación neural (Figura 36). Esta observación es consistente con datos publicados previamente por nuestro grupo de investigación, en los cuales se cuantificó que la ausencia de p73 aceleraba e incrementaba la diferenciación neural en cultivos de células neurales troncales (Armesilla-Diaz *et al.*, 2009; Gonzalez-Cano *et al.*, 2010; Meletis *et al.*, 2006).

Las células de los cuatro genotipos expresaban el marcador de estirpe mesodérmica CD31 (Figura 36). Sin embargo, la observación microscópica reveló que, mientras las iPSCs WT y p53KO generaban células CD31<sup>+</sup> capaces de organizarse para formar estructuras de morfología reticular características de la morfogénesis vascular (Vittet *et al.*, 1996), las iPSCs carentes de p73 originaban células que, aun siendo CD31<sup>+</sup>, no eran capaces de formar estructuras definidas (Figura 36).



**Figura 36. Las iPSCs carentes de p73 pueden generar células de las tres capas germinales *in vitro*.** Análisis de la expresión de marcadores de diferenciación en iPSCs WT, p73KO, p53KO y DKO (pase 17) a los 15 días desde la inducción de la diferenciación a ectodermo (Tuj-1), mesodermo (CD31) y endodermo (AFP). Inmunofluorescencia indirecta utilizando anticuerpos conjugados contra Tuj-1 (verde), CD31 y AFP (rojo). Los núcleos se visualizaron con DAPI (azul); objetivo: 20X. La pluripotencia *in vitro* se analizó al menos en tres clones de cada genotipo.

Estos datos confirman la hipótesis planteada en estudios de inhibición funcional de p73 (Tesis doctoral de la Dra. Rosalía Fernández-Alonso), que sugieren que la función de p73 puede ser necesaria para la diferenciación funcional de las células endoteliales y/o la morfogénesis vascular, lo cual será estudiado en el objetivo 3.

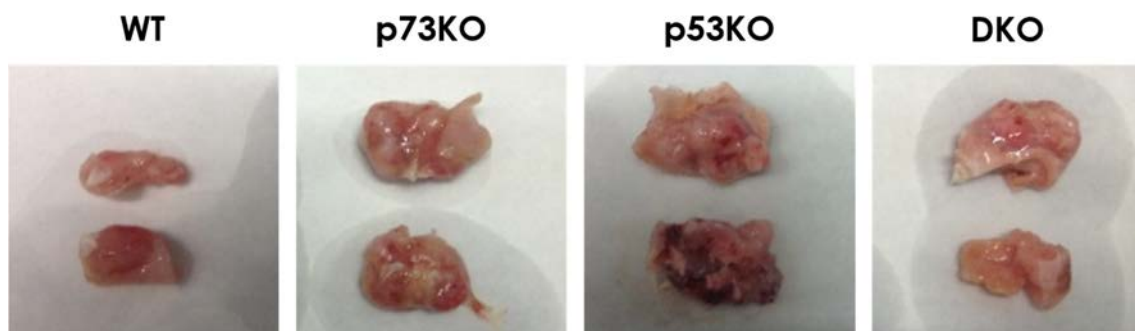
### C) Pluripotencia *in vivo*: formación de teratomas

Una de las características fundamentales de las iPSCs es su capacidad de formar tumores benignos que presentan células de las tres capas germinales, denominados teratomas, cuando son inyectados en ratones inmunosuprimidos (Nelakanti *et al.*, 2015; Solter, 2006). Por tanto, analizamos la capacidad de pluripotencia *in vivo*, mediante este ensayo.

El ensayo de formación de teratomas fue llevado a cabo en colaboración con el grupo del Dr. Pablo Menéndez Buján, del Instituto de Investigación contra la Leucemia

Josep Carreras (Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona). Para la generación de los tumores se inyectaron subcutáneamente un número comparable de células iPSCs de cada uno de los cuatro genotipos en el costado dorsal de ratones NSG. Para las inyecciones, se utilizaron células procedentes de: tres clones iPSCs WT que fueron inyectados en seis ratones, seis clones iPSCs p73KO que fueron inyectados en diez ratones, dos clones iPSCs p53KO que fueron inyectados en tres ratones, y tres clones iPSCs DKO que se inyectaron en cuatro ratones.

En los cuatro genotipos se obtuvieron tumores palpables a las dos semanas de la inyección, los cuales se extrajeron a las tres semanas. El análisis macroscópico reveló que, mientras los teratomas WT presentaban el tamaño y aspecto habitual en este tipo de experimentos, los generados por las células p73KO, p53KO y DKO mostraban aspecto de posibles teratocarcinomas (Figura 37).

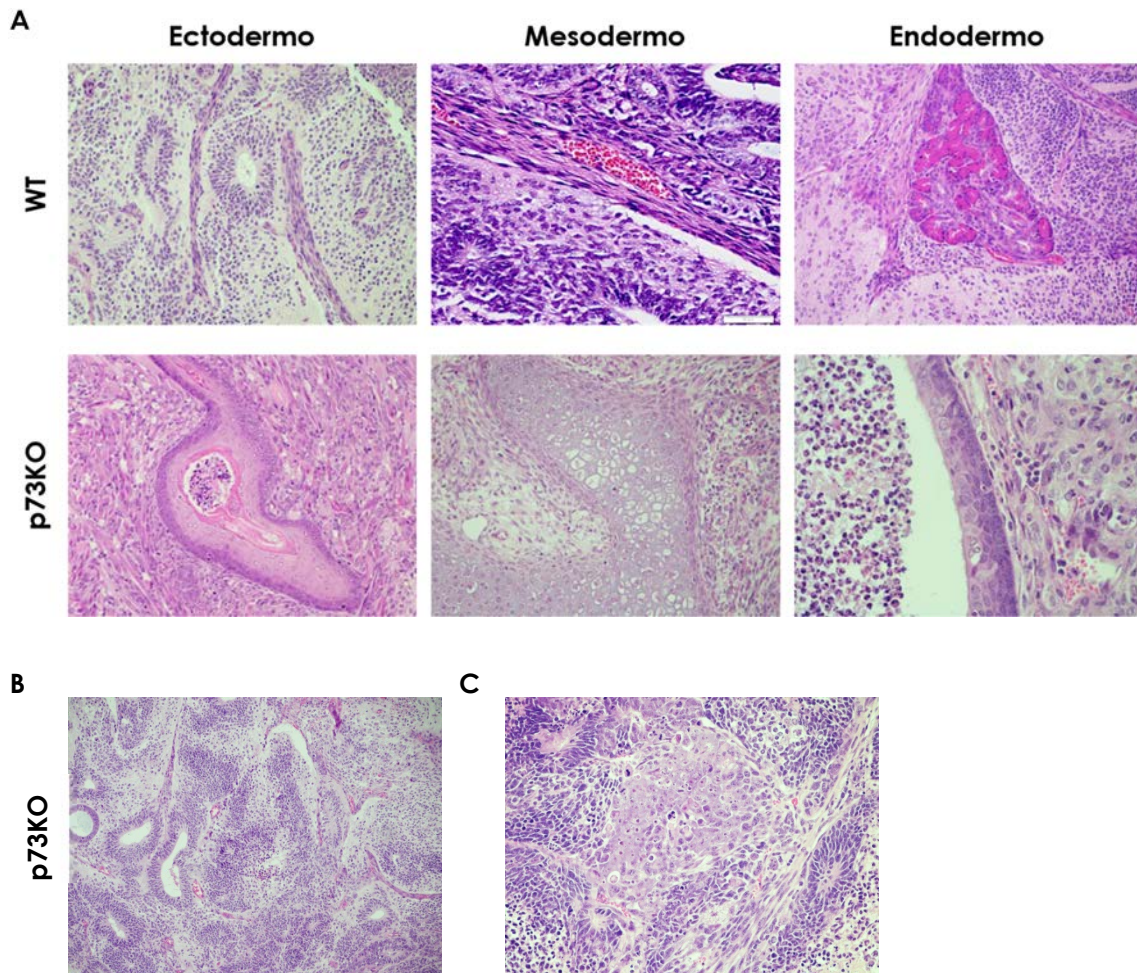


**Figura 37. Los teratomas derivados de iPSCs p73KO, p53KO y DKO muestran aspecto de posible teratocarcinoma.** Representación macroscópica de teratomas derivados de iPSCs WT, p73KO, p53KO y DKO en pase 17. Las imágenes de cada genotipo corresponden a un clon iPSCs inyectado en dos ratones

Los tumores obtenidos fueron fijados y enviados a la empresa Althia Health SL (Madrid) para el estudio histopatológico. El análisis de los cortes histológicos con tinción de hematoxilina-eosina indicó que los tumores WT presentaban células de las tres capas germinales sin indicio de malignidad, siendo por tanto teratomas (Hong *et al.*, 2009; Kawamura *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2009a; Marion *et al.*, 2009; Utikal *et al.*, 2009b). Se observaron abundantes elementos de neuro-ectodermo primitivo, alguno ciliado, así como epitelio glandular (endodermo) (Figura 38.A). La diferenciación mesodérmica se vio representada por la presencia de vasos sanguíneos, sin embargo, en los cortes analizados no se detectó ni cartílago ni hueso (Figura 38.A).

Las células iPSCs p73KO formaron tumores benignos (teratomas) con estructuras características de ectodermo, mesodermo y endodermo, subrayando la capacidad de pluripotencia *in vivo* en ausencia de p73 (Figura 38.A). Los teratomas p73KO presentaban una mayor representación de estructuras diferenciadas que los WT, especialmente diferenciación neural, recapitulando lo observado en la diferenciación *in vitro* y

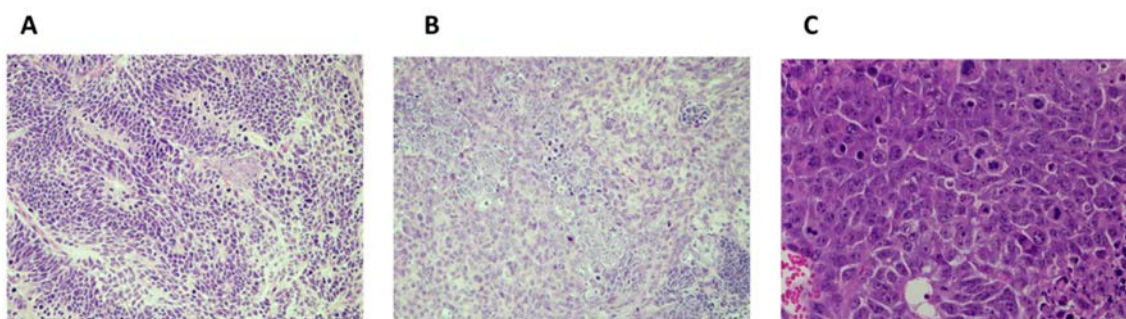
confirmando la función reguladora de p73 en el proceso de diferenciación neuronal (Figura 38.B). Es interesante resaltar que los teratomas p73KO solo presentan pequeños focos de transformación maligna a carcinoma, los cuales representaban aproximadamente el 1% del tumor (Figura 38.C).



**Figura 38. Las células iPSCs WT y p73KO forman teratomas con estructuras características de ectodermo, mesodermo y endodermo.** Se muestran las secciones representativas de **A)** ectodermo, mesodermo y endodermo en teratomas derivados de iPSCs WT y p73KO marcados con hematoxilina-eosina; **B)** diferenciación neural en teratoma derivado de iPSCs p73KO y **C)** pequeños focos de transformación maligna a carcinoma en teratoma derivado de iPSCs p73KO. Objetivo: 20X.

Se ha descrito previamente que líneas iPSCs carentes de p53 con pluripotencia *in vitro*, forman tumores malignos invasivos cuando son inyectados subcutáneamente en ratones inmunocomprometidos, en lugar de teratomas benignos (Sarig *et al.*, 2010), resaltando la función de supresión tumoral de p53. Además, estos resultados subrayan la importancia del microambiente sobre el comportamiento celular, en este caso *in vitro* versus *in vivo*. En concordancia con esto, nuestras líneas iPSCs p53KO formaron tumores malignos (teratocarcinomas) muy poco diferenciados, probablemente carcinoma embrionario, con abundante neuroepitelio primitivo (Figura 39.A) y focos de

transformación sarcomatosa (Figura 39.B). Confirmando su carácter transformado, las células presentaron polimorfismo nuclear y se detectaron múltiples figuras mitóticas (Figura 39.C). Además, se observó que los tumores generados presentaban gran invasividad hacia las estructuras normales circundantes.

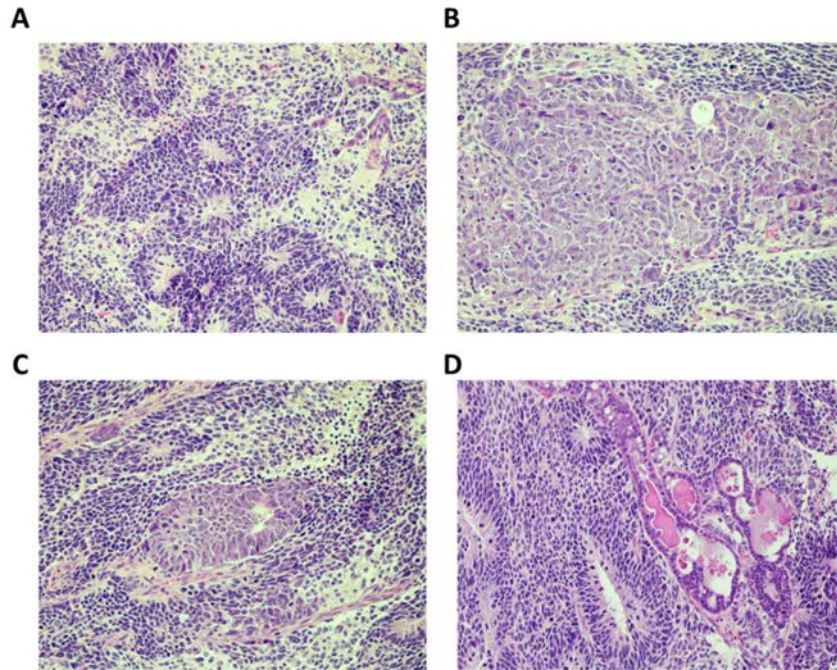


**Figura 39. Las células iPSCs p53KO forman teratocarcinomas muy poco diferenciados.** Sección representativa de carcinoma embrionario con **A)** abundante neuroepitelio primitivo, **B)** focos de transformación sarcomatosa y **C)** polimorfismo nuclear y múltiples figuras mitóticas; objetivo: 20X.

Las iPSCs DKO presentaron un comportamiento semejante a las iPSCs p53KO, ya que a pesar de que tienen capacidad de pluripotencia *in vitro*, formaron tumores compuestos mayoritariamente, aunque en menor grado que en p53KO, por neuroectodermo primitivo, con poca evidencia de células de las demás capas germinales (Figura 40.A). Es interesante resaltar que estos tumores (Figura 40.B y 40.C), mayoritariamente carcinomas y, ocasionalmente, sarcomas, presentan zonas con mayor diferenciación, encontrándose estructuras maduras (Figura 40. D).

Esto es consistente con la hipótesis de que las líneas celulares de iPSCs carentes de p73 son más propensas a diferenciarse. Este mayor grado de diferenciación se refleja en un menor grado de transformación maligna, lo cual parece contradictorio con la función de supresión tumoral de p73, especialmente las isoformas TAp73 (Tomasini *et al.*, 2008). Caben al menos dos posibles explicaciones; por un lado, es posible que al eliminar tanto las isoformas supresoras tumorales (TA) como las pro-oncogénicas ( $\Delta N$ ), estemos viendo el efecto de la falta de estas últimas en la transformación tumoral. En este sentido, nuestro grupo ha publicado que las isoformas  $\Delta Np73$  son necesarias para el establecimiento y mantenimiento de la angiogénesis tumoral, lo cual podría afectar el grado de malignidad del tumor ((Fernandez-Alonso *et al.*, 2015) y objetivo 2). Sin embargo, también se ha descrito que, en determinados contextos celulares, como células progenitoras con capacidad de multipotencia, la falta de TAp73 altera la regulación de divisiones simétricas versus asimétricas, incrementando las divisiones asimétricas, lo cual tiene como resultado la diferenciación prematura de dichas células (Gonzalez-Cano *et al.*, 2010; Gonzalez-Cano *et al.*, 2013). Es por tanto posible que, en células iPSCs, la falta de p73 induzca una mayor diferenciación, lo cual frene la

malignidad de los tumores obtenidos. Este efecto, de confirmarse, podría tener una importancia terapéutica en tumores cuyo origen son células troncales, como los gliomas, y que carecen de p53. Por tanto, es un aspecto de esta Tesis Doctoral que deberá ser estudiado con más profundidad en el futuro.



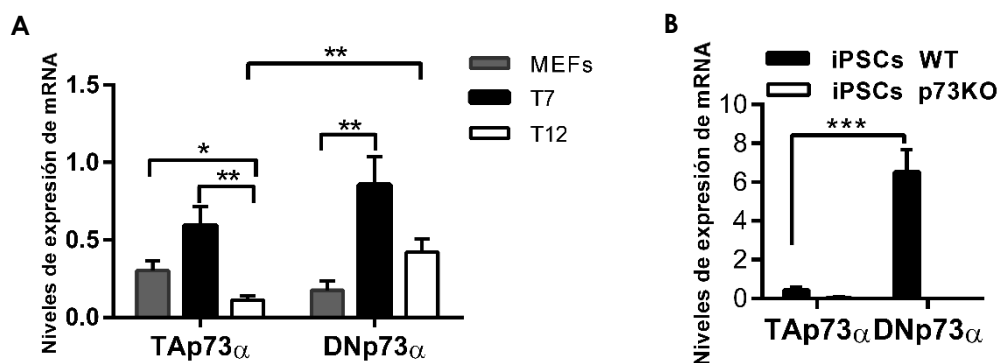
**Figura 40. Los teratomas de iPSCs DKO presentan estructuras muy diferenciadas.** Sección representativa de **A)** neuroectodermo, **B)** carcinoma, **C)** sarcoma y **D)** zonas con mayor diferenciación, estructuras maduras. Objetivo: 20X.

En conjunto, hemos generado y establecido líneas celulares iPSCs WT, p73KO, p53KO y DKO y demostrando que la falta de p73 genera clones iPSCs con capacidad de auto-renovación y pluripotencia *in vitro*, pero especialmente en el contexto de la falta de p53, inestables y con una capacidad de diferenciación alterada. Por tanto, podemos concluir que p73 es necesario, no solo para que el proceso de reprogramación se produzca eficientemente, sino también para obtener auténticas iPSCs, incluso en ausencia de p53.

## OBJETIVO 2. Identificar los mecanismos moleculares regulados por el gen *Trp73* durante el proceso de reprogramación celular

Una vez demostrado que la función de p73 es necesaria durante el proceso de reprogramación, decidimos determinar qué etapas o puntos del proceso estaban regulados por p73 y los mecanismos moleculares implicados.

El proceso de reprogramación celular ha sido descrito como un proceso de múltiples etapas secuenciales (iniciación, maduración y estabilización) mediado por factores de transcripción que inducen progresivamente la expresión de genes de pluripotencia (Li *et al.*, 2010; Samavarchi-Tehrani *et al.*, 2010). Es de esperar que, si p73 tiene alguna función en este proceso, su expresión esté regulada a lo largo del mismo. Por tanto, estudiamos mediante qRT-PCR la cinética de expresión de las isoformas del gen *Trp73*, TAp73 y  $\Delta$ Np73, durante el proceso de reprogramación celular de los MEFs WT. Como se muestra en la Figura 41.A, la expresión tanto de TAp73 como de  $\Delta$ Np73 se induce durante el proceso de reprogramación, detectándose niveles máximos a los 7 días después de la inducción de la expresión de los factores OSKM, tras lo cual los niveles de mRNA disminuyen. Todo esto sugiere que p73 desempeña su función desde las etapas iniciales del proceso de reprogramación. Es interesante resaltar que  $\Delta$ Np73 es la isoforma predominante en líneas estables de iPSCs WT, alcanzando en estas, mayores niveles de expresión que los encontrados durante el proceso de reprogramación (Figura 41.B).



**Figura 41. El gen *p73* se regula durante el proceso de reprogramación celular de MEFs WT, induciéndose ambas isoformas, pero siendo  $\Delta$ Np73 predominante.** Cuantificación de los niveles de expresión de mRNA de TAp73 y  $\Delta$ Np73 mediante qRT-PCR durante **A)** el proceso de reprogramación celular de MEFs WT a los 0, 7 y 12 días desde la inducción de la expresión de OSKM. **B)** en clones iPSCs WT y p73KO. Los datos representan la media  $\pm$  SEM; los experimentos se realizaron, al menos, con tres clones por genotipo, dos experimentos independientes, por triplicado; las diferencias estadísticas se evaluaron mediante la prueba t de Student: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

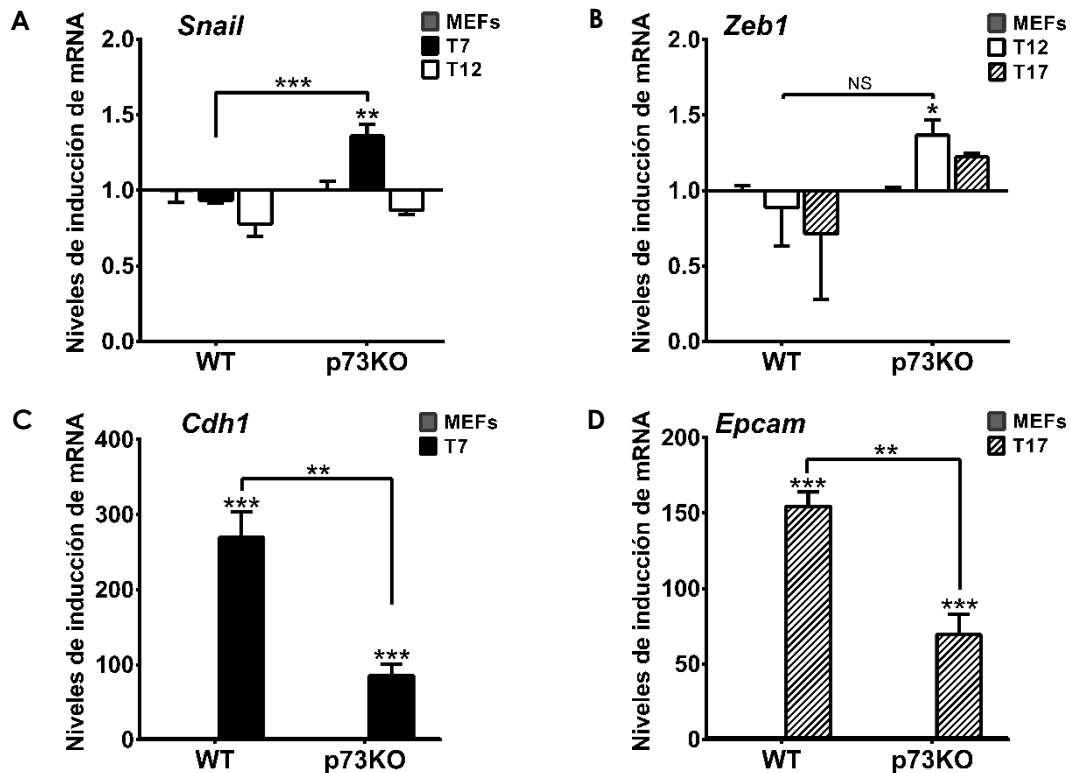


## 2.1 Análisis del efecto de la falta de p73 durante las etapas del proceso de reprogramación celular

Para poder determinar la función de p73 en el proceso de reprogramación celular realizamos un análisis comparativo, mediante qRT-PCR, de la cinética de expresión de marcadores característicos de las distintas fases durante el proceso de reprogramación celular de MEFs WT y p73KO. De acuerdo con los datos publicados (Li *et al.*, 2010; Samavarchi-Tehrani *et al.*, 2010), las fases de iniciación, maduración y estabilización corresponden aproximadamente con los días 7, 12 y 17, respectivamente, después de la inducción de la expresión de los factores OSKM en los MEFs WT, momentos en que se recogieron las muestras de RNA.

Uno de los primeros cambios que se detectan durante el proceso de reprogramación es la transformación morfológica de los fibroblastos, perdiendo su característica forma de huso, para empezar a formar agregados celulares apretados formados por células redondeadas, en un proceso que recapitula la transición mesénquima-epitelio (Li *et al.*, 2010). Es precisamente esta transición MET lo que marca la fase de iniciación (Li *et al.*, 2010; Samavarchi-Tehrani *et al.*, 2010). De acuerdo con lo publicado por estos autores, desde los primeros días de la reprogramación celular de los MEFs WT se apreció una disminución de la expresión de los marcadores mesenquimales *Snail* y *Zeb1*, que continuó disminuyendo durante el proceso (Figura 42.A y 42.B). Hay que tener en cuenta que la represión de la expresión de *Snail* detectada fue menor del 50%; esto puede estar asociado a la baja eficiencia del proceso de reprogramación, que hace que el cultivo celular sea heterogéneo, existiendo MEFs que no se reprograman junto con aquellos que se reprograman y forman colonias. En el caso de *Zeb1*, la disminución de la expresión también fue moderada y continua a lo largo del proceso (Figura 42.B). De manera concomitante, se detectó un fuerte incremento en la expresión de genes epiteliales como *Cdh1*, marcador epitelial por excelencia y necesario para el proceso de reprogramación celular (Figura 42.C) (Chen *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010; Samavarchi-Tehrani *et al.*, 2010).

Este patrón y cinética de represión transcripcional de genes mesenquimales y activación de genes epiteliales, es consistente con la transición mesénquima-epitelio que caracteriza la fase de iniciación (Samavarchi-Tehrani *et al.*, 2010). Este fenotipo epitelial se mantuvo a lo largo del proceso como refleja el incremento sostenido de la expresión del marcador epitelial *Epcam* a los 17 días de la reprogramación (Figura 42.D).

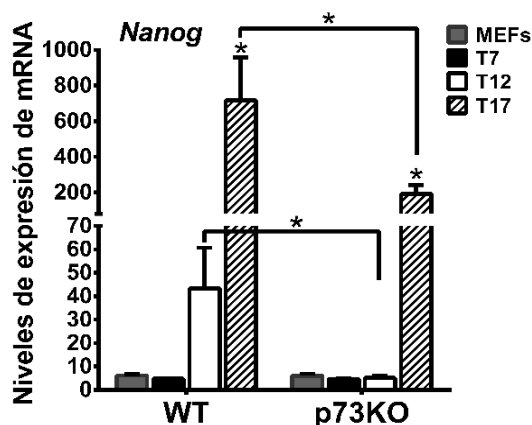


**Figura 42. La falta de p73 afecta la transición mesénquima-epitelio (MET).** Cuantificación de los niveles de expresión de mRNA de *Snail* (A), *Zeb1* (B), *Cdh1* (C) y *Epcam* (D), mediante qRT-PCR durante el proceso de reprogramación celular de MEFs WT y p73KO a los 0, 7, 12 y 17 días desde la inducción de OSKM. En cada caso se representan los niveles de mRNA relativos a la expresión de los MEFs (T=0). Los datos representan la media  $\pm$  SEM; los experimentos se realizaron, al menos, con tres clones por genotipo, dos experimentos independientes, por triplicado; las diferencias estadísticas se evaluaron mediante la prueba t de Student: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001. NS: no significativo.

Al analizar los patrones de expresión de estos marcadores durante la reprogramación de MEFs p73KO, observamos que en ausencia de p73, la transición mesénquima-epitelio estaba atenuada. Por un lado, la expresión de los reguladores mesenquimales, *Snail* y *Zeb1* (Figura 42.A y 42.B) se indujo significativamente en lugar de disminuir; por otro, la inducción de los marcadores epiteliales, *Cdh1* y *Epcam*, se vio significativamente reducida (Figura 42.D), indicando todo ello que la función de p73 es necesaria para que se lleve a cabo adecuadamente la transición MET durante la fase de iniciación.

Llama la atención que, en ausencia de p73, los niveles de *Snail* aumentaron significativamente durante los primeros días de la reprogramación (T7) para luego bajar bruscamente (T12) (Figura 42.A), sugiriendo que p73 podría ser un represor, directo o indirecto, de este factor de transcripción. Esta observación es consistente con datos publicados por Zhang y colaboradores, en los que se demuestra que la eliminación de TAp73, pero no  $\Delta$ Np73, resulta en un incremento de los niveles de expresión de *Snail*, *Slug* y *Twist*, con la concomitante disminución de *Cdh1* (Zhang *et al.*, 2012b).

La fase de iniciación está seguida por una fase intermedia de maduración considerada la fase de cuello de botella que limita la eficiencia del proceso (Tanabe *et al.*, 2013). Esta etapa está caracterizada por la expresión sostenida de *Nanog*. (Buganim *et al.*, 2012; David and Polo, 2014; Hawkins *et al.*, 2014). Durante la reprogramación celular de MEFs WT, la inducción de la expresión de *Nanog* comenzó después de la fase de iniciación (T12) y se mantuvo hasta el final del proceso. Sin embargo, las células carentes de p73 presentaron un retraso en la inducción de *Nanog*; la expresión no comenzó a incrementarse hasta el día 17 y los niveles alcanzados fueron significativamente menores (Figura 43).



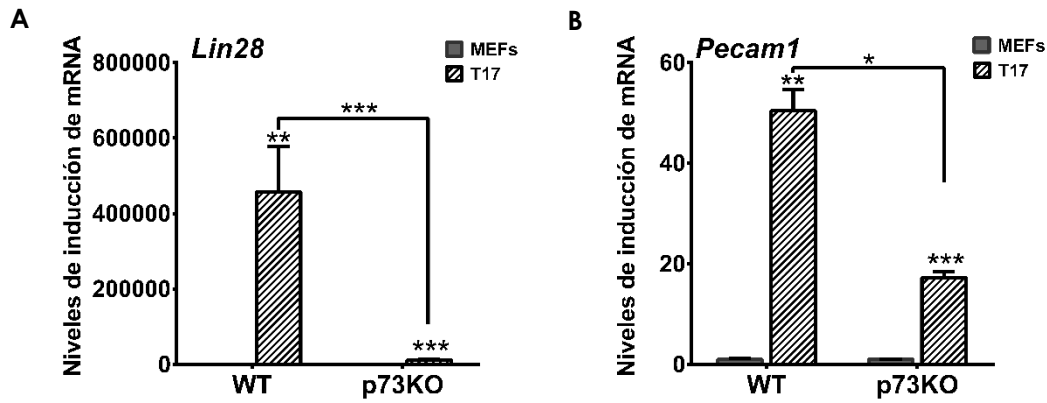
**Figura 43. La falta de p73 disminuye los niveles de expresión de *Nanog* durante el proceso de reprogramación celular afectando la fase de maduración.** Cuantificación de los niveles de expresión de mRNA de *Nanog* mediante qRT-PCR durante el proceso de reprogramación celular de MEFs WT y p73KO a los 0, 7, 12 y 17 días desde la inducción de OSKM. Los datos representan la media  $\pm$  SEM; los experimentos se realizaron, al menos, con tres clones por genotipo, dos experimentos independientes, por triplicado; las diferencias estadísticas se evaluaron mediante la prueba t de Student: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

Se ha sugerido que la expresión de *Epcam* está dirigida directamente por *Nanog* (Polo *et al.*, 2012). Este hecho podría estar reflejado en las células p73KO, las cuales presentan una cinética de expresión de *Nanog* retrasada y atenuada que correlaciona con su expresión disminuida de *Epcam*. Sin embargo, es importante resaltar que, aunque se ha descrito que la expresión sostenida de *Nanog* es necesaria para la adquisición de un fenotipo reprogramado y para la adquisición de la pluripotencia (Silva *et al.*, 2009), otros autores han descrito que *Nanog* es dispensable para la generación de las iPSCs si estas están en medio de cultivo óptimo (Schwarz *et al.*, 2014). Además, se ha descrito la existencia de redundancia funcional en la inducción de pluripotencia (Festuccia *et al.*, 2012). Es posible, por tanto, que NANOG tenga una función en el mantenimiento del fenotipo epitelial necesario para la estabilización. Por ello, cabría esperar que, en células carentes de p73, la alteración de la transición MET durante la iniciación resulte en una atenuación de la inducción de *Nanog*, la cual tuviese como consecuencia defectos en

la fase de estabilización, resultando en un fenotipo epitelial alterado. Todo esto podría explicar por qué las células p73KO, a pesar de tener unos niveles significativamente menores de *Nanog* durante el proceso de reprogramación, sean capaces de generar, aunque menos eficientemente, clones de células pluripotentes. Esta fase de maduración coincide con una segunda oleada de cambios transcripcionales y la reactivación de la expresión de los primeros genes asociados con la pluripotencia como *Oct4* endógeno o *Esrrb* (David and Polo, 2014). Al final de esta fase las células tienen capacidad de auto-renovación y pluripotencia y tras ella comienza la etapa final del proceso: la fase de estabilización.

La fase de estabilización es una etapa determinística donde cada estado futuro del sistema está determinado por el previo. En esta etapa las células son capaces de adquirir un perfil pluripotente total que puede mantenerse independientemente de la expresión de los transgenes (David and Polo, 2014). Algunos de los genes expresados al final de esta etapa son genes predictivos como *Utf1* o *Lin28* (Golipour *et al.*, 2012). En esta etapa finaliza la reorganización del citoesqueleto celular y se induce la expresión de proteínas de adhesión celular como PECAM-1 (Buganim *et al.*, 2012; Golipour *et al.*, 2012; Polo *et al.*, 2012). Al analizar a T17 la expresión de marcadores de la etapa de estabilización, *Lin28* y *Pecam1*, se detectó una fuerte inducción de la expresión de estos genes en las células WT (Figura 44), mientras que en ausencia de p73 la inducción estuvo significativamente atenuada. Además, como se comentó anteriormente, se observó que la expresión de *Lin28* en los clones iPSCs carentes de p73 era menor que en los WT, indicando que la deficiencia de *Lin28* se mantenía en células reprogramadas (Figura 35). Estos datos podrían indicarnos que p73 es necesario para la adquisición del estado pluripotente estable en los clones iPSCs.

En particular, LIN28, pero no NANOG, actúa como un factor pro-reprogramador (Hanna *et al.*, 2009b) que inhibe la reversión del proceso de reprogramación (Tanabe *et al.*, 2013). Por tanto, los bajos niveles que observamos en las células iPSCs p73KO y DKO podrían indicarnos que los clones carentes de p73 son clones inestables que no han alcanzado la fase final de reprogramación. (Hansson *et al.*, 2012; Polo *et al.*, 2012; Samavarchi-Tehrani *et al.*, 2010).



**Figura 44. La falta de p73 afecta la fase de estabilización durante el proceso de reprogramación.** Cuantificación de los niveles de expresión de mRNA de *Lin28* (A) y *Pecam1* (B) mediante qRT-PCR durante el proceso de reprogramación celular de MEFs WT y p73KO a los 0 y 17 días desde la inducción de OSKM. En cada caso se representan los niveles de mRNA relativos a la expresión de los MEFs (T=0). Los datos representan la media  $\pm$  SEM; los experimentos se realizaron, al menos, con tres clones por genotipo, dos experimentos independientes, por triplicado; las diferencias estadísticas se evaluaron mediante la prueba t de Student: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

En resumen, el conjunto de estos datos nos indica que la función de p73 es necesaria para que se lleve a cabo adecuadamente la transición mesénquima-epitelio durante la fase de iniciación, para que se induzca la expresión de *Nanog* durante la fase de maduración y se alcance la fase de estabilización final del proceso de reprogramación. Por tanto, p73 es necesario durante las distintas etapas del proceso de reprogramación celular y para la adquisición del estado pluripotente estable en los clones iPSCs generados.

## 2.2 Análisis del efecto de la falta de p73 durante las etapas del proceso de reprogramación celular en el contexto de ausencia de p53

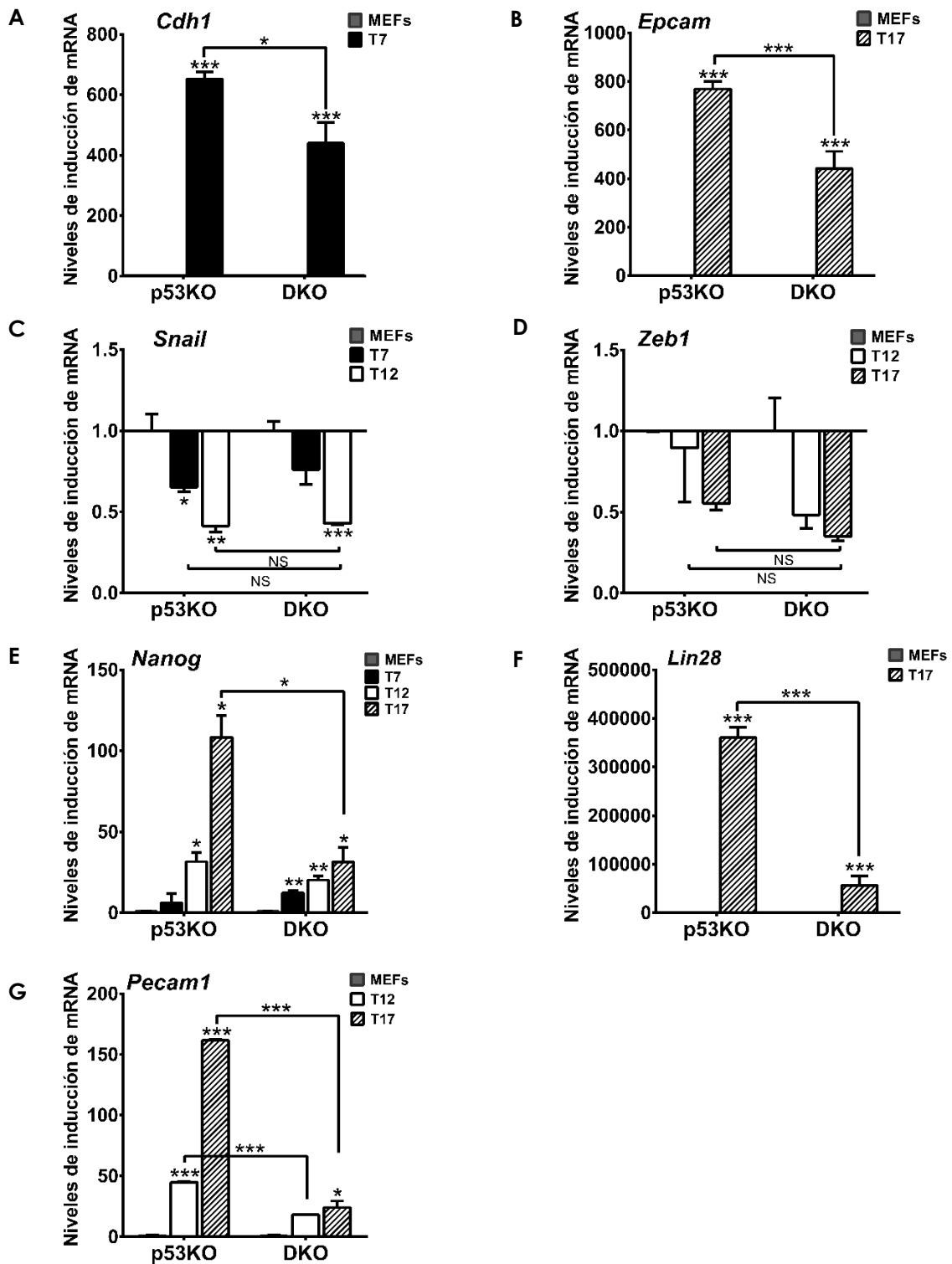
Como se ha descrito anteriormente, cuando los fibroblastos son inducidos a reprogramarse por los factores OSKM, estos inician un proceso estocástico de expresión génica que los lleva a asumir uno de los posibles destinos celulares: apoptosis, senescencia, trans-diferenciación o reprogramación. Algunos de estos procesos actúan como barreras a la reprogramación y están directamente regulados por el eje p53-p21. Por ello, nos preguntamos si la eliminación de p53 podría rescatar los efectos negativos de la falta de p73 durante la reprogramación. Como se mostró anteriormente, la eliminación de *Trp73*, en fibroblastos carentes de *Trp53*, no anula totalmente el efecto acelerador sobre la reprogramación celular de la falta de p53, pero disminuye significativamente la eficiencia del proceso y genera clones morfológicamente alterados e inestables. A la hora de analizar las etapas del proceso de reprogramación, hay que tener en cuenta que la cinética de reprogramación está acelerada en

ausencia de p53, por lo que los puntos de muestreo podrían no estar comparando etapas equivalentes del proceso a las de las células WT. Por este motivo, los datos de las células p53KO y DKO se analizaron, comparativamente, por separado de los otros dos genotipos.

El análisis de marcadores de las distintas etapas del proceso reveló que la falta de p73 disminuía la inducción de la expresión del programa epitelial (*Cdh1* y *Epcam*), con respecto a los valores alcanzados en células p53KO (Figura 45.A y 45.B). Sin embargo, es interesante destacar que el incremento en expresión de *Cdh1* que se detecta en células DKO es mayor que el observado en células WT (ver Figura 45.C). Esto puede deberse a que la falta de p53 incrementa, de manera robusta, la inducción de *Cdh1* durante la etapa de iniciación acelerando la MET (Brosh *et al.*, 2013). A pesar de ello, la falta de p73 atenúa este efecto, por lo que p73 parece ser un factor regulador importante en la adquisición del fenotipo epitelial durante la transición MET. Este hecho está apoyado por los bajísimos niveles de *Pecam1* detectados en las células DKO (Figura 45.G) en la fase de estabilización. A pesar de que la falta de p53 incrementa significativamente los niveles de *Pecam1* durante la estabilización a T17, la eliminación de p73 revierte este efecto a niveles incluso por debajo de los valores en células WT (ver Figura 45.B).

Sin embargo, la falta de p73 no parece tener un efecto en la represión de los genes pro-mesénquimales *Snail* y *Zeb1* (Figura 45.C y 45.D). En este sentido, se ha descrito que durante la transición MET los programas transcripcionales epiteliales y mesénquimales son regulados independientemente (Li *et al.*, 2010). Por ejemplo, *Klf4* y la vía BMP regulan la expresión de genes epiteliales específicamente, sin que su falta afecte la represión de los reguladores transcripcionales mesénquimales; esto sería semejante a lo que observamos en los DKO, donde la falta de p73 afecta el perfil de expresión epitelial pero no el mesénquimal.

Por el contrario, la falta de p73 parece tener un impacto muy grande en la regulación de *Nanog* y *Lin28* (Figura 45.E y 45.F), indicando que la ligera atenuación de la MET, debido a la falta de p73, resulta en la generación de clones con un fenotipo epitelial disminuido, y tal vez, por eso inestables, incluso en ausencia de p53. Esto nos indica que la función de p73 como modulador positivo de la transición MET, es necesaria incluso en ausencia de p53, un inhibidor demostrado de esta transición mesénquima-epitelio (Brosh *et al.*, 2013). O bien p73 regula vías distintas e independientes a las reguladas por p53, o se encuentra aguas debajo de las mismas.



**Figura 45.** La falta de p73 afecta el perfil de expresión epitelial, la fase de maduración y estabilización durante el proceso de reprogramación celular, incluso en ausencia de p53. Cuantificación de los niveles de expresión de mRNA de *Cdh1* (A), *Epcam* (B), *Snail* (C), *Zeb1* (D), *Nanog* (E), *Lin28* (F) y *Pecam1* (G), mediante qRT-PCR durante el proceso de reprogramación celular de MEFs p53KO y DKO a los 0, 7, 12 y 17 días desde la inducción de OSKM. En cada caso se representan los niveles de mRNA relativos a la expresión de los MEFs (T=0). Los datos representan la media  $\pm$  SEM; los experimentos se realizaron, al menos, con tres clones por genotipo, dos experimentos independientes, por triplicado; las diferencias estadísticas se evaluaron mediante la prueba t de Student: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . NS: no significativo.

En su conjunto, los resultados derivados del análisis de las etapas del proceso de reprogramación nos indican que la función de p73 es necesaria para este proceso, incluso en ausencia de p53. Estos datos contradicen lo propuesto por Alexandrova y colaboradores quienes sostienen que p73 no tiene ninguna función directa en la reprogramación de células somáticas (Alexandrova *et al.*, 2013) y que el efecto positivo de  $\Delta Np73$ , descrito por Lin y colaboradores es dependiente de su función represora de p53 (Lin *et al.*, 2012). Sin embargo, nuestros datos demuestran fehacientemente que la falta de p73 tiene un efecto negativo en la reprogramación celular independientemente de la presencia o ausencia de p53.

## **2.3 Función de p73 en la regulación de la vía de señalización de BMP**

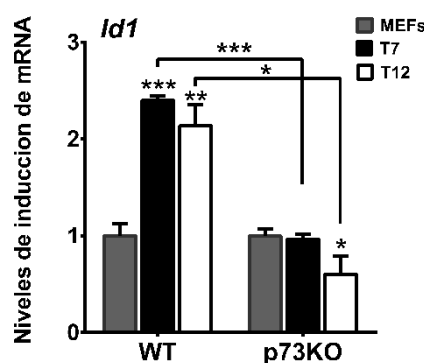
### **2.3.1 Análisis del efecto de la falta de p73 en la activación de la vía de BMP inducida por los factores OSKM durante la fase de iniciación**

Los artículos iniciales que describieron la transición MET como un requisito necesario durante la reprogramación de fibroblastos (Li *et al.*, 2010; Samavarchi-Tehrani *et al.*, 2010) sugerían que los factores OSKM suprimen la transición EMT mediante el bloqueo de la vía de señalización de TGF $\beta$  (Li *et al.*, 2010; Maherali and Hochedlinger, 2009), que es un inductor de EMT, al menos en parte, a través de la activación de *Snail* (Peinado *et al.*, 2003). Sin embargo, trabajos posteriores (Liu *et al.*, 2013b; Unternaehrer *et al.*, 2014) han demostrado la existencia de una transición epitelio-mesénquima corta y transitoria, caracterizada por una atenuación en la expresión de *Cdh1* y una inducción de la expresión de *Snail*, durante los primeros estadios de la reprogramación y que precede la transición MET. Al contrario de lo esperado, esta EMT es beneficiosa para el proceso de reprogramación (Liu *et al.*, 2013b). En este sentido, podría ser tentador plantear que en ausencia de p73, estamos observando la EMT inicial, es decir una atenuación temprana de la expresión de *Cdh1* y un incremento transitorio de *Snail*. Pero, en ausencia de p73, esta EMT, en vez de ser corta y transitoria, se alarga en el tiempo, probablemente debido a la falta de alguna señal adicional, p73-dependiente, afectándose así la transición MET subsecuente. Por tanto, una posible hipótesis es que durante la reprogramación de MEFs p73KO mediada por los factores OSKM, la falta de p73 afecta alguna/s de las señales necesarias para la correcta inducción de la MET. En este sentido, Liu y colaboradores, mediante experimentos de expresión secuencial, propusieron que la expresión ectópica de los factores OCT4 y KLF4 induce la EMT transitoria y que, posteriormente, MYC y SOX2 activan la MET (Liu *et al.*, 2013b). Paralelamente, se había demostrado que KLF4 era el factor inductor de la firma epitelial durante la reprogramación de MEFs (Li *et al.*, 2010) el cual, en colaboración sinérgica



con la activación de la vía de BMP, inducía la transición MET durante la fase de iniciación (Chen *et al.*, 2011). Es por tanto factible hipotetizar que p73 podría ser un regulador necesario de la vía de BMP, por lo que la falta de p73 afectaría la sinergia KLF4-BMP y con ello la inducción de la transición MET.

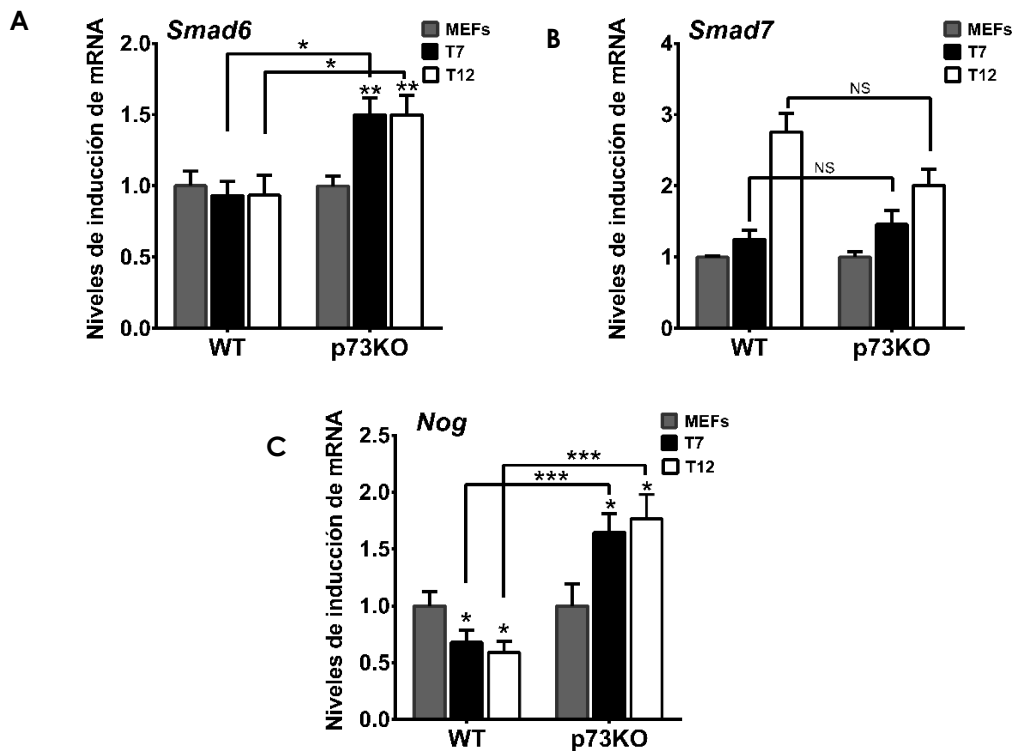
Se ha descrito que BMP puede cooperar con la red transcripcional de regulación de la pluripotencia mediante la inducción de los IDs a través de la vía de SMAD (Ying *et al.*, 2003). Por ello, se analizó la activación de la vía de señalización de BMP mediante la cuantificación de la inducción de *Id1* durante la fase de iniciación, fase en la que la vía de BMP es activada (Samavarchi-Tehrani *et al.*, 2010). Como se muestra en la Figura 46, en las células WT se detectó una inducción significativa, sobre los niveles de MEFs, de la expresión de *Id1* durante los primeros días de la reprogramación. Sin embargo, en ausencia de p73 no se observó incremento alguno, indicando que p73 es necesario para que se lleve a cabo la activación de esta vía de forma apropiada.



**Figura 46. La falta de p73 mitiga la inducción de *Id1* en la etapa de iniciación.** Cuantificación de los niveles de expresión de mRNA de *Id1* mediante qRT-PCR durante el proceso de reprogramación celular de MEFs WT y p73KO a los 0, 7 y 12 días desde la inducción de OSKM. En cada caso se representan los niveles de mRNA relativos a la expresión de los MEFs (T=0). Los datos representan la media  $\pm$  SEM; los experimentos se realizaron, al menos, con tres clones por genotipo, dos experimentos independientes, por triplicado; las diferencias estadísticas se evaluaron mediante la prueba t de Student: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

Esta vía está regulada mediante un lazo de retroalimentación negativa por los represores: SMAD6, SMAD7 o NOGGIN (Miyazono *et al.*, 2005; Sieber *et al.*, 2009), ya que la activación de su expresión es inducida por la propia activación de la vía (Ishida *et al.*, 2000). Mientras que SMAD6 preferiblemente bloquea la vía de señalización de BMP (Hata *et al.*, 1998), SMAD7 actúa como un inhibidor general tanto de la señalización de TGF- $\beta$  como de BMP (Hayashi *et al.*, 1997; Ishisaki *et al.*, 1999; Nakao *et al.*, 1997). Por otra parte, antagonistas extracelulares de BMP, como NOGGIN, pueden formar complejos inactivos mediante la unión a los ligandos de BMP e inactivar la vía de señalización (Tong *et al.*, 2015). Por todo ello, se cuantificaron los niveles de expresión de *Smad6*, *Smad7* y *Nog* durante la fase de iniciación del proceso de reprogramación celular.

Tal como cabría esperar durante la reprogramación de los MEFs WT, donde la vía BMP es activada en la fase de iniciación (T7), no se detecta incremento en los niveles de los inhibidores *Smad6* y *Smad7* durante esta etapa (Figura 47.A y 47.B), e incluso, en el caso de *Nog*, se observó que su expresión disminuía significativamente (Figura 47.C). Sin embargo, en células carentes de p73, se produjo un incremento significativo de los niveles de expresión de los inhibidores *Smad6* y *Nog* (Figura 47.A y 47.C), lo cual está en concordancia con la atenuación de la vía de BMP en estas células, descrito anteriormente. En el caso de *Smad7* se detectó un incremento tardío (T12) en células WT (Figura 47.B), pero no se encontraron variaciones significativas en los niveles de expresión en ausencia de p73 respecto a estas, lo que sugiere que la señalización de regulación de *Smad7* no estaba siendo afectada por la falta de p73 en este contexto celular.



**Figura 47. La falta de p73 afecta la regulación de la expresión de los inhibidores de la vía de señalización de BMP, *Smad6* y *Nog*, durante la fase de iniciación, sin afectar *Smad7*.** Cuantificación de los niveles de expresión de mRNA de *Smad6* (A), *Smad7* (B) y *Nog* (C) mediante qRT-PCR durante el proceso de reprogramación celular de MEFs WT y p73KO a los 0, 7 y 12 días desde la inducción de OSKM. En cada caso se representan los niveles de mRNA relativos a la expresión de los MEFs (T=0). Los datos representan la media  $\pm$  SEM; los experimentos se realizaron, al menos, con tres clones por genotipo, dos experimentos independientes, por triplicado; las diferencias estadísticas se evaluaron mediante la prueba t de Student: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . NS: no significativo.

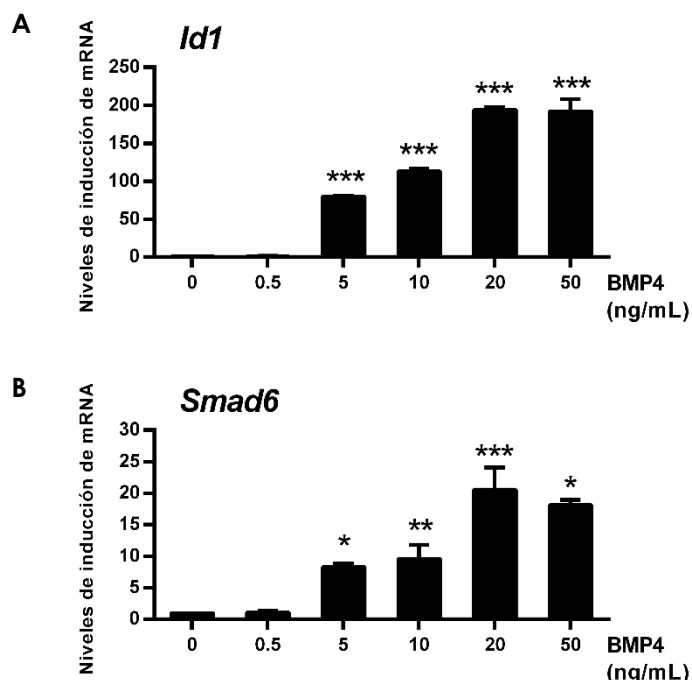
Teniendo en cuenta que nuestros datos previos sugieren que p73 puede ser necesario para inducir la etapa de iniciación mediante la regulación de la vía de

señalización de BMP, nuestra hipótesis fue que p73 podría ser un regulador positivo, directo o indirecto, de la señalización de la vía de BMP, posiblemente actuando como represor de alguno de los inhibidores de esta vía.

### 2.3.2 Análisis del papel de p73 en la vía de señalización de BMP

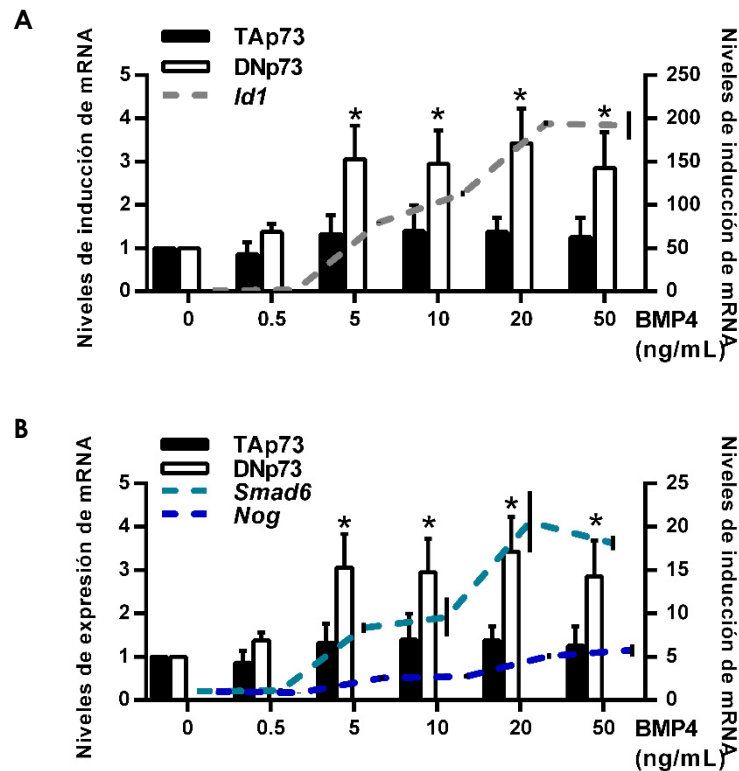
Para determinar si p73 forma parte de la señalización inducida por BMP, se utilizó, como modelo de estudio una línea celular de carcinoma embrionario de ratón P19, por ser altamente transfectable y haber sido utilizada para demostrar el mecanismo de retroalimentación negativa entre SMAD6 y SMAD1/5/8 en respuesta a BMP (Ishida *et al.*, 2000). BMP4 es el miembro de la familia de BMPs que se expresa en mayor nivel en estas células (Ku *et al.*, 2006). Por ello, tratamos células P19 cultivadas en condiciones de bajo suero en el medio de cultivo, con distintas concentraciones de BMP4, y comprobamos la activación de la vía analizando los niveles de expresión de las dianas transcripcionales *Id1* y *Smad6*.

En concordancia con lo publicado previamente (Itoh *et al.*, 1998; Miyazono and Miyazawa, 2002; Nakao *et al.*, 1997; Takase *et al.*, 1998), el tratamiento con BMP4 indujo la expresión de estos genes de manera dosis-dependiente (Figura 48), demostrándose que en nuestro sistema experimental se activa la vía BMP correctamente.



**Figura 48. La vía de señalización de BMP se activa en presencia de BMP4.** Cuantificación de los niveles de expresión de mRNA de *Id1* (A) y *Smad6* (B) mediante qRT-PCR en células P19 tratadas con 0,5; 5; 10; 20 y 50 ng/mL de BMP4, en condiciones de bajo suero, durante 24 horas. En cada caso se representan los niveles de mRNA relativos a las células sin tratamiento. Los datos representan la media  $\pm$  SEM; los experimentos se repitieron al menos dos veces por triplicado; las diferencias estadísticas se evaluaron mediante la prueba t de Student: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

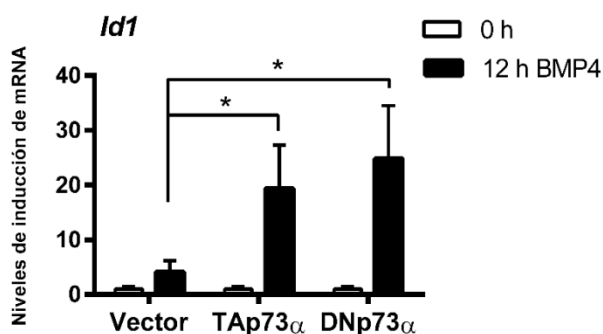
Para determinar si p73 forma parte de la vía de señalización de BMP, se estudió la regulación de la expresión de TAp73 y  $\Delta$ Np73 en este sistema. Nuestros datos demostraron que existe una correlación entre la activación de la cascada de BMP y la activación de la expresión de  $\Delta$ Np73 de una manera dosis-dependiente (Figura 49), sugiriendo que  $\Delta$ Np73 es parte de la vía de señalización de BMP.



**Figura 49. La isoforma  $\Delta$ Np73 está regulada por BMP4 de una manera dosis-dependiente.** Cuantificación de los niveles de expresión de mRNA de TAp73a,  $\Delta$ Np73a, *Nog*, *Smad6* e *Id1*, mediante qRT-PCR en células P19 tratadas con 0,5; 5; 10;20 y 50 ng/mL de BMP4, en condiciones de bajo suero, durante 24 horas. En cada caso se representan los niveles de mRNA relativos a las células sin tratamiento. Los datos representan la media  $\pm$  SEM; los experimentos se repitieron al menos dos veces por triplicado; las diferencias estadísticas se evaluaron mediante la prueba t de Student: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

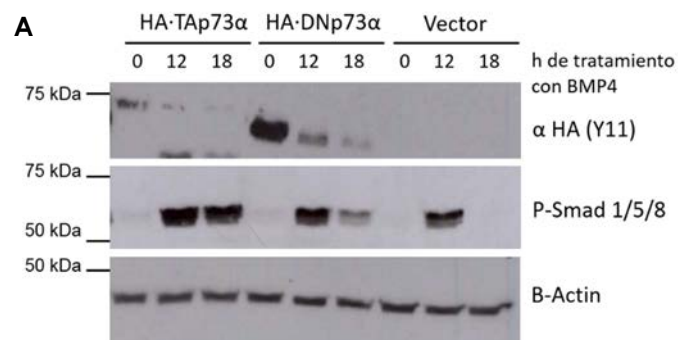
A continuación, se analizó si la expresión ectópica de p73 era capaz de magnificar la activación inducida por tratamiento con BMP. Para ello, transfectamos las células P19 con vectores de expresión constitutiva codificando las isoformas de p73, TAp73a y  $\Delta$ Np73a, así como vector control (pcDNA3). A las 18 horas de la transfección, se reemplazó el medio de cultivo por otro bajo en suero y 24 horas después se recogió la muestra de cero horas (0 h) y se añadió BMP4 al resto, recogiendo las muestras a las horas indicadas. Finalmente, la activación de la vía de señalización se analizó cuantificando la expresión de *Id1* mediante qRT-PCR y la fosforilación de SMAD1/5/8 mediante *Western Blot*.

Como se representa en la Figura 50, la expresión ectópica tanto de TAp73, como de  $\Delta$ Np73, es capaz de intensificar significativamente la expresión de *Id1* mediada por el tratamiento con BMP4, demostrando que ambas isoformas pueden modular positivamente esta vía de señalización.



**Figura 50. TAp73 y  $\Delta$ Np73 inducen la expresión de *Id1*, en presencia de BMP4.** Cuantificación de los niveles de expresión de mRNA de *Id1* mediante qRT-PCR en células P19 transfectadas con Vector, HA-TAp73a y HA- $\Delta$ Np73a y tratadas con BMP4, en condiciones de bajo suero, durante 12 horas. En cada caso se representan los niveles de mRNA relativos a las 0 h. Los datos representan la media  $\pm$  SEM; los experimentos se repitieron al menos cuatro veces por triplicado; las diferencias estadísticas se evaluaron mediante la prueba t de Student: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

El análisis de la expresión de proteína por *Western Blot* demostró que el tratamiento con BMP4 induce una fosforilación rápida y transitoria de SMAD1/5/8 (p-SMAD1/5/8). En este sistema, la sobreexpresión tanto de TAp73a como de  $\Delta$ Np73a incrementó esta fosforilación solamente en presencia de BMP, sugiriendo un papel modulador de p73 en la señal inducida por BMP4 (Figura 51). Estos resultados son coherentes con datos previamente publicados que demuestran que todos los miembros de la familia de p53, incluyendo TAp73 y  $\Delta$ Np73, son capaces de activar transcripcionalmente BMP7, activando, por tanto, esta vía (Yan and Chen, 2007). Además del incremento en los niveles de p-SMAD 1/5/8, también se observó que la fosforilación (y, por tanto, la señalización mediada por la vía) se prolongaba en el tiempo (Figura 51), sugiriendo que la expresión de p73 puede estar reprimiendo los inhibidores que silencian esta vía (I-SMADs).



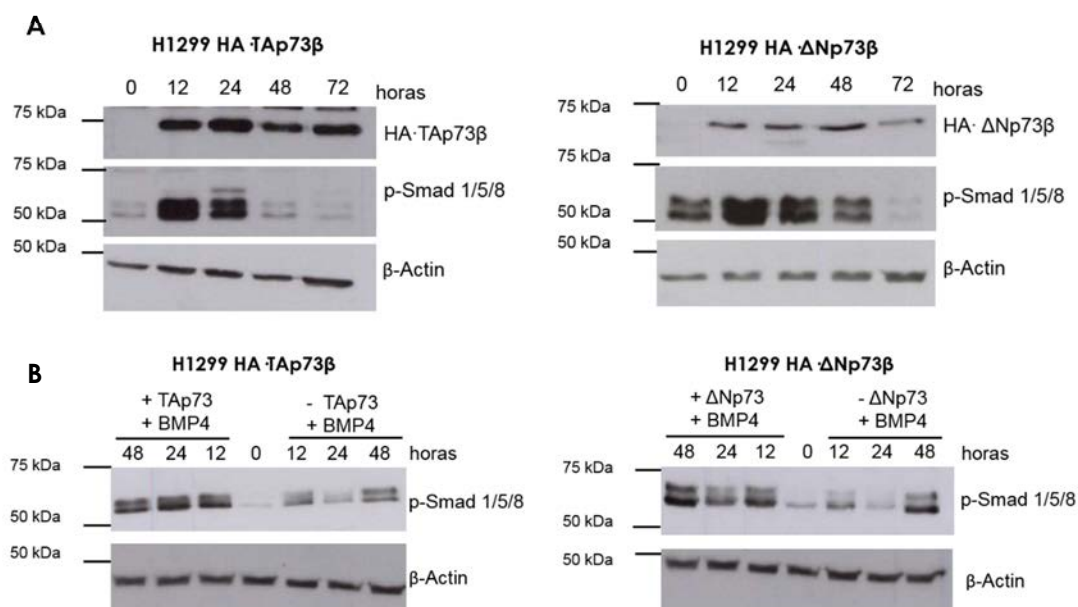
**Figura 51. TAp73 y ΔNp73 incrementan la activación de la vía de señalización de BMP, en presencia de BMP4, en células P19.** Análisis de la expresión de p-Smad1/5/8 mediante *Western Blot* en células P19 transfectadas con Vector, HA-TAp73α y HA-ΔNp73α y tratadas con BMP4, en condiciones de bajo suero, durante 12 y 18 horas. La expresión de TAp73 y ΔNp73 se detecta con un anticuerpo anti-HA.

Se observó que en las células P19 la expresión de los transgenes, TAp73 y ΔNp73, disminuía rápidamente tras el tratamiento con BMP4 (Figura 51), pudiendo sugerir la existencia de un mecanismo de regulación post-traducciona negativo de p73 regulado por la vía BMP. Sin embargo, es importante resaltar que el sistema utilizado requiere la transfección transitoria de las células y posterior cultivo en bajo suero durante al menos 42 horas antes del tratamiento con BMP4. Esto hace que los tiempos analizados (12 y 18 horas) realmente correspondan aproximadamente a unas 60 horas tras la transfección con p73, tiempo en el cual puede estar decayendo la expresión del transgén transfectado. Esto es aún más evidente en las células transfectadas con la isoforma proapoptótica TAp73, en las cuales se puede estar induciendo la muerte celular.

Para eliminar estos problemas, se investigó la capacidad de p73 de modular la vía de señalización de BMP utilizando líneas celulares inducibles tumorales humanas de carcinoma de pulmón: H1299-TAp73 y H1299-ΔNp73 (Liu *et al.*, 2004b). En estas, la línea tumoral de carcinoma de pulmón H1299 tiene incorporado el sistema *Tet-OFF* dirigiendo la expresión de TAp73 o ΔNp73, por lo que la ausencia de tetraciclina permite la expresión de las isoformas del gen. Además, estas células producen y secretan BMP2 y BMP4 por lo que son un buen modelo para este estudio (Langenfeld *et al.*, 2003).

En primer lugar, se analizó el efecto de la inducción de TAp73 y ΔNp73 en la vía de BMP. Como se observa en la Figura 52, sin inducción de p73 (tiempo 0), se detectaron niveles basales de p-SMAD1/5/8, asociados a que estos experimentos se realizaron en presencia de suero y a la secreción autocrina de BMP. En ambos casos, la expresión de las isoformas de p73 tuvo como resultado un incremento en la activación de la vía (Figura 52.A), confirmando que p73 es un modulador positivo de la misma. En el caso de ΔNp73, esta activación se prolongó durante más tiempo, sugiriendo una disminución de los mecanismos de retroalimentación negativa de la vía de BMP.

A continuación, se quiso confirmar la capacidad de estas isoformas de potenciar la señal iniciada por el tratamiento con BMP4. Como se observa en la Figura 52.B, ambas isoformas potencian la activación inducida por tratamiento con BMP, actuando como moduladores positivos de esta vía.



**Figura 52. TAp73 y ΔNp73 incrementan la activación de la vía de señalización de BMP, en presencia de BMP4, en células H1299.** Análisis de la expresión de p-Smad1/5/8 mediante *Western Blot* en células H1299-HA TAp73 y H1299-HA ΔNp73 **A)** inducidas durante 72 horas **B)** inducidas durante 48 horas en presencia o ausencia de BMP4. La expresión de TAp73 y ΔNp73 se detecta con un anticuerpo anti-HA.

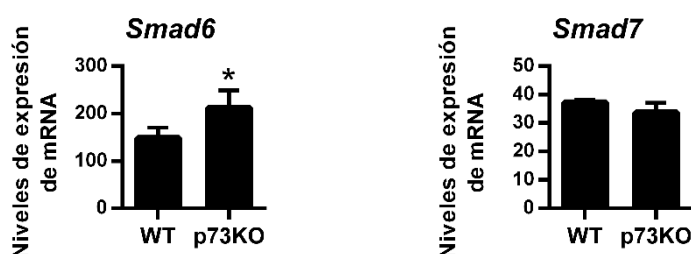
En su conjunto, estos resultados apoyaron la hipótesis de que p73 podría ser un regulador necesario de la vía de BMP durante la fase de iniciación, por lo que su falta atenuaría la activación de la vía mediada por los factores OSKM, afectando la inducción de la transición MET y, por tanto, el proceso de reprogramación.

### 2.3.3 Estudio del mecanismo molecular de regulación de la vía de señalización de BMP mediado por p73

p73 podría estar regulando la vía de señalización de BMP a distintos niveles. Se ha descrito que p73 puede modular la vía de BMP mediante la inducción de BMP7 en células de cáncer de mama (Yan and Chen, 2007). Sin embargo, la prolongación de la señal mediada especialmente por ΔNp73 (Figura 51 y 52), junto con los elevados niveles de expresión de *Smad6* y *Nog* detectados en células carentes de p73 durante la reprogramación (Figura 47), sugiere que p73 puede estar reprimiendo los inhibidores de esta vía.

Los miembros de la familia de p53 son factores de transcripción que regulan la expresión de sus genes diana a través de la unión a sitios de respuesta específicos (p53RE) situados en el promotor de los mismos. Por tanto, es de esperar que la represión de los i-SMAD se realice a nivel transcripcional. Para analizar este punto se llevó a cabo un estudio *in silico*, utilizando el programa informático *p53FamTag* (Sbisa *et al.*, 2007), <http://p53famtag.ba.itb.cnr.it/>, para determinar la existencia de sitios p53RE en los promotores de *NOG*, *SMAD6* y *SMAD7*. Este programa realiza un alineamiento global de secuencias de genes humanos con la secuencia consenso para los sitios p53RE: 5`RRRC(A/T)(A/T)GYYY 3` (R representa purina e Y es pirimidina) (Wang *et al.*, 2009). El programa identificó posibles p53RE en los promotores de los genes de *SMAD6* y *SMAD7*, pero no en el de *NOG*, eliminando a éste, *a priori*, como posible diana transcripcional directa de p73.

Para determinar si p73 podría estar actuando como represor de los inhibidores de la vía de señalización, se analizó, en primer lugar, los niveles de expresión de *Smad6* y *Smad7* en MEFs WT y p73KO mediante qRT-PCR. Se detectó un incremento significativo en los niveles de expresión de *Smad6* en los MEFs p73KO, mientras que no hubo diferencias significativas con respecto a la expresión de *Smad7* (Figura 53), sugiriendo que p73 puede estar actuando como represor de *SMAD6*, por lo que en ausencia de p73 (p73KO), se incrementa su expresión.

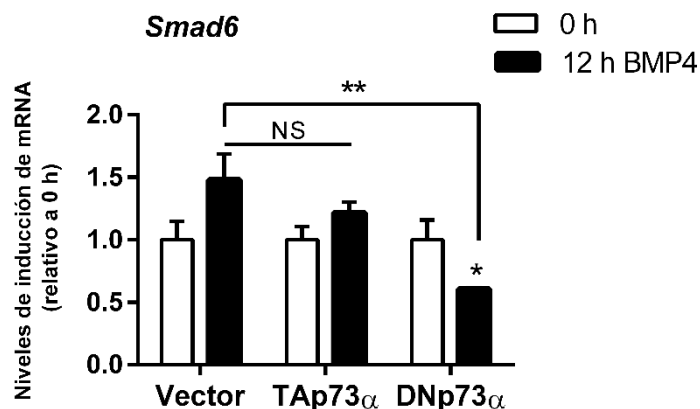


**Figura 53. La falta de p73 resulta en la inducción de la expresión de *Smad6*, sin afectar *Smad7*.** Cuantificación de los niveles de expresión de mRNA de *Smad6* y *Smad7* mediante qRT-PCR en MEFs WT y p73KO. Los datos representan la media  $\pm$  SEM; los experimentos se realizaron, al menos, con tres clones por genotipo, dos experimentos independientes, por triplicado; las diferencias estadísticas se evaluaron mediante la prueba t de Student: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

Por ello, se decidió investigar si *Smad6* era una diana transcripcional, directa o indirecta, de p73. La expresión de *Smad6* es inducida durante la activación de la vía de BMP, por lo que quisimos comprobar si la sobreexpresión de p73 era capaz de reprimir esta inducción mediada por BMP. Para ello, transfectamos las células P19 con TAp73a,  $\Delta$ Np73a o pcDNA3, en condiciones de bajo suero en el cultivo, y analizamos la expresión de *Smad6* tras 12 horas de tratamiento con BMP4 (Figura 54). El análisis mediante qRT-PCR confirmó que, en este sistema, BMP4 induce la expresión de *Smad6*. Asimismo, la



expresión ectópica de  $\Delta$ Np73, pero no de TAp73, resultó en una disminución significativa de *Smad6* (Figura 54), confirmando que  $\Delta$ Np73 es capaz de inhibir la activación de *Smad6* mediada por BMP.



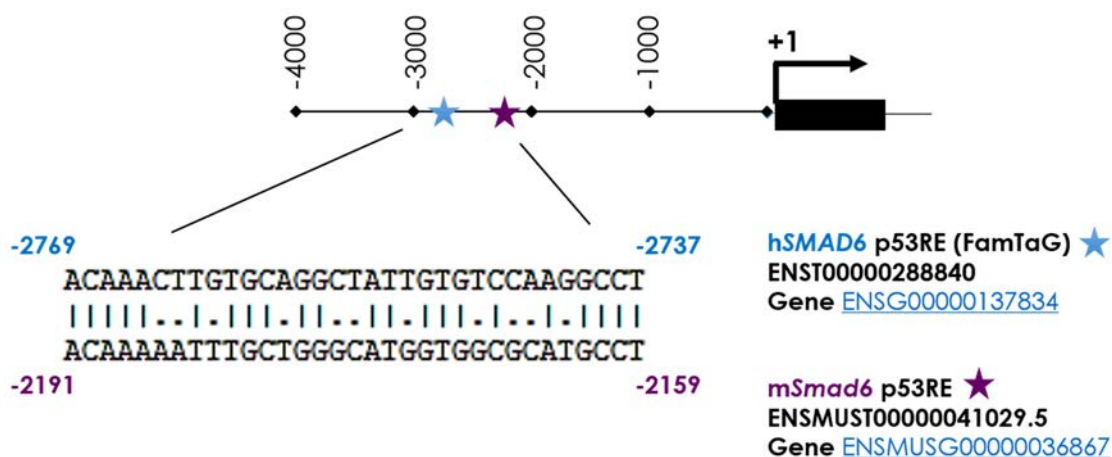
**Figura 54. La isoforma  $\Delta$ Np73 reprime la inducción de *Smad6*.** Cuantificación de los niveles de expresión de mRNA de *Smad6* mediante qRT-PCR en células P19 en condiciones de bajo suero, transfectadas con Vector, HA-TAp73a y HA- $\Delta$ Np73a y tratadas con BMP4 durante 12 horas. En cada caso se representan los niveles de mRNA relativos a las 0 h. Los datos representan la media  $\pm$  SEM; los experimentos se repitieron al menos cuatro veces por triplicado; las diferencias estadísticas se evaluaron mediante la prueba t de Student: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

Como se indicó anteriormente, el programa informático *p53FamTag* identificó un posible sitio p53RE en el promotor del gen *SMAD6* humano (Figura 55), localizado en la posición -2769/-2737 desde la posición +1 (sitio de inicio de la transcripción), apoyando la idea de que este gen podría ser una diana transcripcional directa de p73. Para demostrarlo se propuso llevar a cabo un análisis transcripcional con el promotor del gen *Smad6* en las células de ratón P19. Sin embargo, hasta la fecha, los posibles sitios de respuesta a p53 no han sido estudiados en el promotor murino de *Smad6*.

Ishida y colaboradores generaron un sistema reportero que contiene el promotor murino de *Smad6* dirigiendo la expresión del gen *reporter luc*, (*Smad6-luc*), en concreto, este sistema contiene un fragmento del promotor de *Smad6* que corresponde a 3213 pb desde el codón de inicio de la traducción ATG, el cual presenta sitios de unión de SMAD5 y responde a la activación por BMP (Ishida *et al.*, 2000).

Para determinar si *Smad6* es una diana transcripcional de p73 utilizamos este sistema *reporter*, cedido por el Dr. Kohei Miyazono, Universidad de Tokio (Ishida *et al.*, 2000). Para ello, analizamos si el fragmento de este promotor *Smad6* contenía elementos de respuesta a p53. Realizamos un alineamiento local entre la secuencia del gen *Smad6* murino depositada en Ensembl (ENSMUST00000041029.5) y la secuencia del p53RE proporcionada por el programa *p53FamTag* identificada en el promotor humano de *SMAD6*, así como un alineamiento global entre las secuencias de los promotores murino

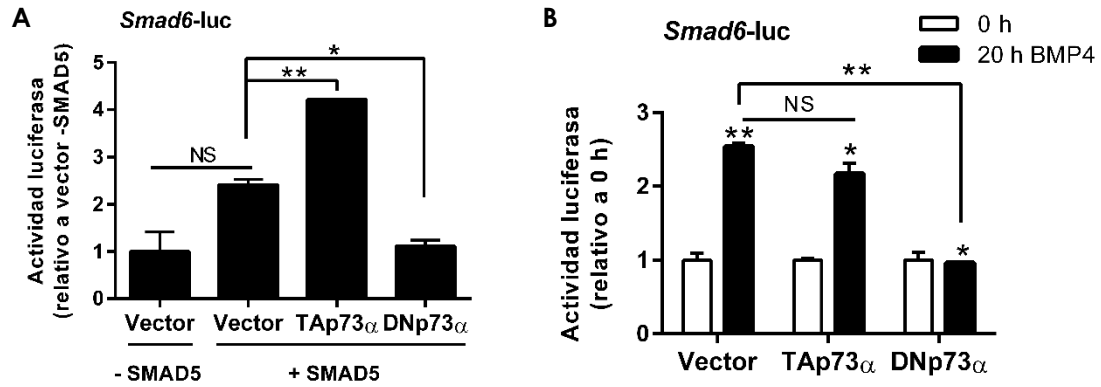
y humano en la región de interés. Se localizó una secuencia en el promotor *Smad6* con una homología del 66,7% con el p53RE del promotor de *SMAD6* entre las posiciones -2191/-2159. Por tanto, el p53RE identificado estaba incluido en el fragmento de 3213 pb del promotor *Smad6* (Figura 55).



**Figura 55. Identificación de un p53RE en los promotores de *SMAD6* humano y *Smad6* murino.** Se representa el posible sitio p53RE en el promotor de *SMAD6* (-2769/-2737) alineado con la secuencia del promotor de *Smad6* (-2191/-2159). Las posiciones son consideradas desde el sitio +1, inicio de transcripción.

Se ha descrito que para la correcta activación del sistema *Smad6-luc* se requiere la co-transfección con un vector de expresión de SMAD5 (Ishida *et al.*, 2000). Por tanto, se transfectaron células P19 con el vector *Smad6-luc* solo, o junto con un vector de expresión de SMAD5 y los vectores de expresión constitutiva: TAp73a,  $\Delta$ Np73a o vector vacío pcDNA3. La cuantificación de la actividad luciferasa indicó que la expresión de SMAD5 induce una ligera activación del promotor, consistente pero no significativa, que es potenciada significativamente por la co-expresión de TAp73 (Figura 56.A), reflejando la capacidad de TAp73 de activar la vía de BMP. Por el contrario, la co-expresión de  $\Delta$ Np73 reprimió significativamente la inducción mediada por SMAD5, revelando la capacidad de  $\Delta$ Np73 de reprimir este promotor.

Para determinar si  $\Delta$ Np73 es capaz de bloquear la activación del promotor de *Smad6* mediada por BMP, las células P19, en condiciones de bajo suero, fueron transfectadas con el vector *Smad6-luc* junto con los vectores indicados y se cuantificó la actividad luciferasa tras 20 horas del tratamiento con BMP4 (Figura 56.B). El tratamiento con BMP4 activó significativamente el promotor de *Smad6*, sin embargo,  $\Delta$ Np73, pero no TAp73, fue capaz de bloquear dicha activación (Figura 56.B), indicando que  $\Delta$ Np73 es un represor transcripcional de *Smad6*.



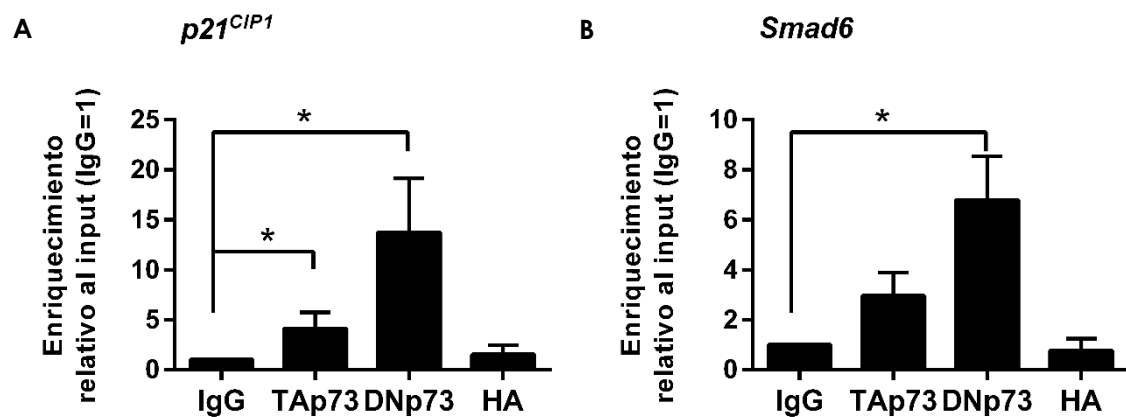
**Figura 56. La isoforma  $\Delta$ Np73 reprime la activación transcripcional de *Smad6*.** **A)** Cuantificación de la actividad luciferasa del promotor *Smad6-luc* en células P19, co-transfectadas con Vector, SMAD5, HA-TAp73a y HA- $\Delta$ Np73a. La actividad luciferasa se midió a las 20 horas de la transfección. En cada caso se muestran los datos normalizados con los valores de la actividad Renilla y se representa la actividad luciferasa relativa al vector no transfectado con *Smad5*. **B)** Cuantificación de la actividad luciferasa del promotor *Smad6-luc* en células P19 en condiciones de bajo suero, co-transfectadas con Vector, HA-TAp73a y HA- $\Delta$ Np73a, tratadas con BMP4 durante 20 horas. En cada caso se muestran los datos normalizados con los valores de la actividad Renilla y se representa la actividad luciferasa relativa a las 0h. Los datos representan la media  $\pm$  SEM; los experimentos se repitieron al menos cuatro veces por duplicado; las diferencias estadísticas se evaluaron mediante la prueba t de Student: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

Sin embargo, esta regulación puede ser directa (sobre el promotor) o indirecta a través de interacciones con otros factores de transcripción, como Sp1 (Li *et al.*, 2004; Xu and Rogers, 2007) o SMAD5, puesto que se ha descrito que miembros de la familia de p53, en concreto, p53 y  $\Delta$ Np63a, interaccionan físicamente con los SMAD1/5/8 específicos de BMP para co-regular la actividad transcripcional de *Id2* (Balboni *et al.*, 2015). Además, tanto TAp73 como  $\Delta$ Np73 pueden unirse a elementos Sp1 para activar (Dulloo *et al.*, 2015) o reprimir (Racek *et al.*, 2005) transcripcionalmente diferentes genes. Por ello, para demostrar si  $\Delta$ Np73 se une directamente al promotor de *SMAD6* a través del p53RE identificado, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina en la línea celular H1299.

La cromatina de estas células se fragmentó e inmunoprecipitó (IP) utilizando anticuerpos contra TAp73 y  $\Delta$ Np73 para detectar proteínas endógenas. Adicionalmente, como controles negativos, se utilizó un anticuerpo anti-HA y una inmunoglobulina del mismo isotipo que los anticuerpos anti-TAp73 y  $\Delta$ Np73. Para confirmar el buen funcionamiento de la técnica, se utilizaron las IPs realizadas y se comprobó la unión de TAp73 y  $\Delta$ Np73 al sitio p53RE del promotor de *p21<sup>CIP1</sup>*, previamente descrita (Marques-Garcia *et al.*, 2009). Tal y como se muestra en la Figura 57.A, al amplificar la región p53RE del promotor de *p21<sup>CIP1</sup>* se observó que ambas proteínas son capaces de unirse a dicho elemento de respuesta de manera específica.

A continuación, se investigó la unión de ambas isoformas de p73 al p53-RE identificado en el promotor de *Smad6* (Figura 57.B). Mediante análisis de ChIP,

detectamos un enriquecimiento aproximado de ocho veces en las muestras IPs con el anticuerpo anti- $\Delta$ Np73 (Figura 57.B), en comparación a los controles de IgG y HA, indicando que  $\Delta$ Np73 estaba unido a este elemento de respuesta. Por el contrario, no se detectó unión significativa en las muestras IP con anti-TAp73. Estos resultados demuestran fehacientemente que, en este contexto celular,  $\Delta$ Np73, pero no TAp73, se une al elemento de respuesta de p53 del promotor de *SMAD6* humano, por lo que podemos decir que este gen es una diana transcripcional directa de  $\Delta$ Np73.



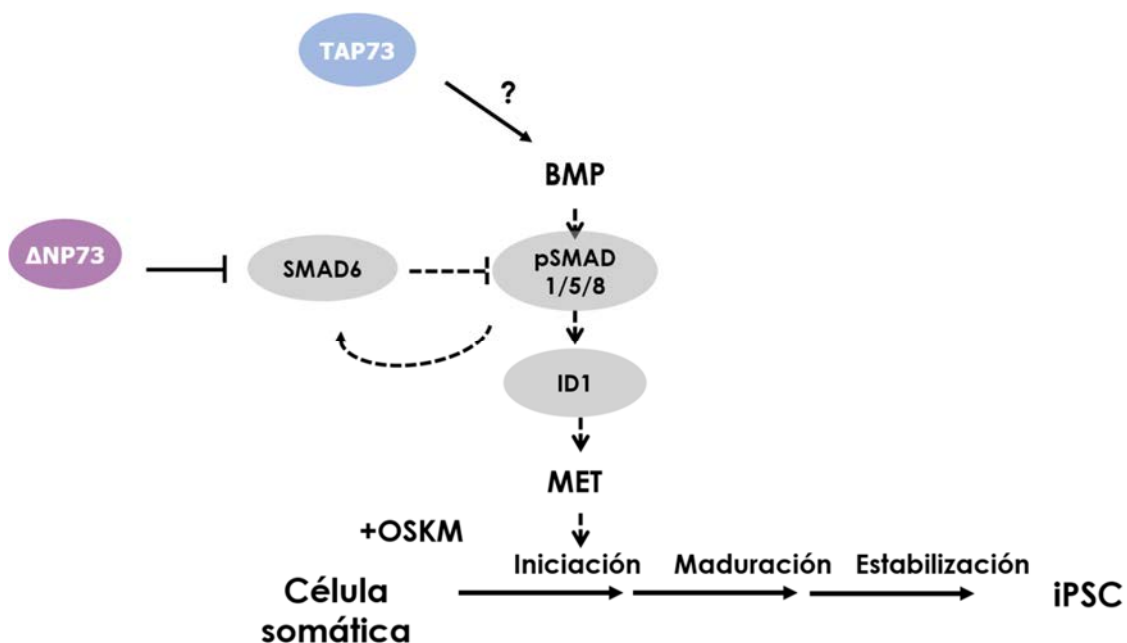
**Figura 57.  $\Delta$ Np73 se une al p53RE del promotor de *SMAD6*.** Se sonicaron las células H1299 en fragmentos menores a 500pb y se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti IgG (*input*), HA (control negativo), TAp73 y  $\Delta$ Np73. Mediante qRT-PCR se amplificó la región del p53RE del promotor *p21<sup>CIP1</sup>* (A) y *SMAD6* (B) de humanos. En cada caso se representan los niveles de amplificación relativos al *input* (IgG=0). Los datos representan la media  $\pm$  SEM; los experimentos se repitieron al menos cuatro veces, por duplicado; las diferencias estadísticas se evaluaron mediante la prueba t de Student: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

Nuestros resultados demuestran por primera vez que *SMAD6* es un gen diana de p73. Proponemos que  $\Delta$ Np73 se puede unir a los sitios de respuesta de p53 del promotor de *SMAD6* y reprimir su activación transcripcional. Por tanto, la falta de  $\Delta$ Np73 resultaría en una disminución de la activación de la vía de señalización de BMP y en una transición mesénquima-epitelio defectuosa durante el inicio del proceso de reprogramación celular.

En concreto, proponemos un modelo molecular en el cual sugerimos que la expresión de TAp73 y  $\Delta$ Np73 se induce durante el proceso de reprogramación celular para modular positivamente la vía de señalización de BMP durante la fase de iniciación del proceso de reprogramación (Figura 58). Por una parte, TAp73 actúa como un activador de la vía, mientras que  $\Delta$ Np73 actúa como represor, inhibiendo directamente la activación transcripcional de *Smad6* mediada por BMP, resultando en un incremento de la activación de la vía. Por tanto, la falta de p73 afecta la fase de iniciación del proceso de reprogramación, atenúa la activación de la vía de señalización de BMP mediada por los factores OSKM y altera la inducción de la transición mesénquima-

epitelio, resultando todo ello en un proceso de reprogramación celular deficiente. Este modelo es consistente con los resultados obtenidos durante la reprogramación celular de las células p73KO, donde la falta de inducción de una de las dianas transcripcionales de la vía de señalización de BMP, *Id1* (Figura 46), en la fase de iniciación del proceso, se correlaciona con altos niveles en la expresión de *Smad6* (Figura 47.A).

Asimismo, en este trabajo se describe por primera vez no solo la función de p73 en el proceso de reprogramación celular, necesario incluso en ausencia de p53, sino que también demostramos que p73 es necesario para el establecimiento y mantenimiento de la capacidad de pluripotencia de las líneas celulares iPSCs generados



**Figura 58. Modelo de regulación propuesto.** ΔNp73 es necesario durante el proceso de reprogramación celular, y para un correcto funcionamiento de la vía de BMP durante la MET en la fase de inicio de la reprogramación.

### **OBJETIVO 3. Estudiar la función del gen *Trp73* en la generación de células de estirpe mesodérmica a partir de líneas celulares pluripotentes inducidas (iPSCs)**

El mesodermo es la capa germinativa media del tejido embrionario que da lugar al mesénquima embrionario. Este tejido está formado por células multipotentes, denominadas células mesenquimatosas, que están inmersas en una matriz extracelular abundante y viscosa. Durante el desarrollo embrionario estas células migran hacia todo el cuerpo y dan lugar a tejido conjuntivo propio, el tejido conjuntivo especializado (adiposo, cartilaginoso, óseo, microglía y sangre), tejido muscular y tejido epitelial mesodérmico: mesotelio y endotelio (Gartner and Hiatt, 2011).

Durante el análisis de la capacidad de pluripotencia *in vitro* de las iPSCs (objetivo 2), detectamos alteraciones en el proceso de diferenciación funcional a células de origen mesodérmico. En particular, observamos que las iPSCs carentes de p73, a pesar de generar células CD31<sup>+</sup>, probablemente de naturaleza endotelial, no eran capaces de ensamblarse para formar estructuras reticulares, características de la diferenciación endotelial. Este hecho podría reflejar limitaciones o defectos en el proceso de diferenciación endotelial y/o en la morfogénesis vascular. Sin embargo, también es posible que la falta de p73 afectase, de manera general, la generación de células de estirpe mesodérmica, reflejando un defecto más general. Por ello, nos planteamos analizar el efecto de la falta de p73 durante la generación de células mesodérmicas a partir de iPSCs, durante la diferenciación a células endoteliales.

#### **3.1 Análisis del efecto de la falta de p73 en la diferenciación endotelial y morfogénesis vascular**

La formación del sistema vascular es uno de los eventos más tempranos de la organogénesis embrionaria. Durante el desarrollo embrionario, el plexo vascular primario se genera *de novo* mediante un proceso denominado vasculogénesis. En este proceso, células precursoras mesodérmicas, mediante procesos de diferenciación y unión celular, originan una red vascular primaria (Risau and Flamme, 1995). Posteriormente, esta red vascular primaria es remodelada mediante procesos de angiogénesis, definidos como la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros ya pre-existentes (Folkman, 1971), y procesos de regresión y “poda” de vasos sanguíneos, eliminándose así los vasos innecesarios (Risau, 1997). En el individuo adulto, la mayoría de los vasos permanecen quiescentes, pero las células endoteliales mantienen la capacidad de recibir y responder a estímulos angiogénicos. Por lo tanto, es necesario que exista un balance entre factores pro- y anti- angiogénicos durante la homeostasis vascular. Así, en el adulto, la angiogénesis se restringe a determinadas condiciones fisiológicas, como

la cicatrización de heridas, el ciclo menstrual o el desarrollo de la placenta durante el embarazo (Hoeben *et al.*, 2004). Sin embargo, las alteraciones en el potencial angiogénico están asociadas a múltiples enfermedades, como la artritis, psoriasis, el Alzheimer o el cáncer (Schmidt and Carmeliet, 2011).

Hasta la fecha, los mecanismos moleculares que regulan la vasculogénesis y la angiogénesis han sido ampliamente estudiados. La formación de nuevos capilares y la remodelación de los vasos preexistentes requieren la regulación coordinada de procesos celulares como la proliferación, migración y diferenciación. Por ello, las vías de señalización que regulan estos procesos suelen estar a su vez reguladas, aguas arriba, por factores de transcripción. En este sentido, los miembros de la familia de p53 son factores de transcripción fundamentales en la coordinación de estos procesos celulares. En particular, p53 ha sido descrito como un potente inhibidor de la angiogénesis tumoral en condiciones de hipoxia prolongada mediante la inhibición indirecta de VEGF, un factor pro-angiogénico fundamental (Teodoro *et al.*, 2007). Sin embargo, también se ha descrito que p53 es necesario para la inducción de VEGF durante la fase temprana de la angiogénesis (Farhang Ghahremani *et al.*, 2013).

La función de p73 en angiogénesis ha sido menos estudiada y los datos existentes son contradictorios. Por un lado, Salimath y colaboradores proponen que p73 es un regulador negativo de VEGF, en ausencia de p53 (Salimath *et al.*, 2000). Por otro lado, otras publicaciones describen a p73 como un factor pro-angiogénico en otros contextos celulares, especialmente en presencia de p53 (Guan *et al.*, 2003; Vikhanskaya *et al.*, 2001). Además, la función de p73 en angiogénesis nunca ha sido estudiada en un contexto fisiológico o en células no transformadas. Tampoco se ha estudiado su posible función en la diferenciación de progenitores mesodérmicos a células endoteliales y la formación de estructuras vasculares *in vitro*, procesos representativos de la vasculogénesis. Por ello, decidimos utilizar las líneas celulares iPSCs generadas como modelo celular *in vitro* e *in vivo* para analizar el efecto de la falta de p73 en la diferenciación endotelial, la vasculogénesis y la angiogénesis.

## **A) Generación de células endoteliales a partir de precursores mesodérmicos**

Como se ha comentado, las ESCs e iPSCs son capaces de generar células de las tres capas germinales cuando se cultivan en condiciones de diferenciación apropiadas, como, por ejemplo, la formación de agregados tridimensionales o EBs en ausencia de LIF. La estructura tridimensional de los EBs recapitula las interacciones multicelulares que ocurren en el embrión y facilita la determinación celular generándose tejidos ectodérmicos, mesodérmicos y endodérmicos. Sin embargo, es posible dirigir la

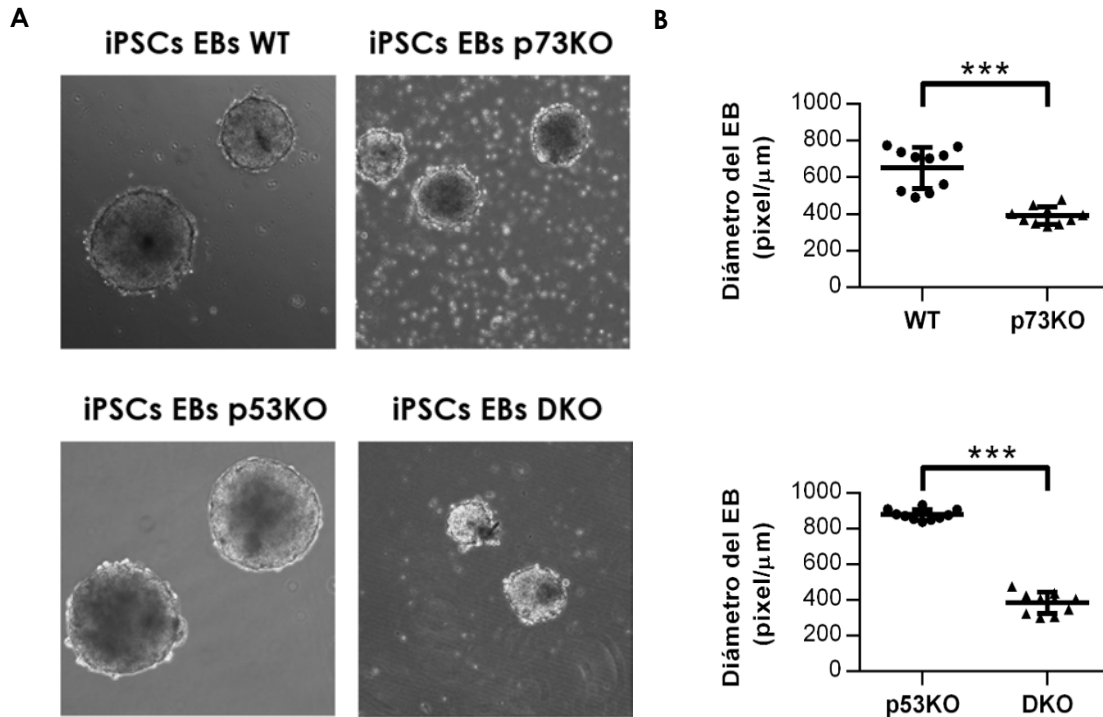
diferenciación hacia un linaje particular utilizando matrices celulares y medios de cultivo químicamente definidos que recapitulen las condiciones del nicho de las células progenitoras de dicho linaje. En este sentido, se ha demostrado que el cultivo de los EBs embebidos en un gel de colágeno I en presencia del factor pro-angiogénico VEGF, favorece la diferenciación endotelial en un contexto semejante al que se desarrolla durante la formación vascular *in vivo* (Magnusson *et al.*, 2004; Vittet *et al.*, 1996). Se ha descrito que la diferenciación de células ESCs/iPSCs, mediante la formación de EBs, recapitulan los estadios tempranos del desarrollo embrionario de manera que a partir del día 2, se generan precursores mesodérmicos que darán lugar a células que expresan la quinasa de hígado fetal (Flk1+, *fetal liver kinase 1*), con capacidad de diferenciación hemangioblástica, las cuales generarán células endoteliales (Liu *et al.*, 2013a).

Para determinar el efecto de la falta de p73, en presencia o ausencia de p53, en la diferenciación endotelial llevamos a cabo experimentos de diferenciación de EBs 3D con las iPSCs WT, p73KO, p53KO y DKO y analizamos la morfología, el tamaño y la expresión de CD31 como marcador endotelial.

Se ha demostrado que tamaño y morfología de los EBs son parámetros que afectan su potencial de diferenciación. Por ello, evaluamos la morfología de los EBs en suspensión y observamos que los EBs WT y p53KO constituían esferas homogéneas con una superficie regular con borde definido, reflejando la compactación de las células que conforman el EB. Sin embargo, los EBs carentes de p73 mostraban una superficie irregular, encontrándonos en el medio de cultivo muchas células muertas en suspensión, revelando posibles defectos en la compactación del EB (Figura 59.A).

Por otro lado, el tamaño del EB actúa como un determinante del destino celular (Park *et al.*, 2007) que puede ser considerado como un indicador de la eficiencia del proceso de diferenciación endotelial en el EB. Por ello, medimos el diámetro de los EBs en suspensión (Figura 59.B) y observamos que el diámetro de los EBs p73KO o DKO era menor con respecto a los EBs WT o p53KO, sugiriendo que p73 es necesario para que la generación de células endoteliales a partir de iPSCs sea eficiente. Estos resultados confirmaron datos obtenidos en nuestro grupo indicando que la inhibición funcional de p73 en ESCs resultaba en una disminución significativa en la generación de células Flk1+ y en la eficiencia de la diferenciación endotelial (Fernandez-Alonso *et al.*, 2015).





**Figura 59. La falta de p73 genera EBs de pequeño tamaño y morfología irregular. A)** Morfología y tamaño de los EBs en suspensión. Se muestran imágenes de contraste de fases para cada genotipo. Objetivo: 10X. **B)** Diámetro medio de los EBs en el día 4 del proceso de diferenciación. Los datos representan la media  $\pm$  SEM; n=10, los experimentos se repitieron al menos tres veces por genotipo; las diferencias estadísticas se evaluaron mediante la prueba t de Student: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

Anteriormente hemos demostrado que la falta de p73 en células iPSCs (p73KO y DKO), resulta en una disminución de los niveles de E-cadherina en las condiciones de cultivo de mantenimiento de pluripotencia (Figura 31). Este hecho podría explicar los defectos en compactación, ya que se ha descrito que la E-cadherina es la principal molécula de adhesión celular responsable de la formación y compactación del EB. De hecho, las mESCs carentes de E-cadherina pierden los contactos que se establecen célula-célula (Larue *et al.*, 1996), afectándose la formación del EB en suspensión (Dang *et al.*, 2004; Fok and Zandstra, 2005). Además, la eliminación total (Gaspar-Maia *et al.*, 2009) o parcial (Patti *et al.*, 2015) de E-cadherina resulta en una disminución y/o retraso en la generación de linajes celulares de estirpe mesodérmica. Por ello, podríamos hipotetizar que los bajos niveles de E-cadherina detectados en iPSCs carentes de p73 podrían tener como consecuencia una atenuación de la capacidad de estas células para generar precursores mesodérmicos.

Por otro lado, se ha descrito que para la generación de precursores mesenquimales a partir de ESCs, mediante la formación de EBs, es necesario que se produzca una transición epitelio-mesénquima (Li *et al.*, 2014; Lindsley *et al.*, 2006). La alteración de esta vía de señalización, mediada por WNT, afecta la capacidad de las ESCs para generar

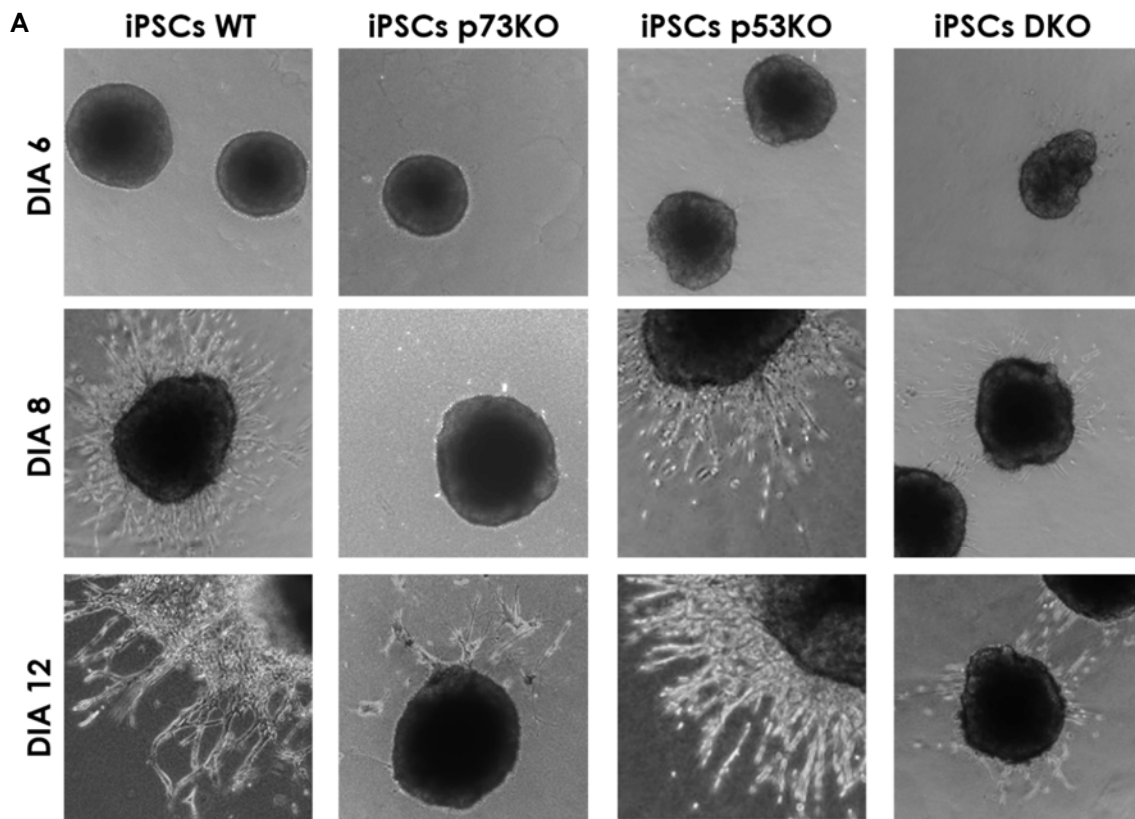
precursores mesodérmicos que expresen el receptor de VEGF-A (Flk1<sup>+</sup>) y la subsecuente maduración de estos para generar los distintos linajes (Lindsley *et al.*, 2006). En este sentido, hemos descrito que la falta de p73 afecta la correcta regulación de los procesos de transición epitelio-mesénquima y mesénquima-epitelio que ocurren durante el proceso de reprogramación mediados por la señalización de la vía BMP (Figura 42 y 45). Esto indica que p73 es necesario para modular el paso bidireccional de EMT-MET y, es factible pensar que, esta función de p73 podría ser también necesaria durante la diferenciación de ESCs. Sin embargo, sería necesario estudiar más a fondo, si p73 tiene una función durante la formación del EB (compactación) y posterior transición epitelio-mesénquima mediada por WNT durante la diferenciación de células iPSCs.

## **B) Diferenciación de células endoteliales y morfogénesis vascular *in vitro***

En particular, el sistema de diferenciación tridimensional, no solo permite analizar la diferenciación de progenitores a células endoteliales y la formación de una red primaria de vasos en el EB semejante al proceso de vasculogénesis, sino que también permite analizar la formación de brotes vasculares por procesos angiogénicos (Claesson-Welsh and Welsh, 2013).

En este contexto, a día 3 de la diferenciación se observan indicios de vasculogénesis en los EBs, como son precursores que expresan *T-cell acute leukemia/stem cell leukemia (TAL/SCL)*, Flk-1 y Brachyury (Choi *et al.*, 1998). Estos precursores sufren un proceso de maduración y finalmente expresan un conjunto de marcadores endoteliales como son Flk-1, CD31, VE-Cadherina, TIE1 y TIE2. El plexo vascular inicial se remodela a partir del día 6 por medio de angiogénesis. Alrededor del día 8 del proceso de diferenciación, comienza a detectarse la angiogénesis invasiva en los geles de colágeno 3D mediante la formación de brotes vasculares partiendo del centro del EB. Dichos brotes se ramifican, se rodean de células murales y aparece la membrana basal (Jakobsson and Claesson-Welsh, 2008). Se ha detectado formación de lumen vascular alrededor del día 10 y algunos EBs llegan a desarrollar un lumen maduro en el día 12 (Jakobsson *et al.*, 2007; Li and Claesson-Welsh, 2009). Todos estos pasos en el proceso de diferenciación de los EBs recapitulan los procesos que tienen lugar durante la embriogénesis.

Se analizó la formación de brotes vasculares mediante observaciones morfológicas diarias con un microscopio de contraste de fases (Figura 60.A).



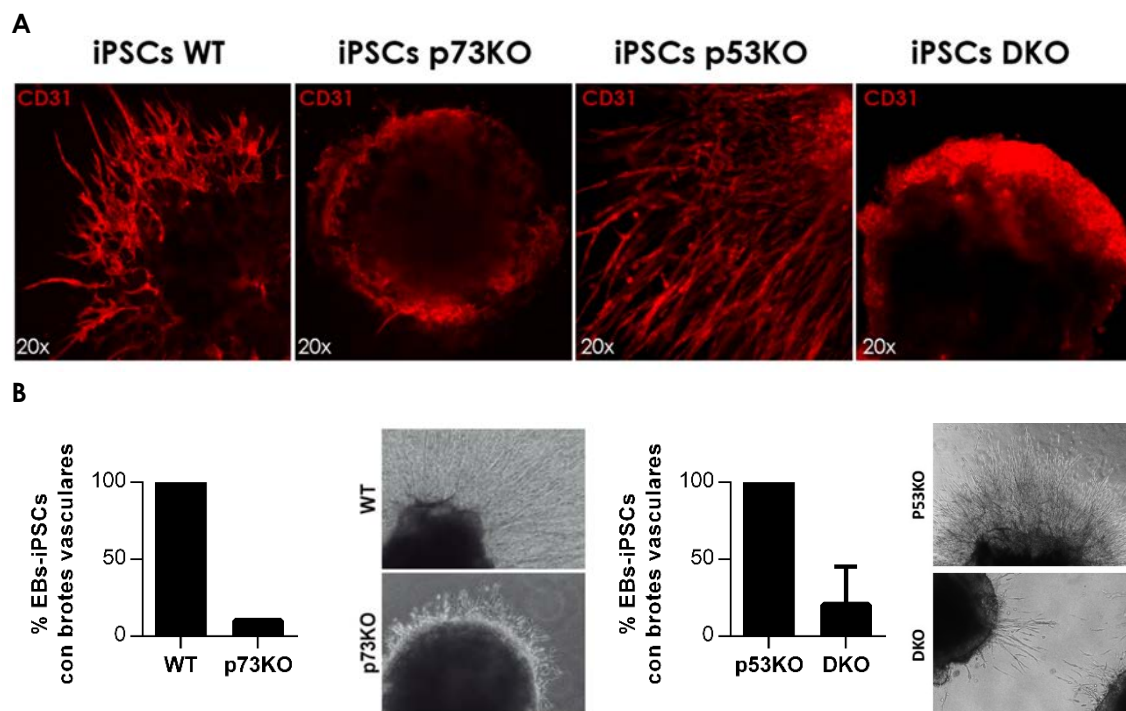
**Figura 60. La falta de p73, incluso en el contexto de ausencia de p53, impide la formación de brotes vasculares.**  
**A)** Imágenes en contraste de fases de la formación de estructuras vasculares en EBs embebidos en colágeno I a los días 6, 8 y 12 de la diferenciación endotelial *in vitro*. Objetivo: 20X.

Los EBs formados después de 4 días en gota colgante se sembraron directamente entre dos capas de colágeno (Jakobsson *et al.*, 2006). La formación de estructuras vasculares se monitorizó mediante microscopía de contraste de fases en los días 6, 8 y 12 durante el proceso de diferenciación. Los EBs WT y p53KO incrementaron de tamaño gradualmente hasta el día 6. A partir del día 8 del proceso, comenzaron a generar brotes vasculares, los cuales aumentaron su grosor y se ramificaron de forma gradual hasta llegar a formar una red de brotes más compleja. Después de 12 días en cultivo, los vasos de los EBs WT presentaron una acentuada reticulación en la que se observaba la fusión de algunos formando lazos o bucles vasculares entre sí (Figura 60.A). Los EBs p53KO formaron unos brotes más alargados y radiales, y menos gruesos y ramificados que los WT (Figura 60.A), indicando, posiblemente, una mayor capacidad de migración que las células WT, y un mayor potencial angiogénico en ausencia de p53, confirmando el potencial anti-angiogénico de p53 (Teodoro *et al.*, 2007). Por el contrario, los EBs p73KO y DKO, a pesar de incrementar su tamaño durante el proceso, en general eran incapaces de generar brotes vasculares. En el caso de los DKO, a día 12 del proceso, en algunos EBs se observaba la aparición de brotes pequeños muy cortos que no daban lugar a la red ramificada de brotes vasculares observada en los

EBs WT y p53KO. Por lo tanto, los datos indican que la falta de p73 limita la capacidad de formación de brotes vasculares *in vitro*.

Para determinar la naturaleza vascular de las estructuras observadas durante el proceso de diferenciación endotelial, analizamos la expresión del marcador endotelial CD31 mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal y observamos que los EBs de todos los genotipos presentaban células CD31<sup>+</sup> (Figura 61. A).

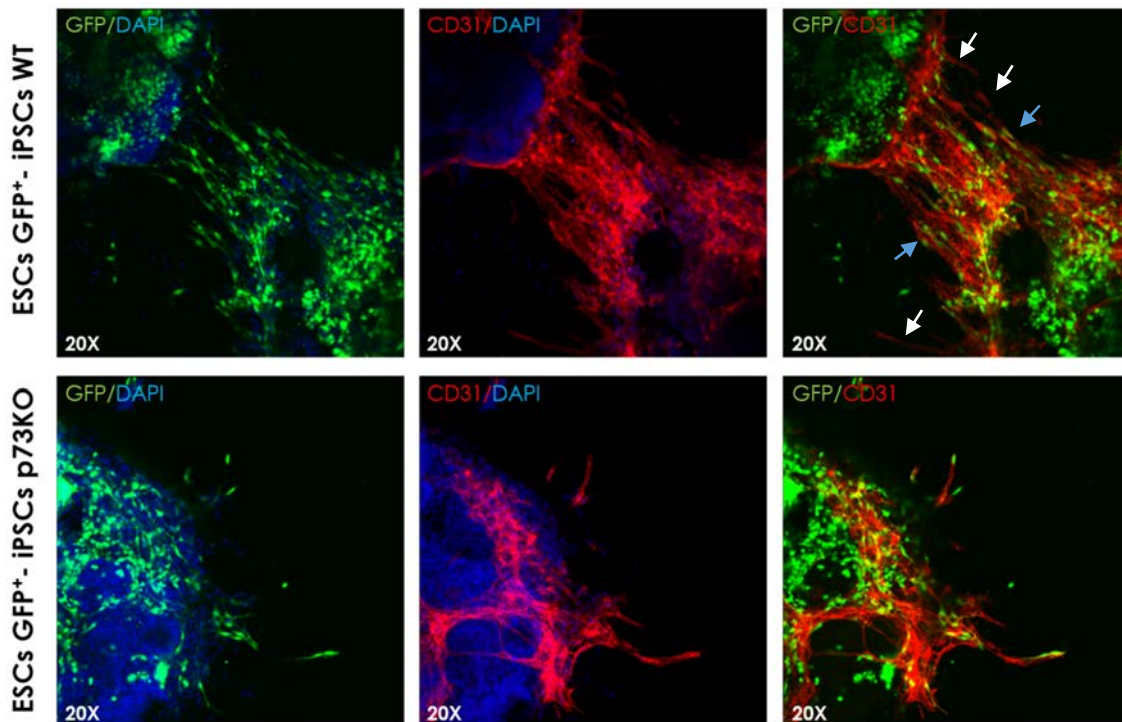
Por el contrario, las células carentes de p73, a pesar de ser CD31<sup>+</sup>, no eran capaces de formar brotes vasculares. La cuantificación de EBs con brotes vasculares demostró que un porcentaje significativamente menor de los EBs p73KO y DKO, eran capaces de formar brotes (Figura 61.B). Solamente en algunos clones se pudieron observar pequeños brotes, pero estos eran en general cortos y engrosados en sus extremos, incapaces de emerger para constituir la red ramificada de brotes vasculares (Figura 61.B), demostrando que p73 es necesario para la formación de brotes vasculares.



**Figura 61. Las iPSCs carentes de p73, incluso en el contexto de ausencia de p53, se diferencian a células CD31<sup>+</sup> incapaces de formar brotes vasculares. A)** Inmunofluorescencia contra el marcador endotelial CD31 (rojo) en EBs WT, p73KO, p53KO y DKO embebidos en colágeno I, en el día 12 de la diferenciación endotelial *in vitro*. Objetivo: 20X. **B)** Gráfico de barras, que representa el porcentaje de EBs con brotes vasculares, e imágenes en contraste de fases de los EBs de los distintos genotipos a día 12. Objetivo: 10X

A continuación, se quiso comprobar si el efecto observado de las células carentes de p73 en la formación de brotes vasculares, era debido a un efecto autónomo (*cell autonomous*), o, por el contrario, la falta de p73 podía inducir a otras células, a pesar de su genotipo, a exhibir un fenotipo mutante (*non-cell autonomous*).

Para ello, se realizó un co-cultivo de células mESCs-GFP<sup>+</sup> (células HM1 que expresan de forma estable GFP) junto con iPSCs WT o p73KO, en una proporción 30:70 (30 % ESCs:70 % iPSCs). Estos co-cultivos se diferenciaron bajo condiciones específicas de diferenciación endotelial 3D (Figura 62). Observamos que, en los EBs formados por ESCs GFP<sup>+</sup>-iPSCs WT, ambos tipos celulares, GFP<sup>+</sup> (Figura X flecha azul) y GFP<sup>-</sup> (Figura 62 flecha blanca), eran capaces de diferenciarse a células endoteliales y formar estructuras vasculares. En los cultivos GFP<sup>+</sup>-iPSCs p73KO, detectamos muy pocos EBs con brotes vasculares, indicando que las iPSCs p73KO son capaces de afectar la formación de los brotes vasculares de las ESCs de ratón GFP<sup>+</sup>. Estos resultados demuestran que la falta de p73 tiene un efecto *non cell autonomous* en angiogénesis, y que este efecto es dominante. Esto podría ser debido a la secreción de factores inhibidores de la angiogénesis al medio, afectando así a las células ESCs GFP<sup>+</sup>, sin embargo, se requerirán experimentos adicionales para determinar la naturaleza de este efecto.



**Figura 62. La falta de p73 impide la formación de estructuras vasculares y ejerce un efecto *non cell autonomous* en el potencial angiogénico de las iPSCs.** Co-cultivos de mESCs GFP<sup>+</sup> junto con iPSCs WT o iPSCs p73KO en una proporción 30:70, e inmunofluorescencia contra CD31 (rojo) y GFP (verde). Las flechas blancas indican CD31<sup>+</sup>/GFP<sup>-</sup>, y las flechas azules indican CD31<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup>. Objetivo:20X.

En su conjunto nuestros datos demuestran que p73 es necesario, no solo para la generación de células endoteliales a partir de iPSCs, pero además es necesario para la funcionalidad de dichas células en la formación de brotes vasculares (*sprouting angiogenesis*). La formación de brotes vasculares es un proceso fundamental en el establecimiento de la red vascular durante el desarrollo. Este proceso es un ejemplo de

la coordinación celular en al cual grupos de células endoteliales, unidas por puentes de cadherina (uniones adherentes) y atendiendo a señales pro-angiogénicas, migrarán de manera conjunta (Wimmer *et al.*, 2012). Por ello, la incapacidad de formar brotes vasculares en ausencia de p73 puede ser, por una parte, un reflejo de un potencial angiogénico atenuado que afecta la migración de las células endoteliales, y/o, por otra parte, un defecto en la capacidad de estas células de establecer uniones adherentes entre ellas o establecer las señales mecánicas necesarias para dicho movimiento coordinado. Estos dos escenarios no tienen por qué ser excluyentes. Estudios realizados en paralelo en nuestro grupo demostraron que p73, en particular  $\Delta Np73$ , es necesario para establecer el potencial angiogénico, regulando las vías de TGF- $\beta$  y VEGF, por lo que la falta de p73 afectaba la capacidad de migración de células endoteliales (Fernandez-Alonso *et al.*, 2015). Sin embargo, se requerirán estudios adicionales que permitan esclarecer la función de p73 en la adhesión celular y la migración coordinada de las células endoteliales.

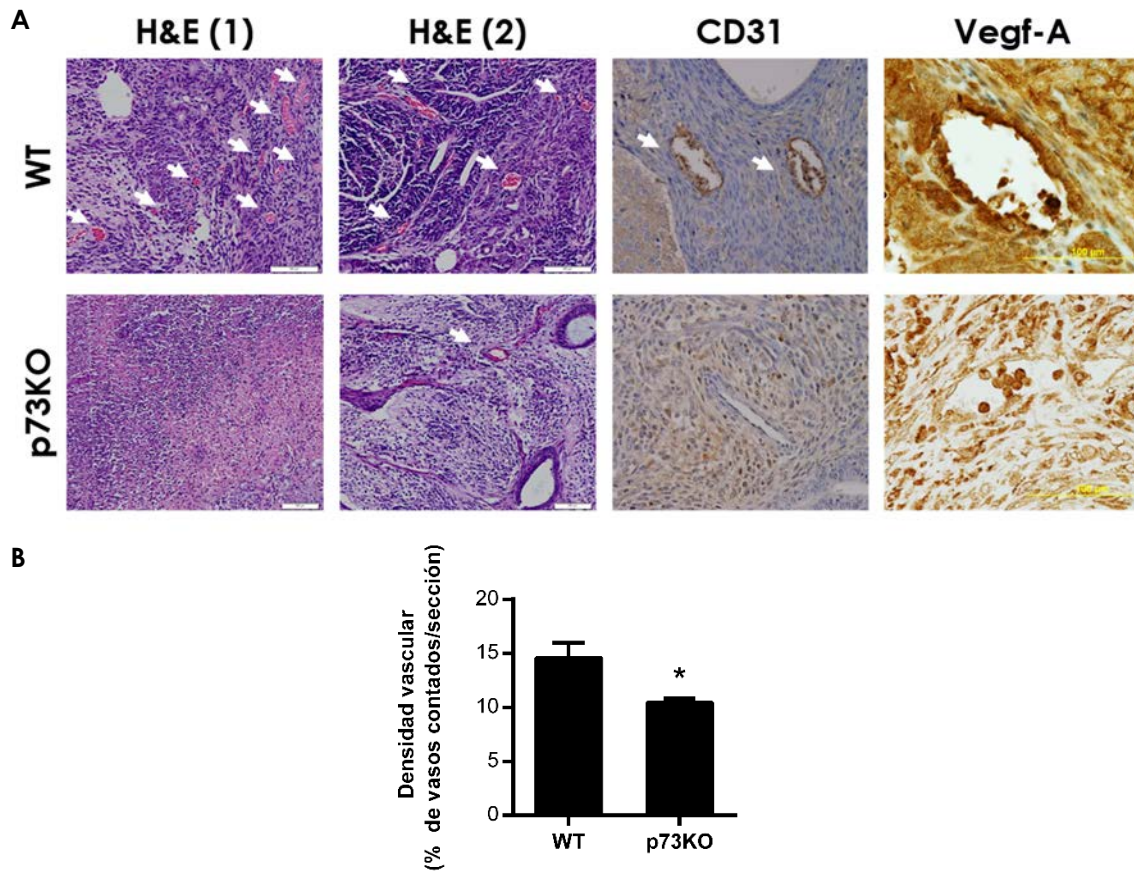
Es importante resaltar que estos datos fueron recogidos como parte de un artículo científico publicado en la revista *Cell Death and Differentiation* (ver Anexo): “p73 is required for endothelial cell differentiation, migration and the formation of vascular networks regulating VEGF and TGF $\beta$  signaling.” Fernandez-Alonso R.\*, Martin-Lopez, M.\*, Gonzalez-Cano L., Garcia- S., Castrillo F., Diez-Prieto I., Fernandez-Corona A., Lorenzo-Marcos ME., Li X., Claesson-Welsh L., Marques, M.M. & Marin, M.C. (2015), doi: 10.1038/cdd.2014.214 (\*igual contribución).

### C) Diferenciación endotelial y angiogénesis *in vivo*

Los resultados obtenidos en nuestros experimentos *in vitro* nos indican que p73 cumple una función relevante en el proceso de diferenciación endotelial, vasculogénesis y angiogénesis.

Para determinar la función de p73 en la formación de vasos *in vivo* analizamos los teratomas formados por las iPSCs WT y p73KO en ratones NSG.

Se cuantificaron las células endoteliales identificadas por la expresión de CD31 y VEGF, dentro de los teratomas, por ser las células que forman parte de la vasculatura funcional del tumor (Li *et al.*, 2009b) (Figura 63.A). Los resultados revelaron que los teratomas carentes de p73 tenían menos densidad vascular que los WT y que, además, la expresión de VEGF-A, estaba atenuada (Figura 63.A y 63.B), indicando que la formación de nuevos vasos sanguíneos dentro del tumor es significativamente menor en los teratomas carentes del gen *Trp73*, demostrando que p73 tiene una función esencial en el establecimiento de la angiogénesis *in vivo*.



**Figura 63. p73 es necesario para la angiogénesis tumoral.** Tumores de iPSCs WT y p73KO inyectados subcutáneamente en ratones NSG. Se marcaron con hematoxilina-eosina (H&E), CD31 y VEGFA. Las puntas de flechas indican vasos sanguíneos detectados con tinción H&E y CD31. Escala: 100  $\mu$ m. La densidad vascular se cuantificó contando las estructuras de los vasos CD31 midiendo 10 campos por sección, 5 secciones por genotipo,  $n > 3$  para WT y  $n > 4$  para p73KO. Se realizaron 2 inyecciones por ratón, 2 ratones por clon; Los datos representan la media  $\pm$  SEM. Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante la prueba t de Student: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

Estos datos han sido incluidos en un artículo científico en colaboración con el grupo del Dr. Sapapathy del *Institute of Cancer Research, National Cancer Centre* (Singapur), publicado en la revista *Nature Cell Biology* (ver Anexo) "Hypoxia-inducible TAp73 supports tumorigenesis by regulating the angiogenic transcriptome" Dullo I, Phan BH, Tan SY, Vijayaraghavan A, Goh KL, Martin-Lopez M, Marques MM, Li CW, Wang de Y, Marin MC, Xian W, McKeon F, Sabapathy K. (2015) 17:511-23, doi: 10.1038/ncb3130.

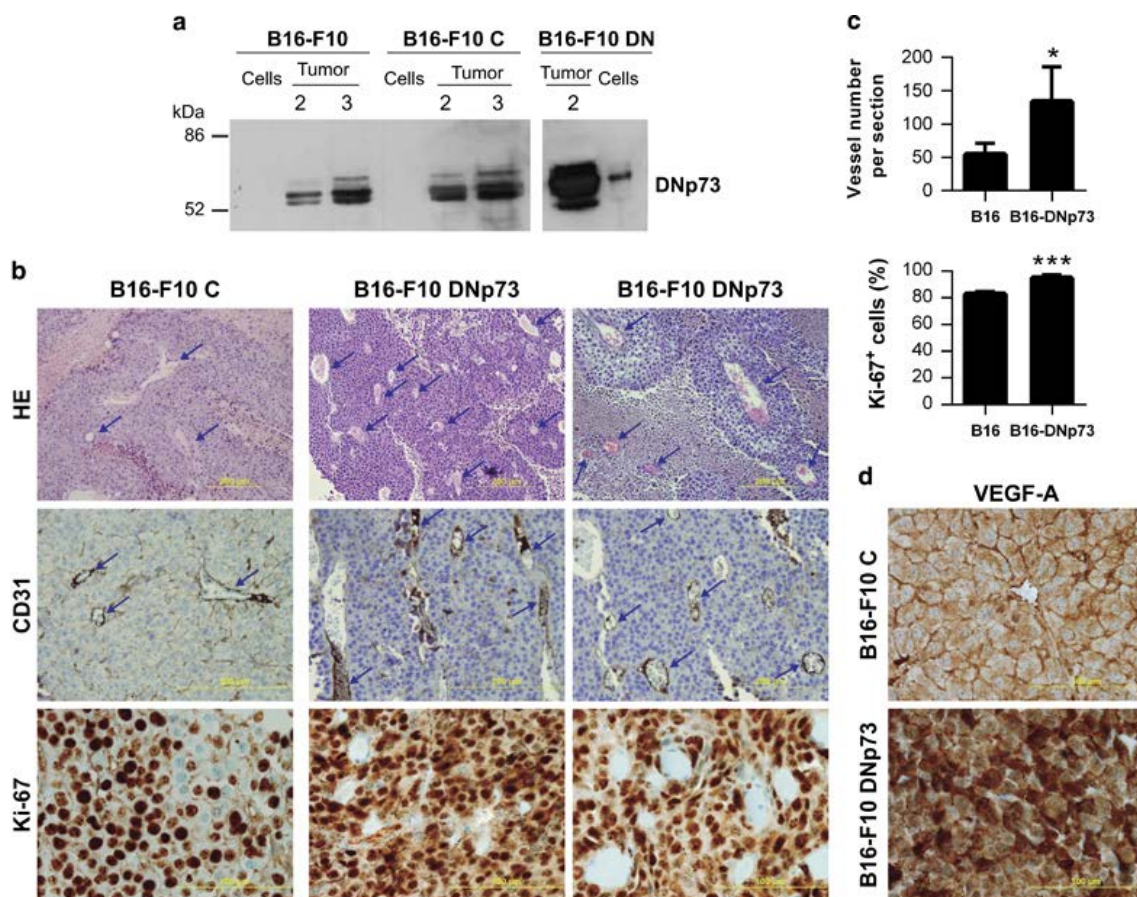
El proceso de angiogénesis es fundamental en la progresión tumoral. En particular, se ha identificado un evento durante la misma, denominado "angiogenic switch" o interruptor angiogénico, durante el cual el tumor adquiere la capacidad de estimular la formación de nuevos vasos debido a un cambio que favorece la producción de factores pro-angiogénicos (Hanahan and Folkman, 1996). Esta vascularización del tumor es esencial para su crecimiento exponencial y se lleva a cabo, mayoritariamente

mediante la formación de brotes vasculares (*sprouting angiogenesis*), por lo que la supresión de este proceso se ha convertido en una diana terapéutica muy importante.

Por tanto, quisimos saber si p73 era necesario para modular el potencial angiogénico de un tumor maligno. Como se discutió en el apartado 1.2.2.C, las iPSCs WT y p73KO forman teratomas en su mayor parte benignos, por lo que se utilizó un modelo de tumor singénico maligno (línea celular de melanoma B16 trasplantados en ratón C57BL/6J) (Fidler and Nicolson, 1976). Datos de nuestro grupo habían demostrado que la isoforma  $\Delta$ Np73 era la responsable del incremento en potencial angiogénico *in vitro* en células HUVEC (Trabajo fin de master de Dña. Sara García Alonso). Por ello se planteó analizar la función de esta isoforma en la modulación del potencial angiogénico *in vivo* de células de melanoma B16.

Estas células son tumorigénicas y tiene un alto índice proliferativa (Fidler and Nicolson, 1976). Estos experimentos se hicieron en colaboración con el Sr. Francisco Castrillo y el Servicio de Anatomía Patológica del Complejo Hospitalario de León. Se generaron células B16 con expresión constitutiva de  $\Delta$ Np73 o con vector vacío y se inyectaron en ratones C57BL/6J (Figura 64). Los tumores obtenidos se disecaron y se analizaron los niveles de  $\Delta$ Np73, observando que  $\Delta$ Np73 se estabiliza en el microambiente tumoral. El análisis de la densidad vascular, la proliferación y la expresión de VEGF en los tumores generados reveló que la sobreexpresión de  $\Delta$ Np73 incrementaba significativamente el potencial angiogénico de las células B16 (Figura 64.B, 64.C y 64.D).





**Figura 64. La expresión de ΔNp73 en la línea celular de melanoma de ratón B16-F10 resulta en un incremento de la vascularización del tumor. A)** Expresión de ΔNp73 en extractos de células B16-F10 y extractos de tumor derivados de ratón singénico. Las células parentales B16-F10, o clones estables transfectados con ΔNp73 (B16-F10 DN) o vector control (B16-F10 C) fueron inyectadas en ratones C57BL/6 y los tumores fueron extraídos después del número de semanas indicado (2 y 3). **B)** Análisis de histología e inmunohistoquímica de secciones de tejido de melanomas embebidos en parafina. La tinción de hematoxilina y eosina (HE), así como anti-CD31 revelaron un incremento en la densidad vascular (flechas azules) en las secciones B16-F10 DN. Se muestra también la expresión del antígeno de proliferación Ki67. Escala de las barras=500 μm (HE y CD31); 100 μm (Ki-67). **C)** Cuantificación del número de vasos y de células Ki67+ (se contaron 10 campos por sección; 5 secciones por genotipo de las imágenes en B). **D)** Expresión de VEGF-A en secciones de parafina de melanomas B16-F10 y B16-F10 DN.

El conjunto de estos datos demuestra por primera vez que p73 es necesario para la angiogénesis, tanto *in vitro* como *in vivo*, indicando que la sobreexpresión de ΔNp73 proporciona una ventaja positiva para la progresión del tumor debido a su capacidad pro-angiogénica.

Asimismo, se demuestra por primera vez que p73 es necesario para la correcta reprogramación de las células somáticas y que esta función es antagónica a la función de p53. Teniendo en cuenta que en los últimos años se ha propuesto una estrecha relación entre la reprogramación celular y el cáncer, ya que se establece un vínculo entre la pérdida de diferenciación con la inducción de la pluripotencia y la formación de tumores (Trosko 2014), podemos pensar que, si p73 es necesario para el proceso de reprogramación, esto podría explicar por qué p73, a pesar de ser un supresor tumoral,

su función no es eliminada en la mayoría de los tumores. Por ello, los datos presentados en este proyecto Doctoral son de gran relevancia, ya que la familia de p53 tiene interesantes implicaciones terapéuticas. De este modo, entender los mecanismos que regulan el proceso de reprogramación celular contribuye a descifrar los procesos implicados en la tumorigénesis.

Finalmente, durante el desarrollo de este trabajo se ha generado un nuevo modelo celular *in vitro*, que puede ser una alternativa excelente a los modelos utilizados hasta la fecha en el laboratorio, siendo una herramienta muy útil para poder estudiar la función de *Trp53* y *Trp73* durante los procesos de diferenciación celular o para la búsqueda futura de fármacos anti-tumorales específicos. En definitiva, este trabajo de investigación aporta un conocimiento esencial en la regulación del proceso de reprogramación celular y su posible implicación en cáncer, con la relevancia que esto tiene tanto a nivel básico como a nivel aplicado.



# Conclusiones



**OBJETIVO 1. Análisis del papel del gen *Trp73*, y su relación funcional con el gen *Trp53*, en el proceso de reprogramación celular y en el mantenimiento de la auto-renovación y la pluripotencia.**

**PRIMERA.** *Trp73* es necesario para llevar a cabo el proceso de reprogramación celular de forma eficiente con cuatro factores de reprogramación (OSKM) y, especialmente, con tres factores de reprogramación (OSK).

**SEGUNDA.** La falta del gen *Trp53* acelera la cinética e incrementa la eficiencia del proceso de reprogramación celular tanto con cuatro factores de reprogramación (OSKM) como con tres factores de reprogramación (OSK).

**TERCERA.** La función de p73 es necesaria incluso en ausencia de las barreras normalmente reguladas por p53.

**CUARTA.** El efecto observado en ausencia de p73 no es el resultado de una activación compensatoria de p53.

**QUINTA.** p73 es necesario para obtener iPSCs totalmente reprogramadas y con un estado de pluripotencia completo.

**SEXTA.** La falta de p73 no afecta a la pluripotencia *in vivo*.

**SÉPTIMA.** La ausencia de p53 genera teratocarcinomas muy poco diferenciados. En este contexto, la falta de p73 sólo rescata parcialmente el fenotipo.

**OBJETIVO 2. Identificación de los mecanismos moleculares regulados por el gen *Trp73* durante el proceso de reprogramación celular.**

**OCTAVA.** La falta de p73 afecta la activación de la vía de BMP inducida por los factores OSKM, alterando la transición mesénquima-epitelio durante la fase de iniciación del proceso de reprogramación, y resultando en una fase de maduración y estabilización defectuosas.

**NOVENA.** TAp73 y  $\Delta$ Np73 son moduladores positivos de la vía de señalización de BMP.

**DÉCIMA.** SMAD6 es una nueva diana transcripcional directa de  $\Delta$ Np73.

**DECIMOPRIMERA.**  $\Delta$ Np73 actúa reprimiendo transcripcionalmente la expresión de SMAD6 mediante la unión a un elemento de respuesta a p53 (p53RE) identificado en el promotor de SMAD6.

**OBJETIVO 3. Estudio de la función del gen *Trp73* en la generación de células de estirpe mesodérmica a partir de líneas celulares pluripotentes inducidas (iPSCs).**

**DECIMOSEGUNDA.** En un modelo *in vitro* que recapitula el proceso de vasculogénesis (células iPSCs), p73 es necesario para la generación de células endoteliales funcionales y para la formación de estructuras vasculares.

**DECIMOTERCERA.** La falta de p73 en células endoteliales, diferenciadas a partir de iPSCs, tiene como resultado la generación de algún factor que ejerce un efecto dominante, *non cell autonomous*, sobre células de genotipo silvestre.

**DECIMOCUARTA.** La función de p73 es necesaria en el establecimiento del potencial angiogénico de células tumorales.

**DECIMOQUINTA.**  $\Delta$ Np73 es un regulador positivo de la angiogénesis tumoral en un modelo de trasplante singénico.





# Referencias



- 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. *Nature biotechnology* 26, 1276-1284.
- Abdelalim, E.M., and Tooyama, I. (2014). Knockdown of p53 suppresses Nanog expression in embryonic stem cells. *Biochemical and biophysical research communications* 443, 652-657.
- Alexandrova, E.M., Talos, F., and Moll, U.M. (2013). p73 is dispensable for commitment to neural stem cell fate, but is essential for neural stem cell maintenance and for blocking premature differentiation. *Cell death and differentiation* 20, 368-368.
- Aloia, L., Di Stefano, B., and Di Croce, L. (2013). Polycomb complexes in stem cells and embryonic development. *Development (Cambridge, England)* 140, 2525-2534.
- Alvarez, S., Drane, P., Meiller, A., Bras, M., Deguin-Chambon, V., Bouvard, V., and May, E. (2006). A comprehensive study of p53 transcriptional activity in thymus and spleen of gamma irradiated mouse: high sensitivity of genes involved in the two main apoptotic pathways. *International journal of radiation biology* 82, 761-770.
- Allocati, N., Di Ilio, C., and De Laurenzi, V. (2012). p63/p73 in the control of cell cycle and cell death. *Experimental cell research* 318, 1285-1290.
- Apostolou, E., and Hochedlinger, K. (2013). Chromatin dynamics during cellular reprogramming. *Nature* 502, 462-471.
- Araki, R., Jincho, Y., Hoki, Y., Nakamura, M., Tamura, C., Ando, S., Kasama, Y., and Abe, M. (2010). Conversion of ancestral fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 28, 213-220.
- Arfaoui, A.T., Ben Mahmoud, L.K., Ben Hmida, A., Khiari, M., Mohamed, A.L., Chaar, I., Khalfallah, T., Regaya, S.M., and Bouraoui, S. (2010). Relationship between p73 polymorphism and the immunohistochemical profile of the full-length (TAp73) and NH2-truncated (DeltaNp73) isoforms in Tunisian patients. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM / official publication of the Society for Applied Immunohistochemistry* 18, 546-554.
- Arkell, R.M., and Tam, P.P. (2012). Initiating head development in mouse embryos: integrating signalling and transcriptional activity. *Open biology* 2, 120030.
- Armesilla-Diaz, A., Bragado, P., Del Valle, I., Cuevas, E., Lazaro, I., Martin, C., Cigudosa, J.C., and Silva, A. (2009). p53 regulates the self-renewal and differentiation of neural precursors. *Neuroscience* 158, 1378-1389.
- Armstrong, J.F., Kaufman, M.H., Harrison, D.J., and Clarke, A.R. (1995). High-frequency developmental abnormalities in p53-deficient mice. *Current biology : CB* 5, 931-936.
- Attisano, L., and Wrana, J.L. (2002). Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science (New York, NY)* 296, 1646-1647.
- Augustin, M., Bamberger, C., Paul, D., and Schmale, H. (1998). Cloning and chromosomal mapping of the human p53-related KET gene to chromosome 3q27 and its murine homolog Ket to mouse chromosome 16. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* 9, 899-902.
- Avilion, A.A., Nicolis, S.K., Pevny, L.H., Perez, L., Vivian, N., and Lovell-Badge, R. (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes & development* 17, 126-140.
- Azuara, V., Perry, P., Sauer, S., Spivakov, M., Jorgensen, H.F., John, R.M., Gouti, M., Casanova, M., Warnes, G., Merkenschlager, M., *et al.* (2006). Chromatin signatures of pluripotent cell lines. *Nature cell biology* 8, 532-538.

- Bai, S., Shi, X., Yang, X., and Cao, X. (2000). Smad6 as a transcriptional corepressor. *The Journal of biological chemistry* 275, 8267-8270.
- Bailey, S.G., Cragg, M.S., and Townsend, P.A. (2011). Family friction as DeltaNp73 antagonises p73 and p53. *The international journal of biochemistry & cell biology* 43, 482-486.
- Balboni, A.L., Cherukuri, P., Ung, M., DeCastro, A.J., Cheng, C., and DiRenzo, J. (2015). p53 and DeltaNp63alpha Coregulate the Transcriptional and Cellular Response to TGFbeta and BMP Signals. *Molecular cancer research : MCR* 13, 732-742.
- Balint, E., Phillips, A.C., Kozlov, S., Stewart, C.L., and Vousden, K.H. (2002). Induction of p57(KIP2) expression by p73beta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 3529-3534.
- 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 & development* 23, 2134-2139.
- Batlle, E., Sancho, E., Franci, C., Dominguez, D., Monfar, M., Baulida, J., and Garcia De Herreros, A. (2000). The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nature cell biology* 2, 84-89.
- Bedzhov, I., Graham, S.J., Leung, C.Y., and Zernicka-Goetz, M. (2014). Developmental plasticity, cell fate specification and morphogenesis in the early mouse embryo. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 369.
- Beederman, M., Lamplot, J.D., Nan, G., Wang, J., Liu, X., Yin, L., Li, R., Shui, W., Zhang, H., Kim, S.H., *et al.* (2013). BMP signaling in mesenchymal stem cell differentiation and bone formation. *Journal of biomedical science and engineering* 6, 32-52.
- Belyi, V.A., Ak, P., Markert, E., Wang, H., Hu, W., Puzio-Kuter, A., and Levine, A.J. (2010a). The Origins and Evolution of the p53 Family of Genes. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2, a001198.
- Belyi, V.A., Ak, P., Markert, E., Wang, H., Hu, W., Puzio-Kuter, A., and Levine, A.J. (2010b). The origins and evolution of the p53 family of genes. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2, a001198.
- Bellin, M., Marchetto, M.C., Gage, F.H., and Mummery, C.L. (2012). Induced pluripotent stem cells: the new patient? *Nature reviews Molecular cell biology* 13, 713-726.
- Ben-Porath, I., Thomson, M.W., Carey, V.J., Ge, R., Bell, G.W., Regev, A., and Weinberg, R.A. (2008). An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nature genetics* 40, 499-507.
- Bensaad, K., Le Bras, M., Unsal, K., Strano, S., Blandino, G., Tominaga, O., Rouillard, D., and Soussi, T. (2003). Change of conformation of the DNA-binding domain of p53 is the only key element for binding of and interference with p73. *The Journal of biological chemistry* 278, 10546-10555.
- Bergers, G., and Benjamin, L.E. (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature reviews Cancer* 3, 401-410.
- Bernard, H., Garmy-Susini, B., Ainaoui, N., Van Den Berghe, L., Peurichard, A., Javerzat, S., Bikfalvi, A., Lane, D.P., Bourdon, J.C., and Prats, A.C. (2013). The p53 isoform, Delta133p53alpha, stimulates angiogenesis and tumour progression. *Oncogene* 32, 2150-2160.

- Bernstein, B.E., Mikkelsen, T.S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D.J., Cuff, J., Fry, B., Meissner, A., Wernig, M., Plath, K., *et al.* (2006). A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* **125**, 315-326.
- Biegging, K.T., Mello, S.S., and Attardi, L.D. (2014). Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nature reviews Cancer* **14**, 359-370.
- Billon, N., Terrinoni, A., Jolicoeur, C., McCarthy, A., Richardson, W.D., Melino, G., and Raff, M. (2004). Roles for p53 and p73 during oligodendrocyte development. *Development (Cambridge, England)* **131**, 1211-1220.
- Blau, H.M., Chiu, C.P., and Webster, C. (1983). Cytoplasmic activation of human nuclear genes in stable heterocaryons. *Cell* **32**, 1171-1180.
- Boiani, M., and Scholer, H.R. (2005). Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. *Nature reviews Molecular cell biology* **6**, 872-881.
- Borsos, M., and Torres-Padilla, M.E. (2016). Building up the nucleus: nuclear organization in the establishment of totipotency and pluripotency during mammalian development. *Genes & development* **30**, 611-621.
- Bourdon, J.C., Fernandes, K., Murray-Zmijewski, F., Liu, G., Diot, A., Xirodimas, D.P., Saville, M.K., and Lane, D.P. (2005). p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes & development* **19**, 2122-2137.
- 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.
- Boyer, L.A., Mathur, D., and Jaenisch, R. (2006). Molecular control of pluripotency. *Current opinion in genetics & development* **16**, 455-462.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**, 248-254.
- 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.
- Briggs, R., and King, T.J. (1952). Transplantation of Living Nuclei From Blastula Cells into Enucleated Frogs' Eggs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **38**, 455-463.
- Brix, J., Zhou, Y., and Luo, Y. (2015). The Epigenetic Reprogramming Roadmap in Generation of iPSCs from Somatic Cells. *Journal of genetics and genomics = Yi chuan xue bao* **42**, 661-670.
- 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.
- Brosh, R., Assia-Alroy, Y., Molchadsky, A., Bornstein, C., Dekel, E., Madar, S., Shetzer, Y., Rivlin, N., Goldfinger, N., Sarig, R., *et al.* (2013). p53 counteracts reprogramming by inhibiting mesenchymal-to-epithelial transition. *Cell death and differentiation* **20**, 312-320.
- Buckley, Shannon M., Aranda-Orgilles, B., Strikoudis, A., Apostolou, E., Loizou, E., Moran-Crusio, K., Farnsworth, Charles L., Koller, Antonius A., Dasgupta, R., Silva, Jeffrey C., *et al.* (2012). Regulation of Pluripotency and Cellular Reprogramming by the Ubiquitin-Proteasome System. *Cell stem cell* **11**, 783-798.

- Buecker, C., Srinivasan, R., Wu, Z., Calo, E., Acampora, D., Faial, T., Simeone, A., Tan, M., Swigut, T., and Wysocka, J. (2014). Reorganization of enhancer patterns in transition from naive to primed pluripotency. *Cell stem cell* *14*, 838-853.
- 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.
- Buhlmann, S., and Putzer, B.M. (2008). DNp73 a matter of cancer: mechanisms and clinical implications. *Biochim Biophys Acta* *1785*, 207-216.
- Burnette, W.N. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* *112*, 195-203.
- Cahan, P., and Daley, G.Q. (2013). Origins and implications of pluripotent stem cell variability and heterogeneity. *Nature reviews Molecular cell biology* *14*, 357-368.
- Campbell, K.H.S., McWhir, J., Ritchie, W.A., and Wilmut, I. (1996). Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* *380*, 64-66.
- Candi, E., Agostini, M., Melino, G., and Bernassola, F. (2014). How the TP53 family proteins TP63 and TP73 contribute to tumorigenesis: regulators and effectors. *Human mutation* *35*, 702-714.
- Cano, A., Perez-Moreno, M.A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M.J., del Barrio, M.G., Portillo, F., and Nieto, M.A. (2000). The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nature cell biology* *2*, 76-83.
- Cao, R., and Zhang, Y. (2004). The functions of E(Z)/EZH2-mediated methylation of lysine 27 in histone H3. *Current opinion in genetics & development* *14*, 155-164.
- Caprio, C., and Baldini, A. (2014). p53 Suppression partially rescues the mutant phenotype in mouse models of DiGeorge syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *111*, 13385-13390.
- Cavallaro, U., and Christofori, G. (2004). Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nature reviews Cancer* *4*, 118-132.
- Claesson-Welsh, L., and Welsh, M. (2013). VEGFA and tumour angiogenesis. *Journal of internal medicine* *273*, 114-127.
- Collado, M., Blasco, M.A., and Serrano, M. (2007). Cellular senescence in cancer and aging. *Cell* *130*, 223-233.
- Collavin, L., Lunardi, A., and Del Sal, G. (2010). p53-family proteins and their regulators: hubs and spokes in tumor suppression. *Cell death and differentiation* *17*, 901-911.
- Cooray, S., Howe, S.J., and Thrasher, A.J. (2012). Retrovirus and lentivirus vector design and methods of cell conditioning. *Methods in enzymology* *507*, 29-57.
- Coutandin, D., Lohr, F., Niesen, F.H., Ikeya, T., Weber, T.A., Schafer, B., Zielonka, E.M., Bullock, A.N., Yang, A., Guntert, P., *et al.* (2009). Conformational stability and activity of p73 require a second helix in the tetramerization domain. *Cell death and differentiation* *16*, 1582-1589.
- 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 (New York, NY)* *309*, 1369-1373.
- 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.
- Chambers, I., and Tomlinson, S.R. (2009). The transcriptional foundation of pluripotency. *Development (Cambridge, England)* *136*, 2311-2322.
- Chan, E.M., Ratanasirintrao, S., Park, I.-H., Manos, P.D., Loh, Y.-H., Huo, H., Miller, J.D., Hartung, O., Rho, J., Ince, T.A., *et al.* (2009). Live cell imaging distinguishes bona fide human iPS cells from partially reprogrammed cells. *Nat Biotech* *27*, 1033-1037.
- Chang, T.C., Wentzel, E.A., Kent, O.A., Ramachandran, K., Mullendore, M., Lee, K.H., Feldmann, G., Yamakuchi, M., Ferlito, M., Lowenstein, C.J., *et al.* (2007). Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Molecular cell* *26*, 745-752.
- 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. *Developmental cell* *10*, 615-624.
- Chen, J., Liu, J., Yang, J., Chen, Y., Chen, J., Ni, S., Song, H., Zeng, L., Ding, K., and Pei, D. (2011). BMPs functionally replace Klf4 and support efficient reprogramming of mouse fibroblasts by Oct4 alone. *Cell research* *21*, 205-212.
- Chen, T., Yuan, D., Wei, B., Jiang, J., Kang, J., Ling, K., Gu, Y., Li, J., Xiao, L., and Pei, G. (2010). E-cadherin-mediated cell-cell contact is critical for induced pluripotent stem cell generation. *Stem cells (Dayton, Ohio)* *28*, 1315-1325.
- Chen, X., Ko, L.J., Jayaraman, L., and Prives, C. (1996). p53 levels, functional domains, and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells. *Genes & development* *10*, 2438-2451.
- Chen, X., Xu, H., Yuan, P., Fang, F., Huss, M., Vega, V.B., Wong, E., Orlov, Y.L., Zhang, W., Jiang, J., *et al.* (2008). Integration of external signaling pathways with the core transcriptional network in embryonic stem cells. *Cell* *133*, 1106-1117.
- Cheung, H.-H., Liu, X., and Rennert, O.M. (2012). Apoptosis: Reprogramming and the Fate of Mature Cells. *ISRN Cell Biology* *2012*, 8.
- Chi, S.W., Ayed, A., and Arrowsmith, C.H. (1999). Solution structure of a conserved C-terminal domain of p73 with structural homology to the SAM domain. *The EMBO journal* *18*, 4438-4445.
- Choi, K., Kennedy, M., Kazarov, A., Papadimitriou, J.C., and Keller, G. (1998). A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development (Cambridge, England)* *125*, 725-732.
- Choi, Y.J., Lin, C.P., Ho, J.J., He, X., Okada, N., Bu, P., Zhong, Y., Kim, S.Y., Bennett, M.J., Chen, C., *et al.* (2011). miR-34 miRNAs provide a barrier for somatic cell reprogramming. *Nature cell biology* *13*, 1353-1360.
- Damia, G., and Broggin, M. (2004). Cell cycle checkpoint proteins and cellular response to treatment by anticancer agents. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* *3*, 46-50.
- Dang, S.M., Gerecht-Nir, S., Chen, J., Itskovitz-Eldor, J., and Zandstra, P.W. (2004). Controlled, scalable embryonic stem cell differentiation culture. *Stem cells (Dayton, Ohio)* *22*, 275-282.
- David, L., and Polo, J.M. (2014). Phases of reprogramming. *Stem cell research* *12*, 754-761.
- Davis, R.L., Weintraub, H., and Lassar, A.B. (1987). Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* *51*, 987-1000.

- Davison, T.S., Vagner, C., Kaghad, M., Ayed, A., Caput, D., and Arrowsmith, C.H. (1999). p73 and p63 are homotetramers capable of weak heterotypic interactions with each other but not with p53. *The Journal of biological chemistry* 274, 18709-18714.
- De Laurenzi, V., Costanzo, A., Barcaroli, D., Terrinoni, A., Falco, M., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Levrero, M., and Melino, G. (1998). Two new p73 splice variants, gamma and delta, with different transcriptional activity. *The Journal of experimental medicine* 188, 1763-1768.
- De Laurenzi, V., Raschella, G., Barcaroli, D., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Ranalli, M., Catani, M.V., Tanno, B., Costanzo, A., Levrero, M., and Melino, G. (2000a). Induction of neuronal differentiation by p73 in a neuroblastoma cell line. *The Journal of biological chemistry* 275, 15226-15231.
- De Laurenzi, V., Rossi, A., Terrinoni, A., Barcaroli, D., Levrero, M., Costanzo, A., Knight, R.A., Guerrieri, P., and Melino, G. (2000b). p63 and p73 transactivate differentiation gene promoters in human keratinocytes. *Biochemical and biophysical research communications* 273, 342-346.
- De Los Angeles, A., Ferrari, F., Xi, R., Fujiwara, Y., Benvenisty, N., Deng, H., Hochedlinger, K., Jaenisch, R., Lee, S., Leitch, H.G., *et al.* (2015). Hallmarks of pluripotency. *Nature* 525, 469-478.
- DeLeo, A.B., Jay, G., Appella, E., Dubois, G.C., Law, L.W., and Old, L.J. (1979). Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76, 2420-2424.
- Deshmukh, R.S., Kovacs, K., An, D., Dinnyes, A., and Wang (2012). Drug Discovery Models and Toxicity Testing Using Embryonic and Induced Pluripotent Stem-Cell-Derived Cardiac and Neuronal Cells. *Stem Cells International* 2012, 9.
- Deyoung, M.P., and Ellisen, L.W. (2007). p63 and p73 in human cancer: defining the network. *Oncogene* 26, 5169-5183.
- Doetschman, T.C., Eistetter, H., Katz, M., Schmidt, W., and Kemler, R. (1985). The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *Journal of embryology and experimental morphology* 87, 27-45.
- Dominguez, G., Garcia, J.M., Pena, C., Silva, J., Garcia, V., Martinez, L., Maximiano, C., Gomez, M.E., Rivera, J.A., Garcia-Andrade, C., *et al.* (2006). DeltaTAp73 upregulation correlates with poor prognosis in human tumors: putative in vivo network involving p73 isoforms, p53, and E2F-1. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 24, 805-815.
- Donehower, L.A., Harvey, M., Slagle, B.L., McArthur, M.J., Montgomery, C.A., Jr., Butel, J.S., and Bradley, A. (1992). Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 356, 215-221.
- Ducy, P., and Karsenty, G. (2000). The family of bone morphogenetic proteins. *Kidney international* 57, 2207-2214.
- Dulloo, I., Phang, B.H., Othman, R., Tan, S.Y., Vijayaraghavan, A., Goh, L.K., Martin-Lopez, M., Marques, M.M., Li, C.W., Wang de, Y., *et al.* (2015). Hypoxia-inducible TAp73 supports tumorigenesis by regulating the angiogenic transcriptome. *Nature cell biology* 17, 511-523.
- Eakin, G.S., and Hadjantonakis, A.K. (2006). Production of chimeras by aggregation of embryonic stem cells with diploid or tetraploid mouse embryos. *Nature protocols* 1, 1145-1153.



- Ebisawa, T., Fukuchi, M., Murakami, G., Chiba, T., Tanaka, K., Imamura, T., and Miyazono, K. (2001). Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation. *The Journal of biological chemistry* 276, 12477-12480.
- Ebrahimi, B. (2015). Reprogramming barriers and enhancers: strategies to enhance the efficiency and kinetics of induced pluripotency. *Cell regeneration (London, England)* 4, 10.
- Eizenberg, O., Faber-Elman, A., Gottlieb, E., Oren, M., Rotter, V., and Schwartz, M. (1996). p53 plays a regulatory role in differentiation and apoptosis of central nervous system-associated cells. *Molecular and cellular biology* 16, 5178-5185.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic pathology* 35, 495-516.
- 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. *Nature genetics* 41, 968-976.
- Esteban, M.A., Bao, X., Zhuang, Q., Zhou, T., Qin, B., and Pei, D. (2012). The mesenchymal-to-epithelial transition in somatic cell reprogramming. *Current opinion in genetics & development* 22, 423-428.
- Ethayathulla, A.S., Tse, P.W., Monti, P., Nguyen, S., Inga, A., Fronza, G., and Viadiu, H. (2012). Structure of p73 DNA-binding domain tetramer modulates p73 transactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 6066-6071.
- Evans, M. (2011). Discovering pluripotency: 30 years of mouse embryonic stem cells. *Nature reviews Molecular cell biology* 12, 680-686.
- Evans, M.J., and Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-156.
- Fang, L., Lee, S.W., and Aaronson, S.A. (1999). Comparative Analysis of P73 and P53 Regulation and Effector Functions. *The Journal of Cell Biology* 147, 823-830.
- Farhang Ghahremani, M., Goossens, S., Nittner, D., Bisteau, X., Bartunkova, S., Zwolinska, A., Hulpiau, P., Haigh, K., Haenebalcke, L., Drogat, B., *et al.* (2013). p53 promotes VEGF expression and angiogenesis in the absence of an intact p21-Rb pathway. *Cell death and differentiation* 20, 888-897.
- 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.* (2009). Reprogramming of fibroblasts into induced pluripotent stem cells with orphan nuclear receptor Esrrb. *Nature cell biology* 11, 197-203.
- Fernandez-Alonso, R., Martin-Lopez, M., Gonzalez-Cano, L., Garcia, S., Castrillo, F., Diez-Prieto, I., Fernandez-Corona, A., Lorenzo-Marcos, M.E., Li, X., Claesson-Welsh, L., *et al.* (2015). p73 is required for endothelial cell differentiation, migration and the formation of vascular networks regulating VEGF and TGFbeta signaling. *Cell death and differentiation* 22, 1287-1299.
- Fernandez-Garcia, B., Vaque, J.P., Herreros-Villanueva, M., Marques-Garcia, F., Castrillo, F., Fernandez-Medarde, A., Leon, J., and Marin, M.C. (2006). p73 cooperates with Ras in the activation of MAP kinase signaling cascade. *Cell death and differentiation* 14, 254-265.
- 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.

- Fidler, I.J., and Nicolson, G.L. (1976). Organ selectivity for implantation survival and growth of B16 melanoma variant tumor lines. *Journal of the National Cancer Institute* 57, 1199-1202.
- Flinterman, M., Guelen, L., Ezzati-Nik, S., Killick, R., Melino, G., Tominaga, K., Mymryk, J.S., Gaken, J., and Tavassoli, M. (2005). E1A activates transcription of p73 and Noxa to induce apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 280, 5945-5959.
- Flores, E.R., Sengupta, S., Miller, J.B., Newman, J.J., Bronson, R., Crowley, D., Yang, A., McKeon, F., and Jacks, T. (2005). Tumor predisposition in mice mutant for p63 and p73: Evidence for broader tumor suppressor functions for the p53 family. *Cancer Cell* 7, 363-373.
- Fok, E.Y., and Zandstra, P.W. (2005). Shear-controlled single-step mouse embryonic stem cell expansion and embryoid body-based differentiation. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 23, 1333-1342.
- Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *The New England journal of medicine* 285, 1182-1186.
- Freed-Pastor, W.A., and Prives, C. (2012a). Mutant p53: one name, many proteins. *Genes & development* 26, 1268-1286.
- Freed-Pastor, W.A., and Prives, C. (2012b). Mutant p53: one name, many proteins. *Genes & development* 26, 1268-1286.
- Fujitani, M., Cancino, G.I., Dugani, C.B., Weaver, I.C., Gauthier-Fisher, A., Paquin, A., Mak, T.W., Wojtowicz, M.J., Miller, F.D., and Kaplan, D.R. (2010). TAp73 acts via the bHLH Hey2 to promote long-term maintenance of neural precursors. *Current biology : CB* 20, 2058-2065.
- Fusaki, N., Ban, H., Nishiyama, A., Saeki, K., and Hasegawa, M. (2009). Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proceedings of the Japan Academy Series B, Physical and biological sciences* 85, 348-362.
- Gagliardi, A., Mullin, N.P., Ying Tan, Z., Colby, D., Kousa, A.I., Halbritter, F., Weiss, J.T., Felker, A., Bezstarosti, K., Favaro, R., *et al.* (2013). A direct physical interaction between Nanog and Sox2 regulates embryonic stem cell self-renewal. *The EMBO journal* 32, 2231-2247.
- Gaiddon, C., Lokshin, M., Ahn, J., Zhang, T., and Prives, C. (2001). A subset of tumor-derived mutant forms of p53 down-regulate p63 and p73 through a direct interaction with the p53 core domain. *Molecular and cellular biology* 21, 1874-1887.
- Gao, Y., Chen, J., Li, K., Wu, T., Huang, B., Liu, W., Kou, X., Zhang, Y., Huang, H., Jiang, Y., *et al.* (2013). Replacement of Oct4 by Tet1 during iPSC induction reveals an important role of DNA methylation and hydroxymethylation in reprogramming. *Cell stem cell* 12, 453-469.
- Gartner, L.P., and Hiatt, J.L. (2011). *Atlas en Color de Histología. 5a edición* (Editorial Médica Panamericana).
- Gaspar-Maia, A., Alajem, A., Meshorer, E., and Ramalho-Santos, M. (2011). Open chromatin in pluripotency and reprogramming. *Nature reviews Molecular cell biology* 12, 36-47.
- Gaspar-Maia, A., Alajem, A., Polesso, F., Sridharan, R., Mason, M.J., Heidersbach, A., Ramalho-Santos, J., McManus, M.T., Plath, K., Meshorer, E., *et al.* (2009). Chd1 regulates open chromatin and pluripotency of embryonic stem cells. *Nature* 460, 863-868.
- Geula, S., Moshitch-Moshkovitz, S., Dominissini, D., Mansour, A.A., Kol, N., Salmon-Divon, M., Hershkovitz, V., Peer, E., Mor, N., Manor, Y.S., *et al.* (2015). Stem cells. m6A mRNA methylation facilitates resolution of naive pluripotency toward differentiation. *Science (New York, NY)* 347, 1002-1006.

- Giacobbe, A., Bongiorno-Borbone, L., Bernassola, F., Terrinoni, A., Markert, E.K., Levine, A.J., Feng, Z., Agostini, M., Zolla, L., Agro, A.F., *et al.* (2013). p63 regulates glutaminase 2 expression. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* *12*, 1395-1405.
- Gingold, J.A., Fidalgo, M., Guallar, D., Lau, Z., Sun, Z., Zhou, H., Faiola, F., Huang, X., Lee, D.F., Waghray, A., *et al.* (2014). A genome-wide RNAi screen identifies opposing functions of Snai1 and Snai2 on the Nanog dependency in reprogramming. *Molecular cell* *56*, 140-152.
- Gładych, M., Andrzejewska, A., Oleksiewicz, U., and Estécio, M.R.H. (2015). Epigenetic mechanisms of induced pluripotency. *Contemporary Oncology* *19*, A30-A38.
- Goldman, L.A., Cutrone, E.C., Kotenko, S.V., Krause, C.D., and Langer, J.A. (1996). Modifications of vectors pEF-BOS, pcDNA1 and pcDNA3 result in improved convenience and expression. *BioTechniques* *21*, 1013-1015.
- Goldschneider, D., Million, K., Meiller, A., Haddada, H., Puisieux, A., Benard, J., May, E., and Douc-Rasy, S. (2005). The neurogene BTG2TIS21/PC3 is transactivated by DeltaNp73alpha via p53 specifically in neuroblastoma cells. *Journal of cell science* *118*, 1245-1253.
- Golias, C.H., Charalabopoulos, A., and Charalabopoulos, K. (2004). Cell proliferation and cell cycle control: a mini review. *International journal of clinical practice* *58*, 1134-1141.
- Golipour, A., David, L., Liu, Y., Jayakumaran, G., Hirsch, C.L., Trcka, D., and Wrana, J.L. (2012). A late transition in somatic cell reprogramming requires regulators distinct from the pluripotency network. *Cell stem cell* *11*, 769-782.
- Gonzalez-Cano, L., Fuertes-Alvarez, S., Robledinos-Anton, N., Bizy, A., Villena-Cortes, A., Farinas, I., Marques, M.M., and Marin, M.C. (2016). p73 is required for ependymal cell maturation and neurogenic SVZ cytoarchitecture. *Developmental neurobiology* *76*, 730-747.
- Gonzalez-Cano, L., Herreros-Villanueva, M., Fernandez-Alonso, R., Ayuso-Sacido, A., Meyer, G., Garcia-Verdugo, J.M., Silva, A., Marques, M.M., and Marin, M.C. (2010). p73 deficiency results in impaired self renewal and premature neuronal differentiation of mouse neural progenitors independently of p53. *Cell death & disease* *1*, e109.
- Gonzalez-Cano, L., Hillje, A.L., Fuertes-Alvarez, S., Marques, M.M., Blanch, A., Ian, R.W., Irwin, M.S., Schwamborn, J.C., and Marin, M.C. (2013). Regulatory feedback loop between TP73 and TRIM32. *Cell death & disease* *4*, e704.
- González, F., Boué, S., and Belmonte, J.C.I. (2011). Methods for making induced pluripotent stem cells: reprogramming à la carte. *Nat Rev Genet* *12*, 231-242.
- Goolam, M., Scialdone, A., Graham, Sarah J., Macaulay, Iain C., Jedrusik, A., Hupalowska, A., Voet, T., Marioni, John C., and Zernicka-Goetz, M. (2016). Heterogeneity in Oct4 and Sox2 Targets Biases Cell Fate in 4-Cell Mouse Embryos. *Cell* *165*, 61-74.
- Graf, T., and Enver, T. (2009). Forcing cells to change lineages. *Nature* *462*, 587-594.
- Greenow, K., and Clarke, A.R. (2012). Controlling the stem cell compartment and regeneration in vivo: the role of pluripotency pathways. *Physiological reviews* *92*, 75-99.
- Grespi, F., and Melino, G. (2012). P73 and age-related diseases: is there any link with Parkinson Disease? *Aging* *4*, 923-931.
- Gressner, O., Schilling, T., Lorenz, K., Schulze Schleithoff, E., Koch, A., Schulze-Bergkamen, H., Lena, A.M., Candi, E., Terrinoni, A., Catani, M.V., *et al.* (2005). Tap63alpha induces apoptosis by activating signaling via death receptors and mitochondria. *The EMBO journal* *24*, 2458-2471.

- Grob, T.J., Novak, U., Maisse, C., Barcaroli, D., Luthi, A.U., Pirnia, F., Hugli, B., Graber, H.U., De Laurenzi, V., Fey, M.F., *et al.* (2001). Human delta Np73 regulates a dominant negative feedback loop for TAp73 and p53. *Cell death and differentiation* *8*, 1213-1223.
- Gropp, M., Shilo, V., Vainer, G., Gov, M., Gil, Y., Khaner, H., Matzrafi, L., Idelson, M., Kopolovic, J., Zak, N.B., *et al.* (2012). Standardization of the teratoma assay for analysis of pluripotency of human ES cells and biosafety of their differentiated progeny. *PloS one* *7*, e45532.
- Guan, M., Peng, H.X., Yu, B., and Lu, Y. (2003). p73 Overexpression and angiogenesis in human colorectal carcinoma. *Japanese journal of clinical oncology* *33*, 215-220.
- Guo, F., and Zheng, Y. (2004). Rho family GTPases cooperate with p53 deletion to promote primary mouse embryonic fibroblast cell invasion. *Oncogene* *23*, 5577-5585.
- 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. *Developmental cell* *18*, 675-685.
- Guo, G., Yang, J., Nichols, J., Hall, J.S., Eyres, I., Mansfield, W., and Smith, A. (2009a). Klf4 reverts developmentally programmed restriction of ground state pluripotency. *Development (Cambridge, England)* *136*, 1063-1069.
- Guo, X., Keyes, W.M., Papazoglu, C., Zuber, J., Li, W., Lowe, S.W., Vogel, H., and Mills, A.A. (2009b). TAp63 induces senescence and suppresses tumorigenesis in vivo. *Nature cell biology* *11*, 1451-1457.
- Guofeng Han, H.W.a.J.H. (2013). *Molecular Mechanisms of Embryonic Stem Cell Pluripotency. Pluripotent Stem Cells*, Dr Deepa Bhartiya (Ed), InTech,.
- Gupta, M.K., Teo, A.K., Rao, T.N., Bhatt, S., Kleinridders, A., Shirakawa, J., Takatani, T., Hu, J., De Jesus, D.F., Windmueller, R., *et al.* (2015). Excessive Cellular Proliferation Negatively Impacts Reprogramming Efficiency of Human Fibroblasts. *Stem cells translational medicine* *4*, 1101-1108.
- Gurdon, J.B. (1962). The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *Journal of embryology and experimental morphology* *10*, 622-640.
- Gurdon, J.B., Elsdale, T.R., and Fischberg, M. (1958). Sexually mature individuals of *Xenopus laevis* from the transplantation of single somatic nuclei. *Nature* *182*, 64-65.
- Hackett, J.A., Dietmann, S., Murakami, K., Down, T.A., Leitch, H.G., and Surani, M.A. (2013). Synergistic mechanisms of DNA demethylation during transition to ground-state pluripotency. *Stem Cell Reports* *1*, 518-531.
- Hackett, J.A., and Surani, M.A. (2014). Regulatory principles of pluripotency: from the ground state up. *Cell stem cell* *15*, 416-430.
- Hammell, C.M., Karp, X., and Ambros, V. (2009). A feedback circuit involving let-7-family miRNAs and DAF-12 integrates environmental signals and developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *106*, 18668-18673.
- Han, J., Yuan, P., Yang, H., Zhang, J., Soh, B.S., Li, P., Lim, S.L., Cao, S., Tay, J., Orlov, Y.L., *et al.* (2010). Tbx3 improves the germ-line competency of induced pluripotent stem cells. *Nature* *463*, 1096-1100.
- Hanahan, D., and Folkman, J. (1996). Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis. *Cell* *86*, 353-364.

- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* *144*, 646-674.
- Hanna, J., Markoulaki, S., Mitalipova, M., Cheng, A.W., Cassady, J.P., Staerk, J., Carey, B.W., Lengner, C.J., Foreman, R., Love, J., *et al.* (2009a). Metastable pluripotent states in NOD-mouse-derived ESCs. *Cell stem cell* *4*, 513-524.
- Hanna, J., Markoulaki, S., Schorderet, P., Carey, B.W., Beard, C., Wernig, M., Creighton, 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. (2009b). Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration. *Nature* *462*, 595-601.
- Hanna, J.H., Saha, K., and Jaenisch, R. (2010). Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues. *Cell* *143*, 508-525.
- 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 reports* *2*, 1579-1592.
- Hata, A., Lagna, G., Massague, J., and Hemmati-Brivanlou, A. (1998). Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor. *Genes & development* *12*, 186-197.
- Hatano, S.Y., Tada, M., Kimura, H., Yamaguchi, S., Kono, T., Nakano, T., Suemori, H., Nakatsuji, N., and Tada, T. (2005). Pluripotential competence of cells associated with Nanog activity. *Mechanisms of development* *122*, 67-79.
- Hawkins, K., Joy, S., and McKay, T. (2014). Cell signalling pathways underlying induced pluripotent stem cell reprogramming. *World Journal of Stem Cells* *6*, 620-628.
- Hayashi, H., Abdollah, S., Qiu, Y., Cai, J., Xu, Y.Y., Grinnell, B.W., Richardson, M.A., Topper, J.N., Gimbrone, M.A., Jr., Wrana, J.L., *et al.* (1997). The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling. *Cell* *89*, 1165-1173.
- He, L., He, X., Lim, L.P., de Stanchina, E., Xuan, Z., Liang, Y., Xue, W., Zender, L., Magnus, J., Ridzon, D., *et al.* (2007). A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature* *447*, 1130-1134.
- Heinrich, E.M., and Dimmeler, S. (2012). MicroRNAs and stem cells: control of pluripotency, reprogramming, and lineage commitment. *Circulation research* *110*, 1014-1022.
- Hemberger, M., Dean, W., and Reik, W. (2009). Epigenetic dynamics of stem cells and cell lineage commitment: digging Waddington's canal. *Nature reviews Molecular cell biology* *10*, 526-537.
- Higuchi, A., Ling, Q.D., Kumar, S.S., Munusamy, M.A., Alarfaj, A.A., Chang, Y., Kao, S.H., Lin, K.C., Wang, H.C., and Umezawa, A. (2015). Generation of pluripotent stem cells without the use of genetic material. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* *95*, 26-42.
- Hiratsuka, M., Uno, N., Ueda, K., Kurosaki, H., Imaoka, N., Kazuki, K., Ueno, E., Akakura, Y., Katoh, M., Osaki, M., *et al.* (2011). Integration-free iPS cells engineered using human artificial chromosome vectors. *PLoS one* *6*, e25961.
- Ho, R., Chronis, C., and Plath, K. (2011). Mechanistic insights into reprogramming to induced pluripotency. *Journal of cellular physiology* *226*, 868-878.

- Hochedlinger, K., and Jaenisch, R. (2002). Nuclear transplantation: lessons from frogs and mice. *Current opinion in cell biology* 14, 741-748.
- Hochedlinger, K., and Jaenisch, R. (2015). Induced Pluripotency and Epigenetic Reprogramming. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 7.
- Hochedlinger, K., and Plath, K. (2009). Epigenetic reprogramming and induced pluripotency. *Development (Cambridge, England)* 136, 509-523.
- Hoeben, A., Landuyt, B., Highley, M.S., Wildiers, H., Van Oosterom, A.T., and De Bruijn, E.A. (2004). Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacological reviews* 56, 549-580.
- Holmberg, J., He, X., Peredo, I., Orrego, A., Hesselager, G., Ericsson, C., Hovatta, O., Oba-Shinjo, S.M., Marie, S.K., Nister, M., *et al.* (2011). Activation of neural and pluripotent stem cell signatures correlates with increased malignancy in human glioma. *PloS one* 6, e18454.
- 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 (New York, NY)* 341, 651-654.
- Howden, Sara E., Maufort, John P., Duffin, Bret M., Elefanty, Andrew G., Stanley, Edouard G., and Thomson, James A. (2015). Simultaneous Reprogramming and Gene Correction of Patient Fibroblasts. *Stem Cell Reports* 5, 1109-1118.
- Hu, K. (2014). All Roads Lead to Induced Pluripotent Stem Cells: The Technologies of iPSC Generation. *Stem Cells and Development* 23, 1285-1300.
- Hu, W., Zheng, T., and Wang, J. (2011). Regulation of Fertility by the p53 Family Members. *Genes & cancer* 2, 420-430.
- Huang, Y., Osorno, R., Tsakiridis, A., and Wilson, V. (2012). In Vivo differentiation potential of epiblast stem cells revealed by chimeric embryo formation. *Cell reports* 2, 1571-1578.
- Ichida, J.K., Blanchard, J., Lam, K., Son, E.Y., Chung, J.E., Egli, D., Loh, K.M., Carter, A.C., Di Giorgio, F.P., Koszka, K., *et al.* (2009). A small-molecule inhibitor of tgf-Beta signaling replaces sox2 in reprogramming by inducing nanog. *Cell stem cell* 5, 491-503.
- Imamura, T., Takase, M., Nishihara, A., Oeda, E., Hanai, J., Kawabata, M., and Miyazono, K. (1997). Smad6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily. *Nature* 389, 622-626.
- Innocente, S.A., and Lee, J.M. (2005). p73 is a p53-independent, Sp1-dependent repressor of cyclin B1 transcription. *Biochemical and biophysical research communications* 329, 713-718.
- Ishida, W., Hamamoto, T., Kusanagi, K., Yagi, K., Kawabata, M., Takehara, K., Sampath, T.K., Kato, M., and Miyazono, K. (2000). Smad6 is a Smad1/5-induced smad inhibitor. Characterization of bone morphogenetic protein-responsive element in the mouse Smad6 promoter. *The Journal of biological chemistry* 275, 6075-6079.
- Ishimoto, O., Kawahara, C., Enjo, K., Obinata, M., Nukiwa, T., and Ikawa, S. (2002). Possible oncogenic potential of DeltaNp73: a newly identified isoform of human p73. *Cancer research* 62, 636-641.

- Ishisaki, A., Yamato, K., Hashimoto, S., Nakao, A., Tamaki, K., Nonaka, K., ten Dijke, P., Sugino, H., and Nishihara, T. (1999). Differential inhibition of Smad6 and Smad7 on bone morphogenetic protein- and activin-mediated growth arrest and apoptosis in B cells. *The Journal of biological chemistry* 274, 13637-13642.
- Itoh, S., Landstrom, M., Hermansson, A., Itoh, F., Heldin, C.H., Heldin, N.E., and ten Dijke, P. (1998). Transforming growth factor beta1 induces nuclear export of inhibitory Smad7. *The Journal of biological chemistry* 273, 29195-29201.
- Jaenisch, R., and Young, R. (2008). Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell* 132, 567-582.
- Jain, R.K. (2005). Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science (New York, NY)* 307, 58-62.
- Jakobsson, L., and Claesson-Welsh, L. (2008). Vascular basement membrane components in angiogenesis—an act of balance. *TheScientificWorldJournal* 8, 1246-1249.
- Jakobsson, L., Kreuger, J., and Claesson-Welsh, L. (2007). Building blood vessels—stem cell models in vascular biology. *The Journal of Cell Biology* 177, 751-755.
- Jakobsson, L., Kreuger, J., Holmborn, K., Lundin, L., Eriksson, I., Kjellen, L., and Claesson-Welsh, L. (2006). Heparan sulfate in trans potentiates VEGFR-mediated angiogenesis. *Developmental cell* 10, 625-634.
- John, K., Alla, V., Meier, C., and Putzer, B.M. (2011). GRAMD4 mimics p53 and mediates the apoptotic function of p73 at mitochondria. *Cell death and differentiation* 18, 874-886.
- Jopling, C., Boue, S., and Belmonte, J.C.I. (2011). Dedifferentiation, transdifferentiation and reprogramming: three routes to regeneration. *Nature reviews Molecular cell biology* 12, 79-89.
- Jost, C.A., Marin, M.C., and Kaelin, W.G., Jr. (1997). p73 is a simian [correction of human] p53-related protein that can induce apoptosis. *Nature* 389, 191-194.
- Kaghad, M., Bonnet, H., Yang, A., Creancier, L., Biscan, J.C., Valent, A., Minty, A., Chalon, P., Lelias, J.M., Dumont, X., *et al.* (1997). Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell* 90, 809-819.
- Kahan, B.W., and Ephrussi, B. (1970). Developmental potentialities of clonal in vitro cultures of mouse testicular teratoma. *Journal of the National Cancer Institute* 44, 1015-1036.
- 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.
- Kalkan, T., and Smith, A. (2014). Mapping the route from naive pluripotency to lineage specification. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 369.
- Kareta, M.S., Gorges, L.L., Hafeez, S., Benayoun, B.A., Marro, S., Zmoos, A.F., Cecchini, M.J., Spacek, D., Batista, L.F., O'Brien, M., *et al.* (2015). Inhibition of pluripotency networks by the Rb tumor suppressor restricts reprogramming and tumorigenesis. *Cell stem cell* 16, 39-50.
- Kartasheva, N.N., Lenz-Bauer, C., Hartmann, O., Schafer, H., Eilers, M., and Dobbelstein, M. (2003). DeltaNp73 can modulate the expression of various genes in a p53-independent fashion. *Oncogene* 22, 8246-8254.
- Karwacki-Neisius, V., Goke, J., Osorno, R., Halbritter, F., Ng, J.H., Weisse, A.Y., Wong, F.C., Gagliardi, A., Mullin, N.P., Festuccia, N., *et al.* (2013). Reduced Oct4 expression directs a

- robust pluripotent state with distinct signaling activity and increased enhancer occupancy by Oct4 and Nanog. *Cell stem cell* 12, 531-545.
- Kavak, P., Rasmussen, R.K., Causing, C.G., Bonni, S., Zhu, H., Thomsen, G.H., and Wrana, J.L. (2000). Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation. *Molecular cell* 6, 1365-1375.
- Kawabata, M., Imamura, T., and Miyazono, K. (1998). Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine & growth factor reviews* 9, 49-61.
- 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.
- Kellner, S., and Kikyo, N. (2010). Transcriptional regulation of the Oct4 gene, a master gene for pluripotency. *Histology and histopathology* 25, 405-412.
- Kim, D., Kim, C.H., Moon, J.I., Chung, Y.G., Chang, M.Y., Han, B.S., Ko, S., Yang, E., Cha, K.Y., Lanza, R., *et al.* (2009). Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell stem cell* 4, 472-476.
- Kim, J., and Zaret, K.S. (2015). Reprogramming of human cancer cells to pluripotency for models of cancer progression. *The EMBO journal* 34, 739-747.
- 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, 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, P.G., Albacker, C.E., Lu, Y.F., Jang, I.H., Lim, Y., Heffner, G.C., Arora, N., Bowman, T.V., Lin, M.I., Lensch, M.W., *et al.* (2013). Signaling axis involving Hedgehog, Notch, and Scl promotes the embryonic endothelial-to-hematopoietic transition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, E141-150.
- Kokovay, E., Shen, Q., and Temple, S. (2008). The Incredible Elastic Brain: How Neural Stem Cells Expand Our Minds. *Neuron* 60, 420-429.
- Koopmansch, B., Berx, G., Foidart, J.-M., Gilles, C., and Winkler, R. (2013). Interplay between KLF4 and ZEB2/SIP1 in the regulation of E-cadherin expression. *Biochemical and biophysical research communications* 431, 652-657.
- Koster, M.I., and Roop, D.R. (2004). The role of p63 in development and differentiation of the epidermis. *Journal of dermatological science* 34, 3-9.
- Krock, B.L., Skuli, N., and Simon, M.C. (2011). Hypoxia-Induced Angiogenesis: Good and Evil. *Genes & cancer* 2, 1117-1133.
- Ku, M., Howard, S., Ni, W., Lagna, G., and Hata, A. (2006). OAZ regulates bone morphogenetic protein signaling through Smad6 activation. *The Journal of biological chemistry* 281, 5277-5287.
- Kuhl, S.J., and Kuhl, M. (2013). On the role of Wnt/beta-catenin signaling in stem cells. *Biochim Biophys Acta* 1830, 2297-2306.
- Kulcenty, K., Wróblewska, J., Mazurek, S., Liszewska, E., and Jaworski, J. (2015). Molecular mechanisms of induced pluripotency. *Contemporary Oncology* 19, A22-A29.



- Kumar, R.M., Cahan, P., Shalek, A.K., Satija, R., Jay Daley, Keyser, A., Li, H., Zhang, J., Pardee, K., Gennert, D., Trombetta, J.J., *et al.* (2014). Deconstructing transcriptional heterogeneity in pluripotent stem cells. *Nature* 516, 56-61.
- Kuroda, T., Tada, M., Kubota, H., Kimura, H., Hatano, S.Y., Suemori, H., Nakatsuji, N., and Tada, T. (2005). Octamer and Sox elements are required for transcriptional cis regulation of Nanog gene expression. *Molecular and cellular biology* 25, 2475-2485.
- Kurosawa, H. (2007). Methods for inducing embryoid body formation: in vitro differentiation system of embryonic stem cells. *Journal of bioscience and bioengineering* 103, 389-398.
- Labosky, P.A., Barlow, D.P., and Hogan, B.L. (1994). Embryonic germ cell lines and their derivation from mouse primordial germ cells. *Ciba Foundation symposium* 182, 157-168; discussion 168-178.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Laird, P.W., Zijderveld, A., Linders, K., Rudnicki, M.A., Jaenisch, R., and Berns, A. (1991). Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic acids research* 19, 4293.
- Lamouille, S., Xu, J., and Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nature reviews Molecular cell biology* 15, 178-196.
- Lane, D.P. (1992). Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358, 15-16.
- Lane, D.P., and Crawford, L.V. (1979). T antigen is bound to a host protein in SY40-transformed cells. *Nature* 278, 261-263.
- Langenfeld, E., Hong, C.C., Lanke, G., and Langenfeld, J. (2013). Bone morphogenetic protein type I receptor antagonists decrease growth and induce cell death of lung cancer cell lines. *PLoS one* 8, e61256.
- Langenfeld, E.M., Calvano, S.E., Abou-Nukta, F., Lowry, S.F., Amenta, P., and Langenfeld, J. (2003). The mature bone morphogenetic protein-2 is aberrantly expressed in non-small cell lung carcinomas and stimulates tumor growth of A549 cells. *Carcinogenesis* 24, 1445-1454.
- Larue, L., Antos, C., Butz, S., Huber, O., Delmas, V., Dominis, M., and Kemler, R. (1996). A role for cadherins in tissue formation. *Development (Cambridge, England)* 122, 3185-3194.
- Layman, W.S., and Zuo, J. (2014). Epigenetic regulation in the inner ear and its potential roles in development, protection, and regeneration. *Frontiers in cellular neuroscience* 8, 446.
- Lee, C.Y., and Bautch, V.L. (2011). Ups and Downs of Guided Vessel Sprouting: The Role of Polarity. *Physiology* 26, 326-333.
- Lee, K., Wong, W., and Feng, B. (2013). Decoding the Pluripotency Network: The Emergence of New Transcription Factors. *Biomedicine* 1, 49.
- Leitch, H.G., McEwen, K.R., Turp, A., Encheva, V., Carroll, T., Grabole, N., Mansfield, W., Nashun, B., Knezovich, J.G., Smith, A., *et al.* (2013). Naive pluripotency is associated with global DNA hypomethylation. *Nature structural & molecular biology* 20, 311-316.
- Leung, C.Y., Zhu, M., and Zernicka-Goetz, M. (2016). Polarity in Cell-Fate Acquisition in the Early Mouse Embryo. *Current topics in developmental biology* 120, 203-234.
- Levine, A.J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88, 323-331.
- Levine, A.J., and Oren, M. (2009). The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nature reviews Cancer* 9, 749-758.

- Levine, A.J., Tomasini, R., McKeon, F.D., Mak, T.W., and Melino, G. (2011). The p53 family: guardians of maternal reproduction. *Nature reviews Molecular cell biology* 12, 259-265.
- 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 iPSC cell reprogramming. *Nature* 460, 1136-1139.
- Li, L., He, S., Sun, J.M., and Davie, J.R. (2004). Gene regulation by Sp1 and Sp3. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 82, 460-471.
- 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, X., and Claesson-Welsh, L. (2009). Embryonic stem cell models in vascular biology. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 7 *Suppl* 1, 53-56.
- Li, X., Claesson-Welsh, L., and Shibuya, M. (2008). VEGF receptor signal transduction. *Methods in enzymology* 443, 261-284.
- Li, X., Pei, D., and Zheng, H. (2014). Transitions between epithelial and mesenchymal states during cell fate conversions. *Protein & Cell* 5, 580-591.
- Li, Y., Feng, H., Gu, H., Lewis, D.W., Yuan, Y., Zhang, L., Yu, H., Zhang, P., Cheng, H., Miao, W., *et al.* (2013). The p53-PUMA axis suppresses iPSC generation. *Nature communications* 4, 2174.
- Li, Z., Huang, H., Boland, P., Dominguez, M.G., Burfeind, P., Lai, K.-M., Lin, H.-C., Gale, N.W., Daly, C., Auerbach, W., *et al.* (2009b). Embryonic stem cell tumor model reveals role of vascular endothelial receptor tyrosine phosphatase in regulating Tie2 pathway in tumor angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 22399-22404.
- 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. *Nature cell biology* 7, 165-171.
- Lin, Y., Cheng, Z., Yang, Z., Zheng, J., and Lin, T. (2012). DNp73 improves generation efficiency of human induced pluripotent stem cells. *BMC Cell Biology* 13, 9-9.
- Lin, Y.L., Sengupta, S., Gurdziel, K., Bell, G.W., Jacks, T., and Flores, E.R. (2009). p63 and p73 transcriptionally regulate genes involved in DNA repair. *PLoS genetics* 5, e1000680.
- Lindsley, R.C., Gill, J.G., Kyba, M., Murphy, T.L., and Murphy, K.M. (2006). Canonical Wnt signaling is required for development of embryonic stem cell-derived mesoderm. *Development (Cambridge, England)* 133, 3787-3796.
- Linzer, D.I., and Levine, A.J. (1979). Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 17, 43-52.
- Liu, F., Bhang, Suk H., Arentson, E., Sawada, A., Kim, Chan K., Kang, I., Yu, J., Sakurai, N., Kim, Suk H., Yoo, Judy Ji W., *et al.* (2013a). Enhanced Hemangioblast Generation and Improved Vascular Repair and Regeneration from Embryonic Stem Cells by Defined Transcription Factors. *Stem Cell Reports* 1, 166-182.
- Liu, G., Nozell, S., Xiao, H., and Chen, X. (2004a). DeltaNp73beta is active in transactivation and growth suppression. *Molecular and cellular biology* 24, 487-501.
- Liu, G., Nozell, S., Xiao, H., and Chen, X. (2004b). ΔNp73β Is Active in Transactivation and Growth Suppression. *Molecular and cellular biology* 24, 487-501.
- Liu, N., Lu, M., Tian, X., and Han, Z. (2007). Molecular mechanisms involved in self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. *Journal of cellular physiology* 211, 279-286.

- Liu, Q., Trotter, J., Zhang, J., Peters, M.M., Cheng, H., Bao, J., Han, X., Weeber, E.J., and Bu, G. (2010). Neuronal LRP1 knockout in adult mice leads to impaired brain lipid metabolism and progressive, age-dependent synapse loss and neurodegeneration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* *30*, 17068-17078.
- Liu, X., Sun, H., Qi, J., Wang, L., He, S., Liu, J., Feng, C., Chen, C., Li, W., Guo, Y., *et al.* (2013b). Sequential introduction of reprogramming factors reveals a time-sensitive requirement for individual factors and a sequential EMT-MET mechanism for optimal reprogramming. *Nature cell biology* *15*, 829-838.
- Loh, K.M., Lim, B., and Ang, L.T. (2015). Ex uno plures: molecular designs for embryonic pluripotency. *Physiological reviews* *95*, 245-295.
- 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. *Nature genetics* *38*, 431-440.
- Lokshin, M., Li, Y., Gaiddon, C., and Prives, C. (2007). p53 and p73 display common and distinct requirements for sequence specific binding to DNA. *Nucleic acids research* *35*, 340-352.
- Lowry, W.E., and Plath, K. (2008). The many ways to make an iPS cell. *Nat Biotech* *26*, 1246-1248.
- Lüningschrör, P., Hauser, S., Kaltschmidt, B., and Kaltschmidt, C. (2013). MicroRNAs in pluripotency, reprogramming and cell fate induction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* *1833*, 1894-1903.
- MacArthur, B.D., Ma'ayan, A., and Lemischka, I.R. (2009). Systems biology of stem cell fate and cellular reprogramming. *Nature reviews Molecular cell biology* *10*, 672-681.
- Maekawa, M., Yamaguchi, K., Nakamura, T., Shibukawa, R., Kodanaka, I., Ichisaka, T., Kawamura, Y., Mochizuki, H., Goshima, N., and Yamanaka, S. (2011). Direct reprogramming of somatic cells is promoted by maternal transcription factor Glis1. *Nature* *474*, 225-229.
- Magin, T.M., McWhir, J., and Melton, D.W. (1992). A new mouse embryonic stem cell line with good germ line contribution and gene targeting frequency. *Nucleic acids research* *20*, 3795-3796.
- Magnusson, P., Rolny, C., Jakobsson, L., Wikner, C., Wu, Y., Hicklin, D.J., and Claesson-Welsh, L. (2004). Deregulation of Flk-1/vascular endothelial growth factor receptor-2 in fibroblast growth factor receptor-1-deficient vascular stem cell development. *Journal of cell science* *117*, 1513-1523.
- Maherali, N., and Hochedlinger, K. (2008). Guidelines and techniques for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell stem cell* *3*, 595-605.
- Maherali, N., and Hochedlinger, K. (2009). Tgfbeta signal inhibition cooperates in the induction of iPSCs and replaces Sox2 and cMyc. *Current biology : CB* *19*, 1718-1723.
- 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.
- Mahmoudi, S., and Brunet, A. (2012). Aging and reprogramming: a two-way street. *Current opinion in cell biology* *24*, 744-756.
- Mallanna, S.K., and Rizzino, A. (2010). Emerging roles of microRNAs in the control of embryonic stem cells and the generation of induced pluripotent stem cells. *Developmental biology* *344*, 16-25.

- Manor, Y.S., Massarwa, R., and Hanna, J.H. (2015). Establishing the human naive pluripotent state. *Current opinion in genetics & development* 34, 35-45.
- Marin, M.C., Jost, C.A., Brooks, L.A., Irwin, M.S., O'Nions, J., Tidy, J.A., James, N., McGregor, J.M., Harwood, C.A., Yulug, I.G., *et al.* (2000). A common polymorphism acts as an intragenic modifier of mutant p53 behaviour. *Nature genetics* 25, 47-54.
- 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 iPSC cell genomic integrity. *Nature* 460, 1149-1153.
- Marks, H., Kalkan, T., Menafrá, 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.
- Marques-Garcia, F., Ferrandiz, N., Fernandez-Alonso, R., Gonzalez-Cano, L., Herreros-Villanueva, M., Rosa-Garrido, M., Fernandez-Garcia, B., Vaque, J.P., Marques, M.M., Alonso, M.E., *et al.* (2009). p73 plays a role in erythroid differentiation through GATA1 induction. *The Journal of biological chemistry* 284, 21139-21156.
- Marson, A., Levine, S.S., Cole, M.F., Frampton, G.M., Brambrink, T., Johnstone, S., Guenther, M.G., Johnston, W.K., Wernig, M., Newman, J., *et al.* (2008). Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Cell* 134, 521-533.
- Martí, M., Mulero, L., Pardo, C., Morera, C., Carrió, M., Laricchia-Robbio, L., Esteban, C.R., and Belmonte, J.C.I. (2013). Characterization of pluripotent stem cells. *Nat Protocols* 8, 223-253.
- Martin, G.R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78, 7634-7638.
- Massague, J. (1998). TGF-beta signal transduction. *Annual review of biochemistry* 67, 753-791.
- 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.
- McBurney, M.W. (1993). P19 embryonal carcinoma cells. *The International journal of developmental biology* 37, 135-140.
- McBurney, M.W., and Rogers, B.J. (1982). Isolation of male embryonal carcinoma cells and their chromosome replication patterns. *Developmental biology* 89, 503-508.
- Megyola, C.M., Gao, Y., Teixeira, A.M., Cheng, J., Heydari, K., Cheng, E.C., Nottoli, T., Krause, D.S., Lu, J., and Guo, S. (2013). Dynamic migration and cell-cell interactions of early reprogramming revealed by high-resolution time-lapse imaging. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 31, 895-905.
- Meissner, A., Wernig, M., and Jaenisch, R. (2007). Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells. *Nature biotechnology* 25, 1177-1181.
- Meletis, K., Wirta, V., Hede, S.M., Nister, M., Lundeborg, J., and Frisen, J. (2006). p53 suppresses the self-renewal of adult neural stem cells. *Development (Cambridge, England)* 133, 363-369.
- Melton, C., Judson, R.L., and Blalock, R. (2010). Opposing microRNA families regulate self-renewal in mouse embryonic stem cells. *Nature* 463, 621-626.
- Menendez, S., Camus, S., and Izpisua Belmonte, J.C. (2010). p53: guardian of reprogramming. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 9, 3887-3891.

- Merlo, P., Fulco, M., Costanzo, A., Mangiacasale, R., Strano, S., Blandino, G., Taya, Y., Lavia, P., and Levrero, M. (2005). A role of p73 in mitotic exit. *The Journal of biological chemistry* *280*, 30354-30360.
- Meshorer, E., Yellajoshula, D., George, E., Scambler, P.J., Brown, D.T., and Misteli, T. (2006). Hyperdynamic plasticity of chromatin proteins in pluripotent embryonic stem cells. *Developmental cell* *10*, 105-116.
- Mihajlović, A.I., Thamodaran, V., and Bruce, A.W. (2015). The first two cell-fate decisions of preimplantation mouse embryo development are not functionally independent. *Scientific Reports* *5*, 15034.
- 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.
- Mills, A.A., Zheng, B., Wang, X.J., Vogel, H., Roop, D.R., and Bradley, A. (1999). p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature* *398*, 708-713.
- Mimeault, M., and Batra, S.K. (2006). Concise review: recent advances on the significance of stem cells in tissue regeneration and cancer therapies. *Stem cells (Dayton, Ohio)* *24*, 2319-2345.
- 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.
- Miyazono, K., Kamiya, Y., and Morikawa, M. (2010). Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *Journal of biochemistry* *147*, 35-51.
- Miyazono, K., Maeda, S., and Imamura, T. (2005). BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine & growth factor reviews* *16*, 251-263.
- Miyazono, K., and Miyazawa, K. (2002). Id: a target of BMP signaling. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* *2002*, pe40.
- Molchadsky, A., Rivlin, N., Brosh, R., Rotter, V., and Sarig, R. (2010). p53 is balancing development, differentiation and de-differentiation to assure cancer prevention. *Carcinogenesis* *31*, 1501-1508.
- Molofsky, A.V., Pardal, R., Iwashita, T., Park, I.K., Clarke, M.F., and Morrison, S.J. (2003). Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation. *Nature* *425*, 962-967.
- Moll, U.M., and Slade, N. (2004). p63 and p73: roles in development and tumor formation. *Molecular cancer research : MCR* *2*, 371-386.
- Morena, A., Riccioni, S., Marchetti, A., Polcini, A.T., Mercurio, A.M., Blandino, G., Sacchi, A., and Falcioni, R. (2002). Expression of the beta 4 integrin subunit induces monocytic differentiation of 32D/v-Abl cells. *Blood* *100*, 96-106.
- Muchkaeva, I.A., Dashinimaev, E.B., Terskikh, V.V., Sukhanov, Y.V., and Vasiliev, A.V. (2012). Molecular Mechanisms of Induced Pluripotency. *Acta Naturae* *4*, 12-22.
- Mukhopadhyay, U.K., Eves, R., Jia, L., Mooney, P., and Mak, A.S. (2009). p53 suppresses Src-induced podosome and rosette formation and cellular invasiveness through the upregulation of caldesmon. *Molecular and cellular biology* *29*, 3088-3098.

- Muller, M., Schilling, T., Sayan, A.E., Kairat, A., Lorenz, K., Schulze-Bergkamen, H., Oren, M., Koch, A., Tannapfel, A., Stremmel, W., *et al.* (2005). TAp73/Delta Np73 influences apoptotic response, chemosensitivity and prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cell death and differentiation* *12*, 1564-1577.
- Muller, P.A.J., Vousden, K.H., and Norman, J.C. (2011). p53 and its mutants in tumor cell migration and invasion. *The Journal of Cell Biology* *192*, 209-218.
- Munoz-Espin, D., and Serrano, M. (2014). Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nature reviews Molecular cell biology* *15*, 482-496.
- Murakami, G., Watabe, T., Takaoka, K., Miyazono, K., and Imamura, T. (2003). Cooperative inhibition of bone morphogenetic protein signaling by Smurf1 and inhibitory Smads. *Molecular biology of the cell* *14*, 2809-2817.
- Murray-Zmijewski, F., Lane, D.P., and Bourdon, J.C. (2006). p53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress. *Cell death and differentiation* *13*, 962-972.
- 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 (Cambridge, England)* *110*, 815-821.
- Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., Abramow-Newerly, W., and Roder, J.C. (1993). Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *90*, 8424-8428.
- 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. *Nature biotechnology* *26*, 101-106.
- Nakagawa, M., Takizawa, N., Narita, M., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2010). Promotion of direct reprogramming by transformation-deficient Myc. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *107*, 14152-14157.
- Nakao, A., Afrakhte, M., Moren, A., Nakayama, T., Christian, J.L., Heuchel, R., Itoh, S., Kawabata, M., Heldin, N.E., Heldin, C.H., *et al.* (1997). Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. *Nature* *389*, 631-635.
- Nelakanti, R.V., Kooreman, N.G., and Wu, J.C. (2015). Teratoma formation: a tool for monitoring pluripotency in stem cell research. *Current protocols in stem cell biology* *32*, 4a.8.1-17.
- Nemajerova, A., Kim, S.Y., Petrenko, O., and Moll, U.M. (2012). Two-factor reprogramming of somatic cells to pluripotent stem cells reveals partial functional redundancy of Sox2 and Klf4. *Cell death and differentiation* *19*, 1268-1276.
- Ng, H.-H., and Surani, M.A. (2011). The transcriptional and signalling networks of pluripotency. *Nature cell biology* *13*, 490-496.
- Nicolai, S., Rossi, A., Di Daniele, N., Melino, G., Annicchiarico-Petruzzelli, M., and Raschella, G. (2015). DNA repair and aging: the impact of the p53 family. *Aging* *7*, 1050-1065.
- Nichols, J., and Smith, A. (2009). Naive and primed pluripotent states. *Cell stem cell* *4*, 487-492.
- Nichols, J., and Smith, A. (2011). The origin and identity of embryonic stem cells. *Development (Cambridge, England)* *138*, 3-8.
- 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.

- Nieto, M.A. (2002). The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nature reviews Molecular cell biology* 3, 155-166.
- Niwa, H. (2007). How is pluripotency determined and maintained? *Development (Cambridge, England)* 134, 635-646.
- Niwa, H., Miyazaki, J.-i., and Smith, A.G. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nature genetics* 24, 372-376.
- Noble, D. (2015). Conrad Waddington and the origin of epigenetics. *The Journal of experimental biology* 218, 816-818.
- Nurse, P. (2000). A long twentieth century of the cell cycle and beyond. *Cell* 100, 71-78.
- Ocana, O.H., and Nieto, M.A. (2010). Epithelial plasticity, stemness and pluripotency. *Cell research* 20, 1086-1088.
- Ohtsuka, S., Nishikawa-Torikai, S., and Niwa, H. (2012). E-cadherin promotes incorporation of mouse epiblast stem cells into normal development. *PloS one* 7, e45220.
- Okita, K., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2007). Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448, 313-317.
- Okita, K., Matsumura, Y., Sato, Y., Okada, A., Morizane, A., Okamoto, S., Hong, H., Nakagawa, M., Tanabe, K., Tezuka, K.-i., *et al.* (2011). A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat Meth* 8, 409-412.
- Okita, K., Nakagawa, M., Hyenjong, H., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2008). Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science (New York, NY)* 322, 949-953.
- Olivier, M., Hollstein, M., and Hainaut, P. (2010). TP53 Mutations in Human Cancers: Origins, Consequences, and Clinical Use. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2, a001008.
- Osada, M., Ohba, M., Kawahara, C., Ishioka, C., Kanamaru, R., Katoh, I., Ikawa, Y., Nimura, Y., Nakagawara, A., Obinata, M., *et al.* (1998). Cloning and functional analysis of human p51, which structurally and functionally resembles p53. *Nature medicine* 4, 839-843.
- Osada, M., Park, H.L., Nagakawa, Y., Yamashita, K., Fomenkov, A., Kim, M.S., Wu, G., Nomoto, S., Trink, B., and Sidransky, D. (2005). Differential recognition of response elements determines target gene specificity for p53 and p63. *Molecular and cellular biology* 25, 6077-6089.
- Ozaki, T., Naka, M., Takada, N., Tada, M., Sakiyama, S., and Nakagawara, A. (1999). Deletion of the COOH-Terminal Region of p73 $\alpha$  Enhances Both Its Transactivation Function and DNA-binding Activity but Inhibits Induction of Apoptosis in Mammalian Cells. *Cancer research* 59, 5902-5907.
- Palmer, N., and Kaldis, P. (2016). Regulation of the Embryonic Cell Cycle During Mammalian Preimplantation Development. *Current topics in developmental biology* 120, 1-53.
- Papp, B., and Plath, K. (2011). Reprogramming to pluripotency: stepwise resetting of the epigenetic landscape. *Cell research* 21, 486-501.
- Papp, B., and Plath, K. (2013). Epigenetics of reprogramming to induced pluripotency. *Cell* 152, 1324-1343.
- Paranjpe, S.S., and Veenstra, G.J. (2015). Establishing pluripotency in early development. *Biochim Biophys Acta* 1849, 626-636.

- Park, J., Cho, C.H., Parashurama, N., Li, Y., Berthiaume, F., Toner, M., Tilles, A.W., and Yarmush, M.L. (2007). Microfabrication-based modulation of embryonic stem cell differentiation. *Lab on a chip* 7, 1018-1028.
- Pasque, V., Jullien, J., Miyamoto, K., Halley-Stott, R.P., and Gurdon, J.B. (2011). Epigenetic factors influencing resistance to nuclear reprogramming. *Trends in genetics : TIG* 27, 516-525.
- Peinado, H., Quintanilla, M., and Cano, A. (2003). Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial mesenchymal transitions. *The Journal of biological chemistry* 278, 21113-21123.
- Pieters, T., and van Roy, F. (2014). Role of cell-cell adhesion complexes in embryonic stem cell biology. *Journal of cell science* 127, 2603-2613.
- Pinho, A.V., Rومان, I., and Real, F.X. (2011). p53-dependent regulation of growth, epithelial-mesenchymal transition and stemness in normal pancreatic epithelial cells. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 10, 1312-1321.
- Plusa, B., Piliszek, A., Frankenberg, S., Artus, J., and Hadjantonakis, A.K. (2008). Distinct sequential cell behaviours direct primitive endoderm formation in the mouse blastocyst. *Development (Cambridge, England)* 135, 3081-3091.
- 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 iPSCs. *Cell* 151, 1617-1632.
- Polo, J.M., and Hochedlinger, K. (2010). When fibroblasts MET iPSCs. *Cell stem cell* 7, 5-6.
- Popowski, M., and Tucker, H. (2015). Repressors of reprogramming. *World Journal of Stem Cells* 7, 541-546.
- Portela, A., and Esteller, M. (2010). Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotech* 28, 1057-1068.
- Pozniak, C.D., Radinovic, S., Yang, A., McKeon, F., Kaplan, D.R., and Miller, F.D. (2000). An anti-apoptotic role for the p53 family member, p73, during developmental neuron death. *Science (New York, NY)* 289, 304-306.
- Qian, Y., and Chen, X. (2013). Senescence Regulation by the p53 Protein Family. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* 965, 37-61.
- Quintavalle, M., Elia, L., Condorelli, G., and Courtneidge, S.A. (2010). MicroRNA control of podosome formation in vascular smooth muscle cells in vivo and in vitro. *J Cell Biol* 189, 13-22.
- Racek, T., Mise, N., Li, Z., Stoll, A., and Putzer, B.M. (2005). C-terminal p73 isoforms repress transcriptional activity of the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) promoter. *The Journal of biological chemistry* 280, 40402-40405.
- Ralston, A., and Rossant, J. (2005). Genetic regulation of stem cell origins in the mouse embryo. *Clinical genetics* 68, 106-112.
- Ramadan, S., Terrinoni, A., Catani, M.V., Sayan, A.E., Knight, R.A., Mueller, M., Krammer, P.H., Melino, G., and Candi, E. (2005). p73 induces apoptosis by different mechanisms. *Biochemical and biophysical research communications* 331, 713-717.
- Raya, A., Rodriguez-Piza, I., Guenechea, G., Vassena, R., Navarro, S., Barrero, M.J., Consiglio, A., Castella, M., Rio, P., Sleep, E., *et al.* (2009). Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells. *Nature* 460, 53-59.



- Redmer, T., Diecke, S., Grigoryan, T., Quiroga-Negreira, A., Birchmeier, W., and Besser, D. (2011). E-cadherin is crucial for embryonic stem cell pluripotency and can replace OCT4 during somatic cell reprogramming. *EMBO reports* *12*, 720-726.
- 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.
- Revilla, A., Gonzalez, C., Iriondo, A., Fernandez, B., Prieto, C., Marin, C., and Liste, I. (2015). Current advances in the generation of human iPS cells: implications in cell-based regenerative medicine. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*.
- Rinon, A., Molchadsky, A., Nathan, E., Yovel, G., Rotter, V., Sarig, R., and Tzahor, E. (2011). p53 coordinates cranial neural crest cell growth and epithelial-mesenchymal transition/delamination processes. *Development (Cambridge, England)* *138*, 1827-1838.
- Risau, W. (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature* *386*, 671-674.
- Risau, W., and Flamme, I. (1995). Vasculogenesis. *Annual review of cell and developmental biology* *11*, 73-91.
- Rivera, C.G., Mellberg, S., Claesson-Welsh, L., Bader, J.S., and Popel, A.S. (2011). Analysis of VEGF-a regulated gene expression in endothelial cells to identify genes linked to angiogenesis. *PLoS one* *6*, e24887.
- Rivlin, N., Katz, S., Doody, M., Sheffer, M., Horesh, S., Molchadsky, A., Koifman, G., Shetzer, Y., Goldfinger, N., Rotter, V., *et al.* (2014). Rescue of embryonic stem cells from cellular transformation by proteomic stabilization of mutant p53 and conversion into WT conformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *111*, 7006-7011.
- Rodier, F., and Campisi, J. (2011). Four faces of cellular senescence. *The Journal of Cell Biology* *192*, 547-556.
- Rony, I.K., Baten, A., Bloomfield, J.A., Islam, M.E., Billah, M.M., and Islam, K.D. (2015). Inducing pluripotency in vitro: recent advances and highlights in induced pluripotent stem cells generation and pluripotency reprogramming. *Cell proliferation* *48*, 140-156.
- Rosa, A., and Brivanlou, A.H. (2013). Regulatory Non-Coding RNAs in Pluripotent Stem Cells. *International Journal of Molecular Sciences* *14*, 14346-14373.
- Rosner, M.H., Vigano, M.A., Ozato, K., Timmons, P.M., Poirier, F., Rigby, P.W., and Staudt, L.M. (1990). A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. *Nature* *345*, 686-692.
- Rufini, A., Niklison-Chirou, M.V., Inoue, S., Tomasini, R., Harris, I.S., Marino, A., Federici, M., Dinsdale, D., Knight, R.A., Melino, G., *et al.* (2012). TAp73 depletion accelerates aging through metabolic dysregulation. *Genes & development* *26*, 2009-2014.
- 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. *Current biology : CB* *21*, 45-52.
- Rybak, A., Fuchs, H., Smirnova, L., Brandt, C., Pohl, E.E., Nitsch, R., and Wulczyn, F.G. (2008). A feedback loop comprising lin-28 and let-7 controls pre-let-7 maturation during neural stem-cell commitment. *Nature cell biology* *10*, 987-993.
- Sabour, D., and Scholer, H.R. (2012). Reprogramming and the mammalian germline: the Weismann barrier revisited. *Current opinion in cell biology* *24*, 716-723.

- Saiz, N., and Plusa, B. (2013). Early cell fate decisions in the mouse embryo. *Reproduction (Cambridge, England)* *145*, R65-80.
- Sakurai, K., Talukdar, I., Patil, V.S., Dang, J., Li, Z., Chang, K.Y., Lu, C.C., Delorme-Walker, V., Dermardirossian, C., Anderson, K., *et al.* (2014). Kinome-wide functional analysis highlights the role of cytoskeletal remodeling in somatic cell reprogramming. *Cell stem cell* *14*, 523-534.
- Salimath, B., Marme, D., and Finkenzeller, G. (2000). Expression of the vascular endothelial growth factor gene is inhibited by p73. *Oncogene* *19*, 3470-3476.
- 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.
- Sarig, R., Rivlin, N., Brosh, R., Bornstein, C., Kamer, I., Ezra, O., Molchadsky, A., Goldfinger, N., Brenner, O., and Rotter, V. (2010). Mutant p53 facilitates somatic cell reprogramming and augments the malignant potential of reprogrammed cells. *The Journal of experimental medicine* *207*, 2127-2140.
- Sasaki, Y., Naishiro, Y., Oshima, Y., Imai, K., Nakamura, Y., and Tokino, T. (2005). Identification of pigment epithelium-derived factor as a direct target of the p53 family member genes. *Oncogene* *24*, 5131-5136.
- Sbisa, E., Catalano, D., Grillo, G., Licciulli, F., Turi, A., Liuni, S., Pesole, G., De Grassi, A., Caratozzolo, M.F., D'Erchia, A.M., *et al.* (2007). p53FamTaG: a database resource of human p53, p63 and p73 direct target genes combining in silico prediction and microarray data. *BMC bioinformatics* *8 Suppl 1*, S20.
- Schlaeger, T.M., Daheron, L., Brickler, T.R., Entwisle, S., Chan, K., Cianci, A., DeVine, A., Ettenger, A., Fitzgerald, K., Godfrey, M., *et al.* (2015). A comparison of non-integrating reprogramming methods. *Nat Biotech* *33*, 58-63.
- Schmale, H., and Bamberger, C. (1997). A novel protein with strong homology to the tumor suppressor p53. *Oncogene* *15*, 1363-1367.
- Schmidt, T., and Carmeliet, P. (2011). Angiogenesis: a target in solid tumors, also in leukemia? *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology Education Program* *2011*, 1-8.
- Schuettengruber, B., and Cavalli, G. (2009). Recruitment of polycomb group complexes and their role in the dynamic regulation of cell fate choice. *Development (Cambridge, England)* *136*, 3531-3542.
- Schwamborn, J.C., Berezikov, E., and Knoblich, J.A. (2009). The TRIM-NHL protein TRIM32 activates microRNAs and prevents self-renewal in mouse neural progenitors. *Cell* *136*, 913-925.
- Schwarz, B.A., Bar-Nur, O., Silva, J.C., and Hochedlinger, K. (2014). Nanog is dispensable for the generation of induced pluripotent stem cells. *Current biology : CB* *24*, 347-350.
- Semi, K., and Yamada, Y. (2015). Induced pluripotent stem cell technology for dissecting the cancer epigenome. *Cancer Science* *106*, 1251-1256.
- Senoo, M., Tsuchiya, I., Matsumura, Y., Mori, T., Saito, Y., Kato, H., Okamoto, T., and Habu, S. (2001). Transcriptional dysregulation of the p73L / p63 / p51 / p40 / KET gene in human squamous cell carcinomas: expression of  $\Delta$  Np73L, a novel dominant-negative isoform, and loss of expression of the potential tumour suppressor p51. *British Journal of Cancer* *84*, 1235-1241.

- Shaulsky, G., Goldfinger, N., Peled, A., and Rotter, V. (1991). Involvement of wild-type p53 in pre-B-cell differentiation in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *88*, 8982-8986.
- Shay, J.W., and Roninson, I.B. (2004). Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer therapy. *Oncogene* *23*, 2919-2933.
- Sherr, C.J. (2004). Principles of tumor suppression. *Cell* *116*, 235-246.
- Sherr, C.J. (2012). Ink4-Arf Locus in Cancer and Aging. *Wiley interdisciplinary reviews Developmental biology* *1*, 731-741.
- Shiota, M., Izumi, H., Onitsuka, T., Miyamoto, N., Kashiwagi, E., Kidani, A., Hirano, G., Takahashi, M., Naito, S., and Kohno, K. (2008). Twist and p53 reciprocally regulate target genes via direct interaction. *Oncogene* *27*, 5543-5553.
- Sieber, C., Kopf, J., Hiepen, C., and Knaus, P. (2009). Recent advances in BMP receptor signaling. *Cytokine & growth factor reviews* *20*, 343-355.
- 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 biology* *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.
- Smeenk, L., van Heeringen, S.J., Koeppel, M., van Driel, M.A., Bartels, S.J., Akkers, R.C., Denissov, S., Stunnenberg, H.G., and Lohrum, M. (2008). Characterization of genome-wide p53-binding sites upon stress response. *Nucleic acids research* *36*, 3639-3654.
- Smith, A. (2006). A glossary for stem-cell biology. *Nature* *441*, 1060-1060.
- Smith, Z.D., Nachman, I., Regev, A., and Meissner, A. (2010). Dynamic single-cell imaging of direct reprogramming reveals an early specifying event. *Nature biotechnology* *28*, 521-526.
- Smith, Z.D., Sindhu, C., and Meissner, A. (2016). Molecular features of cellular reprogramming and development. *Nature reviews Molecular cell biology* *17*, 139-154.
- Soldevilla, B., Millan, C.S., Bonilla, F., and Dominguez, G. (2013). The TP73 complex network: ready for clinical translation in cancer? *Genes, chromosomes & cancer* *52*, 989-1006.
- Solter, D. (2006). From teratocarcinomas to embryonic stem cells and beyond: a history of embryonic stem cell research. *Nat Rev Genet* *7*, 319-327.
- Sommer, C.A., and Mostoslavsky, G. (2010). Experimental approaches for the generation of induced pluripotent stem cells. *Stem cell research & therapy* *1*, 26.
- Souchelnytskyi, S., Nakayama, T., Nakao, A., Moren, A., Heldin, C.H., Christian, J.L., and ten Dijke, P. (1998). Physical and functional interaction of murine and *Xenopus* Smad7 with bone morphogenetic protein receptors and transforming growth factor-beta receptors. *The Journal of biological chemistry* *273*, 25364-25370.
- Spike, B.T., and Wahl, G.M. (2011). p53, Stem Cells, and Reprogramming: Tumor Suppression beyond Guarding the Genome. *Genes & cancer* *2*, 404-419.
- Stadtfield, M., and Hochedlinger, K. (2010). Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. *Genes & development* *24*, 2239-2263.
- Stadtfield, M., Maherali, N., Breault, D.T., and Hochedlinger, K. (2008a). Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse. *Cell stem cell* *2*, 230-240.

- Stadtfield, M., Nagaya, M., Utikal, J., Weir, G., and Hochedlinger, K. (2008b). Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science (New York, NY)* *322*, 945-949.
- Steder, M., Alla, V., Meier, C., Spitschak, A., Pahnke, J., Furst, K., Kowtharapu, B.S., Engelmann, D., Petigk, J., Egberts, F., *et al.* (2013). DNp73 exerts function in metastasis initiation by disconnecting the inhibitory role of EPLIN on IGF1R-AKT/STAT3 signaling. *Cancer Cell* *24*, 512-527.
- Stewart, C.L., Gadi, I., and Bhatt, H. (1994). Stem cells from primordial germ cells can reenter the germ line. *Developmental biology* *161*, 626-628.
- Stiewe, T. (2007). The p53 family in differentiation and tumorigenesis. *Nature reviews Cancer* *7*, 165-168.
- Stiewe, T., and Putzer, B.M. (2002). Role of p73 in malignancy: tumor suppressor or oncogene? *Cell death and differentiation* *9*, 237-245.
- Stiewe, T., Tuve, S., Peter, M., Tannapfel, A., Elmaagacli, A.H., and Putzer, B.M. (2004). Quantitative TP73 transcript analysis in hepatocellular carcinomas. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *10*, 626-633.
- Stommel, J.M., Marchenko, N.D., Jimenez, G.S., Moll, U.M., Hope, T.J., and Wahl, G.M. (1999). A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking. *The EMBO journal* *18*, 1660-1672.
- Strano, S., Fontemaggi, G., Costanzo, A., Rizzo, M.G., Monti, O., Baccharini, A., Del Sal, G., Levrero, M., Sacchi, A., Oren, M., *et al.* (2002). Physical interaction with human tumor-derived p53 mutants inhibits p63 activities. *The Journal of biological chemistry* *277*, 18817-18826.
- Straub, W.E., Weber, T.A., Schafer, B., Candi, E., Durst, F., Ou, H.D., Rajalingam, K., Melino, G., and Dotsch, V. (2010). The C-terminus of p63 contains multiple regulatory elements with different functions. *Cell death & disease* *1*, e5.
- Suda, Y., Suzuki, M., Ikawa, Y., and Aizawa, S. (1987). Mouse embryonic stem cells exhibit indefinite proliferative potential. *Journal of cellular physiology* *133*, 197-201.
- Szutorisz, H., and Dillon, N. (2005). The epigenetic basis for embryonic stem cell pluripotency. *BioEssays* *27*, 1286-1293.
- Tabansky, I., Lenarcic, A., Draft, R.W., Loulier, K., Keskin, D.B., Rosains, J., Rivera-Feliciano, J., Lichtman, J.W., Livet, J., Stern, J.N., *et al.* (2013). Developmental bias in cleavage-stage mouse blastomeres. *Current biology : CB* *23*, 21-31.
- Tada, M., Takahama, Y., Abe, K., Nakatsuji, N., and Tada, T. (2001). Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Current biology : CB* *11*, 1553-1558.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). 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. *Nature communications* *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. (2015). A developmental framework for induced pluripotency. *Development (Cambridge, England)* *142*, 3274-3285.

- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2016). A decade of transcription factor-mediated reprogramming to pluripotency. *Nature reviews Molecular cell biology* *17*, 183-193.
- Takase, M., Imamura, T., Sampath, T.K., Takeda, K., Ichijo, H., Miyazono, K., and Kawabata, M. (1998). Induction of Smad6 mRNA by bone morphogenetic proteins. *Biochemical and biophysical research communications* *244*, 26-29.
- Talos, F., Abraham, A., Vaseva, A.V., Holembowski, L., Tsirka, S.E., Scheel, A., Bode, D., Dobbstein, M., Bruck, W., and Moll, U.M. (2010). p73 is an essential regulator of neural stem cell maintenance in embryonal and adult CNS neurogenesis. *Cell death and differentiation* *17*, 1816-1829.
- Talos, F., Nemajerova, A., Flores, E.R., Petrenko, O., and Moll, U.M. (2007). p73 suppresses polyploidy and aneuploidy in the absence of functional p53. *Molecular cell* *27*, 647-659.
- Tam, P.P., Khoo, P.L., Lewis, S.L., Bildsoe, H., Wong, N., Tsang, T.E., Gad, J.M., and Robb, L. (2007). Sequential allocation and global pattern of movement of the definitive endoderm in the mouse embryo during gastrulation. *Development (Cambridge, England)* *134*, 251-260.
- Tam, P.P., and Loebel, D.A. (2007). Gene function in mouse embryogenesis: get set for gastrulation. *Nat Rev Genet* *8*, 368-381.
- Tanabe, K., Nakamura, M., Narita, M., Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2013). Maturation, not initiation, is the major roadblock during reprogramming toward pluripotency from human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *110*, 12172-12179.
- Tanaka, M., Hadjantonakis, A.-K., Vintersten, K., and Nagy, A. (2009). Aggregation Chimeras: Combining ES Cells, Diploid, and Tetraploid Embryos. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* *530*, 287-309.
- Tanaka, Y., Kameoka, M., Itaya, A., Ota, K., and Yoshihara, K. (2004). Regulation of HSF1-responsive gene expression by N-terminal truncated form of p73alpha. *Biochemical and biophysical research communications* *317*, 865-872.
- Tanaka, Y., Ota, K., Kameoka, M., Itaya, A., and Yoshihara, K. (2006). Up-regulation of NFkappaB-responsive gene expression by DeltaNp73alpha in p53 null cells. *Experimental cell research* *312*, 1254-1264.
- Tapia, N., and Schöler, H.R. (2010). p53 connects tumorigenesis and reprogramming to pluripotency. *The Journal of experimental medicine* *207*, 2045-2048.
- Tarkowski, A.K., Suwinska, A., Czolowska, R., and Ozdzenski, W. (2010). Individual blastomeres of 16- and 32-cell mouse embryos are able to develop into fetuses and mice. *Developmental biology* *348*, 190-198.
- Tee, W.W., and Reinberg, D. (2014). Chromatin features and the epigenetic regulation of pluripotency states in ESCs. *Development (Cambridge, England)* *141*, 2376-2390.
- Teodoro, J.G., Evans, S.K., and Green, M.R. (2007). Inhibition of tumor angiogenesis by p53: a new role for the guardian of the genome. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* *85*, 1175-1186.
- 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.
- Theunissen, T.W., and Silva, J.C. (2011). Switching on pluripotency: a perspective on the biological requirement of Nanog. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* *366*, 2222-2229.

- Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y., and Nieto, M.A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139, 871-890.
- Tiscornia, G., and Izpisua Belmonte, J.C. (2010). MicroRNAs in embryonic stem cell function and fate. *Genes & development* 24, 2732-2741.
- Tomasini, R., Tsuchihara, K., Tsuda, C., Lau, S.K., Wilhelm, M., Ruffini, A., Tsao, M.S., Iovanna, J.L., Jurisicova, A., Melino, G., *et al.* (2009). TAp73 regulates the spindle assembly checkpoint by modulating BubR1 activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 797-802.
- Tomasini, R., Tsuchihara, K., Wilhelm, M., Fujitani, M., Ruffini, A., Cheung, C.C., Khan, F., Itie-Youten, A., Wakeham, A., Tsao, M.S., *et al.* (2008). TAp73 knockout shows genomic instability with infertility and tumor suppressor functions. *Genes & development* 22, 2677-2691.
- Tong, K.K., Ma, T.C., and Kwan, K.M. (2015). BMP/Smad signaling and embryonic cerebellum development: stem cell specification and heterogeneity of anterior rhombic lip. *Development, growth & differentiation* 57, 121-134.
- Torres-Padilla, M.-E., Parfitt, D.-E., Kouzarides, T., and Zernicka-Goetz, M. (2007). Histone arginine methylation regulates pluripotency in the early mouse embryo. *Nature* 445, 214-218.
- Trink, B., Okami, K., Wu, L., Sriuranpong, V., Jen, J., and Sidransky, D. (1998). A new human p53 homologue. *Nature medicine* 4, 747-748.
- Tschan, M.P., Grob, T.J., Peters, U.R., Laurenzi, V.D., Huegli, B., Kreuzer, K.A., Schmidt, C.A., Melino, G., Fey, M.F., Tobler, A., *et al.* (2000). Enhanced p73 expression during differentiation and complex p73 isoforms in myeloid leukemia. *Biochemical and biophysical research communications* 277, 62-65.
- Tsubooka, N., Ichisaka, T., Okita, K., Takahashi, K., Nakagawa, M., and Yamanaka, S. (2009). Roles of Sall4 in the generation of pluripotent stem cells from blastocysts and fibroblasts. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 14, 683-694.
- Unternaehrer, J.J., Zhao, R., Kim, K., Cesana, M., Powers, J.T., Ratanasirintrao, S., Onder, T., Shibue, T., Weinberg, R.A., and Daley, G.Q. (2014). The epithelial-mesenchymal transition factor SNAIL paradoxically enhances reprogramming. *Stem Cell Reports* 3, 691-698.
- 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. *Journal of cell science* 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.
- Vernole, P., Neale, M.H., Barcaroli, D., Munarriz, E., Knight, R.A., Tomasini, R., Mak, T.W., Melino, G., and De Laurenzi, V. (2009). TAp73alpha binds the kinetochore proteins Bub1 and Bub3 resulting in polyploidy. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 8, 421-429.
- Vigneron, A., and Vousden, K.H. (2010). p53, ROS and senescence in the control of aging. *Aging* 2, 471-474.
- Vikhanskaya, F., Bani, M.R., Borsotti, P., Ghilardi, C., Ceruti, R., Ghisleni, G., Marabese, M., Giavazzi, R., Broggin, M., and Taraboletti, G. (2001). p73 Overexpression increases VEGF and reduces thrombospondin-1 production: implications for tumor angiogenesis. *Oncogene* 20, 7293-7300.

- Viswanathan, S.R., Daley, G.Q., and Gregory, R.I. (2008). Selective blockade of microRNA processing by Lin28. *Science (New York, NY)* *320*, 97-100.
- Vittet, D., Prandini, M.H., Berthier, R., Schweitzer, A., Martin-Sisteron, H., Uzan, G., and Dejana, E. (1996). Embryonic stem cells differentiate in vitro to endothelial cells through successive maturation steps. *Blood* *88*, 3424-3431.
- Voigt, P., Tee, W.W., and Reinberg, D. (2013). A double take on bivalent promoters. *Genes & development* *27*, 1318-1338.
- Wang, B., Xiao, Z., and Ren, E.C. (2009). Redefining the p53 response element. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *106*, 14373-14378.
- Wang, H., and Dey, S.K. (2006). Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nat Rev Genet* *7*, 185-199.
- Wang, J., He, Q., Han, C., Gu, H., Jin, L., Li, Q., Mei, Y., and Wu, M. (2012). p53-facilitated miR-199a-3p regulates somatic cell reprogramming. *Stem cells (Dayton, Ohio)* *30*, 1405-1413.
- Wang, X., and Yang, P. (2008). In vitro differentiation of mouse embryonic stem (mES) cells using the hanging drop method. *Journal of visualized experiments : JoVE*.
- Wang, Y., and Belloch, R. (2009). Cell Cycle Regulation by MicroRNAs in Embryonic Stem Cells. *Cancer research* *69*, 4093-4096.
- Warren, L., Manos, P.D., Ahfeldt, T., Loh, Y.H., Li, H., Lau, F., Ebina, W., Mandal, P.K., Smith, Z.D., Meissner, A., *et al.* (2010). Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell stem cell* *7*, 618-630.
- Weinberg, R. (2013). *The Biology of Cancer, Second Edition* (Taylor & Francis Group).
- Weinberg, R.A. (2007). *The Biology of Cancer*
- Weinberger, L., Ayyash, M., Novershtern, N., and Hanna, J.H. (2016). Dynamic stem cell states: naive to primed pluripotency in rodents and humans. *Nature reviews Molecular cell biology* *17*, 155-169.
- Weis, S.M., and Cheresch, D.A. (2011). Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nature medicine* *17*, 1359-1370.
- Wernig, M., Meissner, A., Cassady, J.P., and Jaenisch, R. (2008). 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.
- Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J., and Campbell, K.H.S. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* *385*, 810-813.
- Willadsen, S.M. (1989). Cloning of sheep and cow embryos. *Genome / National Research Council Canada = Genome / Conseil national de recherches Canada* *31*, 956-962.
- 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.
- Wimmer, R., Cseh, B., Maier, B., Scherrer, K., and Baccarini, M. (2012). Angiogenic sprouting requires the fine tuning of endothelial cell cohesion by the Raf-1/Rok-alpha complex. *Developmental cell* *22*, 158-171.

- 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.
- Wrana, J.L. (2000). Regulation of Smad activity. *Cell* *100*, 189-192.
- Wray, J., Kalkan, T., and Smith, Austin G. (2010). The ground state of pluripotency. *Biochemical Society Transactions* *38*, 1027-1032.
- Wu, J., and Izpisua Belmonte, J.C. (2015). Dynamic Pluripotent Stem Cell States and Their Applications. *Cell stem cell* *17*, 509-525.
- Wu, J., Yamauchi, T., and Izpisua Belmonte, J.C. (2016). An overview of mammalian pluripotency. *Development (Cambridge, England)* *143*, 1644-1648.
- Wu, S.C., Meir, Y.J., Coates, C.J., Handler, A.M., Pelczar, P., Moisyadi, S., and Kaminski, J.M. (2006). piggyBac is a flexible and highly active transposon as compared to sleeping beauty, Tol2, and Mos1 in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 15008-15013.
- Xenopoulos, P., Kang, M., and Hadjantonakis, A.K. (2012). Cell lineage allocation within the inner cell mass of the mouse blastocyst. *Results and problems in cell differentiation* *55*, 185-202.
- Xu, J., and Rogers, M.B. (2007). Modulation of Bone Morphogenetic Protein (BMP) 2 gene expression by Sp1 transcription factors. *Gene* *392*, 221-229.
- 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. *The Journal of biological chemistry* *288*, 9767-9778.
- Xu, Y., Zhang, M., Li, W., Zhu, X., Bao, X., Qin, B., Hutchins, A.P., and Esteban, M.A. (2016). Transcriptional Control of Somatic Cell Reprogramming. *Trends in Cell Biology* *26*, 272-288.
- Yamanaka, S. (2009). Elite and stochastic models for induced pluripotent stem cell generation. *Nature* *460*, 49-52.
- Yamanaka, S., and Blau, H.M. (2010). Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature* *465*, 704-712.
- Yan, W., and Chen, X. (2007). Targeted repression of bone morphogenetic protein 7, a novel target of the p53 family, triggers proliferative defect in p53-deficient breast cancer cells. *Cancer research* *67*, 9117-9124.
- Yang, A., Kaghad, M., Wang, Y., Gillett, E., Fleming, M.D., Dotsch, V., Andrews, N.C., Caput, D., and McKeon, F. (1998). p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Molecular cell* *2*, 305-316.
- Yang, A., and McKeon, F. (2000). p63 and p73: p53 mimics, menaces and more. *Nature reviews Molecular cell biology* *1*, 199-207.
- Yang, A., Schweitzer, R., Sun, D., Kaghad, M., Walker, N., Bronson, R.T., Tabin, C., Sharpe, A., Caput, D., Crum, C., *et al.* (1999). p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature* *398*, 714-718.
- Yang, A., Walker, N., Bronson, R., Kaghad, M., Oosterwegel, M., Bonnin, J., Vagner, C., Bonnet, H., Dikkes, P., Sharpe, A., *et al.* (2000). p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. *Nature* *404*, 99-103.
- Yang, C.S., Li, Z., and Rana, T.M. (2011). microRNAs modulate iPS cell generation. *RNA (New York, NY)* *17*, 1451-1460.



- Yang, D.H., and Moss, E.G. (2003). Temporally regulated expression of Lin-28 in diverse tissues of the developing mouse. *Gene expression patterns : GEP* 3, 719-726.
- Ying, Q.L., Nichols, J., Chambers, I., and Smith, A. (2003). 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., 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.
- Yokoyama, S., Hashimoto, M., Shimizu, H., Ueno-Kudoh, H., Uchibe, K., Kimura, I., and Asahara, H. (2008). Dynamic gene expression of Lin-28 during embryonic development in mouse and chicken. *Gene expression patterns : GEP* 8, 155-160.
- Yoon, M.-K., Ha, J.-H., Lee, M.-S., and Chi, S.-W. (2015). Structure and apoptotic function of p73. *BMB Reports* 48, 81-90.
- Yori, J.L., Johnson, E., Zhou, G., Jain, M.K., and Keri, R.A. (2010). Kruppel-like factor 4 inhibits epithelial-to-mesenchymal transition through regulation of E-cadherin gene expression. *The Journal of biological chemistry* 285, 16854-16863.
- Yu, J., Hu, K., Smuga-Otto, K., Tian, S., Stewart, R., Slukvin, I.I., and Thomson, J.A. (2009). Human Induced Pluripotent Stem Cells Free of Vector and Transgene Sequences. *Science (New York, NY)* 324, 797-801.
- 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 (New York, NY)* 318, 1917-1920.
- Zaika, A.I., Slade, N., Erster, S.H., Sansome, C., Joseph, T.W., Pearl, M., Chalas, E., and Moll, U.M. (2002). DeltaNp73, a dominant-negative inhibitor of wild-type p53 and TAp73, is up-regulated in human tumors. *The Journal of experimental medicine* 196, 765-780.
- Zaravinos, A. (2015). The Regulatory Role of MicroRNAs in EMT and Cancer. *Journal of Oncology* 2015, 13.
- Zeng, X., Li, X., Miller, A., Yuan, Z., Yuan, W., Kwok, R.P., Goodman, R., and Lu, H. (2000). The N-terminal domain of p73 interacts with the CH1 domain of p300/CREB binding protein and mediates transcriptional activation and apoptosis. *Molecular and cellular biology* 20, 1299-1310.
- Zhang, M., Lin, Y.H., Sun, Y.J., Zhu, S., Zheng, J., Liu, K., Cao, N., Li, K., Huang, Y., and Ding, S. (2016). Pharmacological Reprogramming of Fibroblasts into Neural Stem Cells by Signaling-Directed Transcriptional Activation. *Cell stem cell* 18, 653-667.
- Zhang, S., Fei, T., Zhang, L., Zhang, R., Chen, F., Ning, Y., Han, Y., Feng, X.H., Meng, A., and Chen, Y.G. (2007). Smad7 antagonizes transforming growth factor beta signaling in the nucleus by interfering with functional Smad-DNA complex formation. *Molecular and cellular biology* 27, 4488-4499.
- Zhang, Y., Yan, W., Jung, Y.S., and Chen, X. (2012a). Mammary Epithelial Cell Polarity Is Regulated Differentially by p73 Isoforms via Epithelial-to-mesenchymal Transition. *The Journal of biological chemistry* 287, 17746-17753.
- Zhang, Y., Yan, W., Jung, Y.S., and Chen, X. (2012b). Mammary epithelial cell polarity is regulated differentially by p73 isoforms via epithelial-to-mesenchymal transition. *The Journal of biological chemistry* 287, 17746-17753.
- Zhao, T., and Xu, Y. (2010). p53 and stem cells: new developments and new concerns. *Trends Cell Biol* 20, 170-175.

- Zhao, Y., Yin, X., Qin, H., Zhu, F., Liu, H., Yang, W., Zhang, Q., Xiang, C., Hou, P., Song, Z., *et al.* (2008). Two supporting factors greatly improve the efficiency of human iPSC generation. *Cell stem cell* 3, 475-479.
- Ziyad, S., and Iruela-Arispe, M.L. (2011). Molecular Mechanisms of Tumor Angiogenesis. *Genes & cancer* 2, 1085-1096.
- Zoric, A., Horvat, A., and Slade, N. (2013). Differential effects of diverse p53 isoforms on TAp73 transcriptional activity and apoptosis. *Carcinogenesis* 34, 522-529.



# Anexos



# p73 is required for endothelial cell differentiation, migration and the formation of vascular networks regulating VEGF and TGF $\beta$ signaling

R Fernandez-Alonso<sup>1,6</sup>, M Martin-Lopez<sup>1,6</sup>, L Gonzalez-Cano<sup>1,7</sup>, S Garcia<sup>1</sup>, F Castrillo<sup>1</sup>, I Diez-Prieto<sup>1,2</sup>, A Fernandez-Corona<sup>1,3</sup>, ME Lorenzo-Marcos<sup>1,3</sup>, X Li<sup>4</sup>, L Claesson-Welsh<sup>4</sup>, MM Marques<sup>5</sup> and MC Marin<sup>\*1</sup>

Vasculogenesis, the establishment of the vascular plexus and angiogenesis, branching of new vessels from the preexisting vasculature, involves coordinated endothelial differentiation, proliferation and migration. Disturbances in these coordinated processes may accompany diseases such as cancer. We hypothesized that the p53 family member p73, which regulates cell differentiation in several contexts, may be important in vascular development. We demonstrate that p73 deficiency perturbed vascular development in the mouse retina, decreasing vascular branching, density and stability. Furthermore, p73 deficiency could affect non endothelial cells (ECs) resulting in reduced *in vivo* proangiogenic milieu. Moreover, p73 functional inhibition, as well as p73 deficiency, hindered vessel sprouting, tubulogenesis and the assembly of vascular structures in mouse embryonic stem cell and induced pluripotent stem cell cultures. Therefore, p73 is necessary for EC biology and vasculogenesis and, in particular, that DNp73 regulates EC migration and tube formation capacity by regulation of expression of pro-angiogenic factors such as transforming growth factor- $\beta$  and vascular endothelial growth factors. DNp73 expression is upregulated in the tumor environment, resulting in enhanced angiogenic potential of B16-F10 melanoma cells. Our results demonstrate, by the first time, that differential p73-isoform regulation is necessary for physiological vasculogenesis and angiogenesis and DNp73 overexpression becomes a positive advantage for tumor progression due to its pro-angiogenic capacity.

Cell Death and Differentiation (2015) 22, 1287–1299; doi:10.1038/cdd.2014.214; published online 9 January 2015

Vascular system formation is one of the earliest events during organogenesis.<sup>1</sup> The original vascular plexus is established by vasculogenesis, through differentiation and assembly of mesodermal precursors.<sup>2</sup> The angiogenesis process allows the formation of new blood vessels from the existing vasculature and is perturbed in many diseases, including cancer.<sup>3</sup> Although efforts have been made to identify factors that control vascular development, the understanding of the molecular networks remains incomplete.

The formation of new capillaries and the remodeling of preexisting blood vessels is linked by signal transduction pathways.<sup>4</sup> The members of the p53 family (p53, p73 and p63) coordinate cell proliferation, migration and differentiation, and could act as regulators of vascular development. *TP73* function in angiogenesis is quite controversial,<sup>5–7</sup> and it has never been addressed using developmental models.

*TP73* has a dual nature that resides in the existence of TA and DNp73 variants. TAp73 is capable of transactivating p53 targets<sup>8–10</sup> whereas DNp73 can act as p53 and TAp73

repressor.<sup>11–13</sup> *TP73* final outcome will depend upon the differential expression of the TA/DNp73 isoforms in each cellular context, as they can execute synergic, as well as antagonist, functions.

*TP73* role during development is emphasized by the p73-knockout mice (*Trp73*–/–, p73KO from now on) multiple growth defects.<sup>14</sup> These mice, which lack all p73 isoforms, exhibit gastrointestinal and cranial hemorrhages,<sup>14</sup> suggestive of vascular fragility. Furthermore, TAp73 directly regulates GATA-1,<sup>8</sup> which is essential for endothelial and hematopoietic differentiation.<sup>15,16</sup> This compounded information led us to hypothesize that p73 could be implicated in the regulation of vasculogenesis/angiogenesis.

Regulation of these processes involves a broad range of signaling molecules essential for vascular growth and stability,<sup>17</sup> such as vascular endothelial growth factor (VEGF)<sup>18</sup> and transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ).<sup>19</sup> TGF- $\beta$  operates as a rheostat that controls endothelial cell (EC) differentiation, having an inhibitory effect on EC migration and proliferation by the TGF- $\beta$ /TGFRI (ALK5)/Smad2/3 pathway,

<sup>1</sup>Instituto de Biomedicina (IBIOMED), Departamento de Biología Molecular, University of Leon, Campus de Vegazana, 24071 Leon, Spain; <sup>2</sup>Departamento de Medicina, Cirugía y Anatomía Veterinaria, University of Leon, Campus de Vegazana, 24071 Leon, Spain; <sup>3</sup>Complejo Hospitalario de Leon, Altos de Nava s/n, 24071 Leon, Spain; <sup>4</sup>Rudbeck Laboratory and Science for Life Laboratory, Department of Immunology, Genetics and Pathology, Uppsala University, Dag Hammarskjöldsv 20, 751 85 Uppsala, Sweden and <sup>5</sup>Instituto de Desarrollo Ganadero, University of Leon, Campus de Vegazana, 24071 Leon, Spain

\*Corresponding author: MC Marin, Instituto de Biomedicina (IBIOMED), Departamento de Biología Molecular, Universidad de Leon, Campus de Vegazana, 24071 Leon, Spain. Tel: +34 987 291793; Fax: +34 987 291998; E-mail: carmen.marin@unileon.es

<sup>6</sup>These authors contributed equally to this work.

<sup>7</sup>Current address: Centre for Systems Biomedicine (LCSB), University of Luxembourg, 7 Avenue des Hauts-Fourneaux, 4362 Esch-Belval, Luxembourg.

**Abbreviations:** EB, embryoid body; EC, endothelial cells; HUVEC, human umbilical vein cells; iPSC, induced pluripotent stem cells; mESC, mouse embryonic stem cells; p73KO, p73 –/–; TGF- $\beta$ , transforming growth factor- $\beta$ ; VEGF, vascular endothelial growth factor; WT, wild type

Received 15.4.14; revised 12.11.14; accepted 13.11.14; Edited by E Candi; published online 09.1.15

while the T $\beta$ R11–ALK5/ALK1 complex activates Smad1/5/8, ID1 expression and a pro-angiogenic state.<sup>20–22</sup>

Regulation of the TGF- $\beta$  and VEGF pathways by p53 family members has been documented.<sup>23,24</sup> However, p73's function in these pathways during development remains largely unexplored. In this work, we have used mouse embryonic stem cells (mESC) and induced pluripotent stem cells (iPSCs) as models that recapitulate early vascular morphogenesis.<sup>25–27</sup> ESC and iPSC form multi-cellular aggregates (embryoid bodies, EBs) that, under appropriate conditions, generate functional EC.<sup>28</sup> mESC and iPSC differentiation capacity into ECs has been fully addressed.<sup>29,30</sup> We have also performed retinal vascularization analysis to assess vascular processes *in vivo*.<sup>31,32</sup>

We demonstrate that p73 deficiency perturbs density and stability of mouse retinal development by affecting VEGF and TGF- $\beta$  signaling. Furthermore, p73 is necessary for the assembly of vascular structures under physiological conditions in mESC and iPSC. Moreover, DNp73 positively affects angiogenesis through regulation of the TGF- $\beta$  pathway in human umbilical vein cells (HUVEC) and DNp73-overexpression results in enhanced angiogenic potential of B16-F10 melanoma cells.

## Results

**Defects in retinal vessel migration and vascular morphology in p73-deficient mice.** P5-p73KO and wild-type (WT) mice retinas were analyzed to ascertain p73 developmental function in vascular formation using isolectin B4 (IB4) staining. At the leading edge of the vascular plexus (sprouting zone), WT-tip cells and their extending filopodia were directed toward the periphery, guiding the direction of vascular growth (Figure 1a, arrows). In contrast, p73KO retinas had disoriented tip cells (arrows) with long and thin filopodia (Figures 1a, circles and 1b). The central plexus was also abnormal, appearing disorganized, less dense and branched than WT (Figure 1a, right panel). Morphometric analysis showed increased lacunarity and moderate, but highly significant, decrease in vessel covered area, vessel length and branching index, indicating a less dense p73-deficient vascular plexus (Figure 1b).

P5 and P7-p73KO vascular plexus had less spreading suggesting that the abnormal filopodia was affecting tip cell migration<sup>33</sup> (Figure 1c). IB4 positive (IB4<sup>+</sup>) macrophages, which act as cellular chaperones for EC fusion,<sup>34</sup> appeared as

isolated cell clusters, rather than interacting with tip cell filopodia (Figure 1a, middle panel, arrow heads), supporting the idea of a defective guidance and migration in p73-deficient ECs.

We sought to analyze whether p73-loss affected vessel architecture and stability. The vascular basement membrane, marked by type IV-collagen staining, is closely associated with the EC abluminal surface.<sup>35</sup> Thus, empty basement membrane sleeves (collagen-IV<sup>+</sup>/IB4<sup>-</sup>) identify vessel regression.<sup>36</sup> In WT central plexus, most vessels showed collagen-IV<sup>+</sup>/IB4<sup>+</sup> staining with only a few empty collagen-IV sleeves (Figure 1d, arrows). However, in p73KO, empty sleeves were frequent, suggesting that p73 deficiency results in vessel regression.

Next, we examined the resident astrocytic network, which provides guidance cues for ECs by establishing a VEGF-A gradient. Although in WT retinas, astrocytes and ECs closely followed one another, in p73-deficient retinas astrocytes displayed a chaotic reticulation with astrocytes clumps (Figure 1e, white arrows) surrounded by IB4<sup>+</sup> cells (arrow heads). p73KO retinas had significantly reduced VEGF-A expression and distribution (Figures 1f, yellow arrows and 2a), confirming a hindered pro-angiogenic signaling in the absence of p73. WT retinas showed IB4<sup>+</sup>/VEGF-A<sup>+</sup>-microglial cells commonly found where two tip-cells were contacting each other, at sites of prospective sprout anastomosis (Figure 1f, arrow heads). In p73KO, microglia was isolated and not fully interacting with the ECs. Thus, lack of p73 affects the retinal microglia, hindering the VEGF-A gradient for EC migration.

TGF- $\beta$  signaling is essential for EC organized migration and determines EC function during development.<sup>20,37</sup> We detected a significant decrease in TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ R1 and ALK1 levels in p73KO retinas (Figures 2b–d), and significantly lower ID1 levels (Figure 2e), suggesting an attenuated pro-angiogenic state. Taken together, our data demonstrate that p73 is necessary for retinal vasculature organization and suggest that p73 could be a positive regulator of EC migration, vessel sprouting and tubulogenesis *in vivo* regulating the VEGF and TGF- $\beta$  pathways.

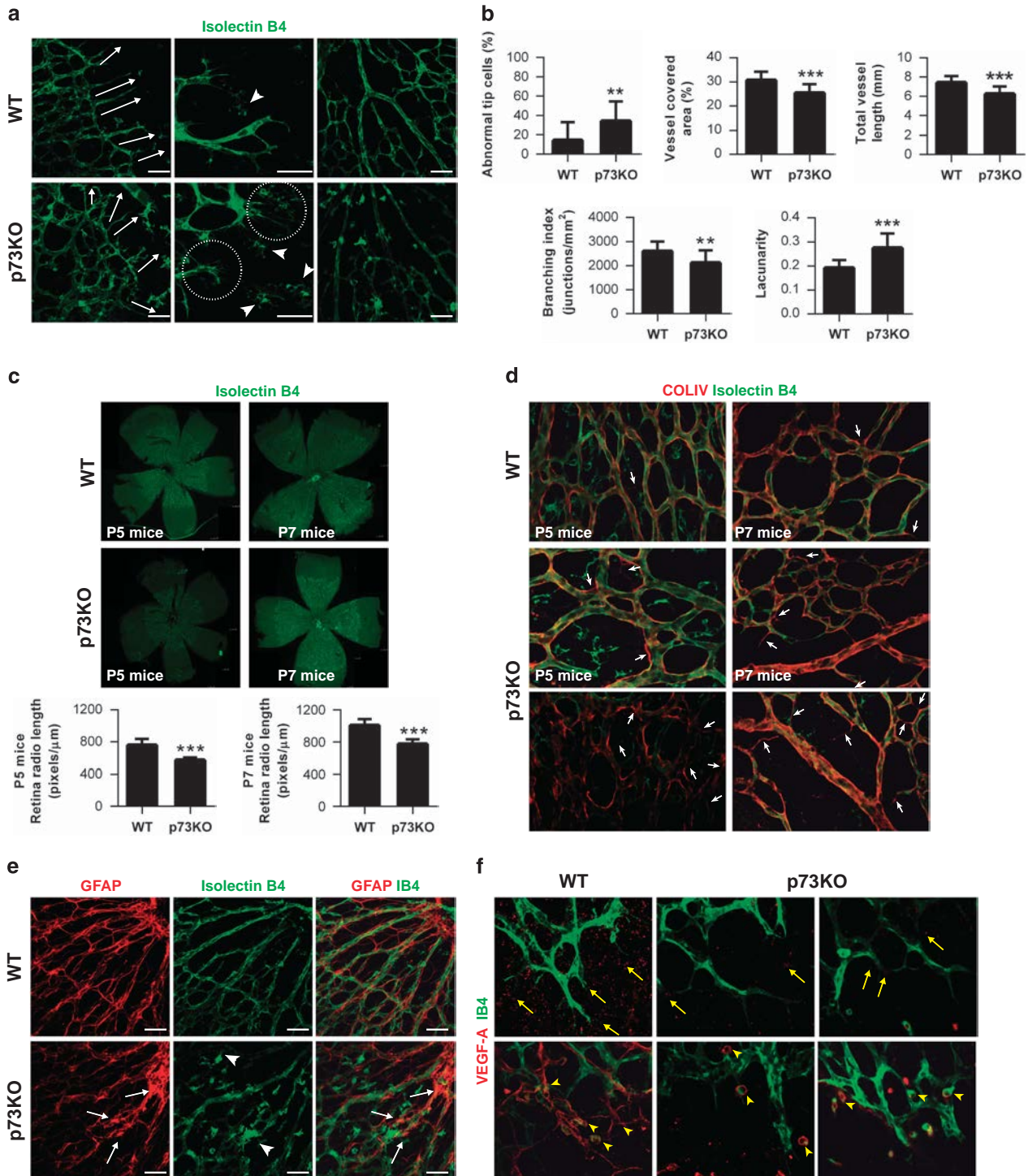
**p73 deficiency results in impaired endothelial differentiation and reduced angiogenic sprouting in mESCs.** We used mESC and iPSC to address p73 function in EC differentiation and vasculogenesis. Both TA and DNp73 isoforms were expressed in mESCs at low but consistent levels, with DNp73 being the most abundant isoform

**Figure 1** Absence of p73 perturbs development of the retinal vasculature. (a) Retinas from P5 WT and p73KO mice were stained with isolectin B4 (IB4) to analyze the morphology and orientation (white arrows, left panels) of filopodia at the leading edge of vascularization. Higher-magnification images for each genotype (medium panels) show abundant and disorientated filopodia (circles) and tissue macrophages (arrow heads) in p73KO retinas. Scale bars = 50  $\mu$ m. Right panels illustrate perturbed vascular branching and decreased vascular density in p73KO central retinal plexus compared with WT. (b) Quantification of vessel coverage (percentage of area covered by IB4<sup>+</sup> endothelial cells), total vessel length, vascular branching index (branch points/unit area) and lacunarity (distribution of the gap sizes surrounding the object). Representative images were analyzed independently using the AngioTool software (<http://angiotool.nci.nih.gov>). (c) IB4 retinal flat-mount staining of P5 and P7 retinas. Radio was measured from the optic nerve to the sprouting zone. The spreading of the vasculature toward the periphery is highly significantly reduced in p73KO retinas. (d) Visualization of empty matrix sleeves by IB4 (green) and collagen IV (red) staining, with increased presence of collagen IV sleeve segments lacking endothelial cells (IB4-negative; white arrows) in p73KO retinas. (e) GFAP/IB4 double staining to visualize astrocytes (red) and vasculature (green), respectively. p73KO retinas display a disorganized astrocyte network underlying a chaotic vasculature; tufts are indicated by arrow heads. (f) VEGF-A immunostaining (red) in P5 retinas. Note that VEGF-A expression is markedly decreased in the absence of p73. Yellow arrow heads indicate IB4<sup>+</sup>/VEGF-A<sup>+</sup> microglial cells commonly found at sites of prospective sprout anastomosis. All statistical analysis were performed with data from at least five animals. Bar graphs represent mean  $\pm$  S.D. Equal-variance Student's *t*-test was performed to evaluate statistical differences. \*\**P* < 0.01; \*\*\**P* < 0.001

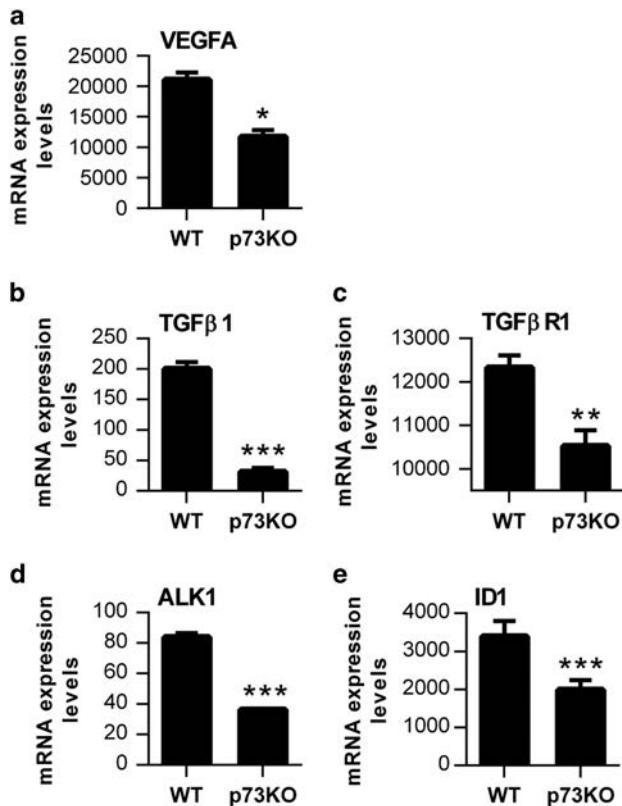
(Figure 3a). Stable cell lines with constitutive p73-dominant-negative mutant (DDp73) expression were generated<sup>38</sup> (Supplementary Figure 1a). The clones exhibited the typical ES morphology, alkaline phosphatase activity as well as Nanog expression (Supplementary Figure 1b), and were able to differentiate into derivatives of the three germ layers (Supplementary Figure 1c). Although DDp73 cells expressed the mesodermal/endothelial marker CD31, they failed to form vascular networks like the WT cells (Supplementary Figures

1c and d), supporting a possible role for p73 in endothelial morphogenesis.

Next, we differentiated mESCs under two-dimensional (2D) and three-dimensional (3D) endothelial-specific conditions (Supplementary Figure 1e). The 3D model recapitulates the developmental steps of vasculogenesis and sprouting angiogenesis, whereas the 2D EBs recapitulate the formation of the primitive vascular network *in vivo*.<sup>25</sup> EBs were immunostained for CD31 and vascular endothelial (VE)-cadherin and EB size







**Figure 2** Lack of p73 affects TGF- $\beta$  signaling *in vivo*. Quantification of VEGF-A expression and analysis of the TGF- $\beta$ /ALK1/ID1 signaling pathway in P5 retinas from WT and p73KO mice. qRT-PCR analysis demonstrated a significant decrease in VEGF-A expression (a), TGF- $\beta$  1 expression (b), TGF- $\beta$ R1 expression (c), ALK1 expression (d) and ID1 expression levels (e) in the absence of p73. Analysis was performed with data from three independent experiments. Mean  $\pm$  S.D. are represented; equal-variance Student's *t*-test was performed to evaluate statistical differences. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$

and morphology were analyzed (Figures 3b and c). Control EBs had CD31<sup>+</sup> cells forming a branching network from the center of the EB to the outer rim (Figure 3b, upper panel), whereas DDp73-EBs had a smaller diameter and their ECs (CD31<sup>+</sup> or VE-cadherin<sup>+</sup>) did not assemble into a vascular network (Figures 3b and c).

In 3D conditions, control EBs formed a vascular network after 7 days *in vitro* (7 DIV) whereas DDp73-EBs failed to sprout (Figure 3d). After 10 DIV, more than 75% of control EBs showed branched CD31<sup>+</sup> and VE-cadherin<sup>+</sup> sprouts (Figures 3e and f). However, DDp73-EBs had fewer and shorter sprouts that failed to form a branched network. In DDp73-EBs only some VE-cadherin<sup>-</sup> cells migrated away from the EB core (Figure 3f, arrows), supporting the notion that p73 deficiency affects EC migration and tube formation.

DDp73 effect on vascular morphogenesis may involve a crossed effect on other p53 family members.<sup>38</sup> To rule out this possibility, iPSC reprogrammed from p73KO or WT mouse embryonic fibroblasts were used (Martin-Lopez *et al.*, manuscript under preparation). WT-iPSC-EBs in 3D culture exhibited abundant sprouts that constituted an intricate network (Figures 3g and h). In contrast, only few p73KO-iPSC-EBs had sprouts that were short and unable to form networks (Figure 3g). CD31-immunostaining highlighted the lack of

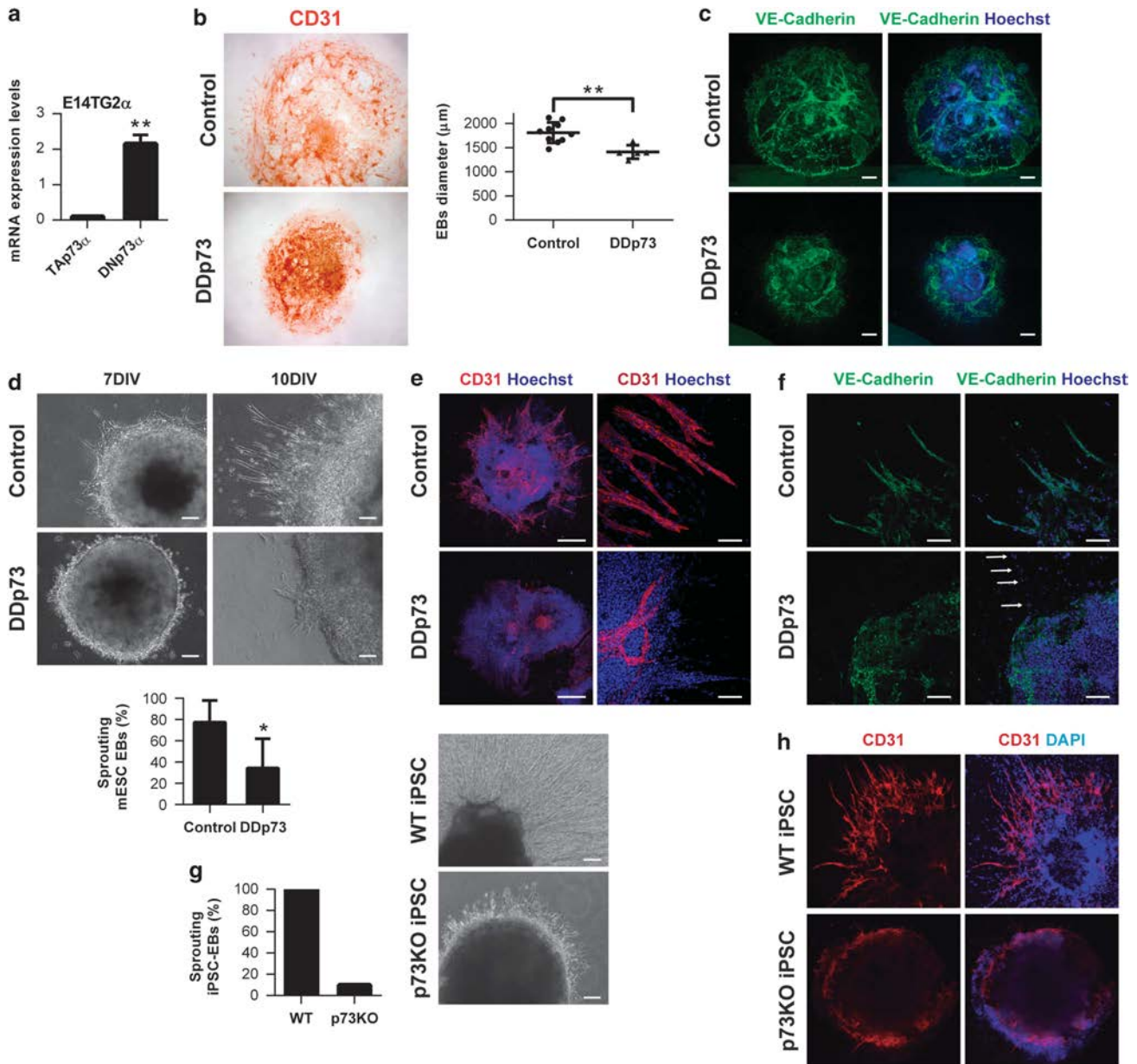
sprouts of p73KO-iPSC-EBs (Figure 3h). To rule out the possibility that reprogramming had affected the genetically modified iPSCs capacity to form 3D vascular sprouts, we also differentiated p53KO and p73KO/p53KO iPSC. p53KO-iPSC EBs generated a profuse vascular network, demonstrating that reprogramming did not affect the capacity of KO cells to differentiate into ECs and form vascular sprouts. Thus, p53 was not required for this process, but lack of p73, even in the context of p53-deficiency, resulted in lack of vascular sprouts (Supplementary Figure 2a), confirming p73 requirement and that the defect in sprout formation was not due to enhanced p53-dependent cell death.

To address whether p73 deficiency could have a non-cell autonomous effect, we performed a co-culture experiment mixing GFP<sup>+</sup>-mESC with either WT-iPSC or p73KO-iPSC, and differentiating them under 3D endothelial-specific conditions (Supplementary Figure 2b). Although GFP<sup>+</sup>-mESC/WT-iPSC EBs were able to differentiate into ECs that form vascular sprouts, only few GFP<sup>+</sup>-cells from the GFP<sup>+</sup>-mESC/p73KO-iPSC EBs were capable to migrate and form sprouts. These results supported p73 critical role in vascular morphogenesis, but also indicated that p73 deficiency has a non-cell autonomous effect over neighboring WT-ECs.

To study the mechanism of p73 regulation on EC commitment, endothelial CD31<sup>+</sup> cells and differentiated (but non-endothelial) CD31<sup>-</sup> cells from 12 DIV-EBs were isolated. The number of CD31<sup>+</sup> cells from DDp73-EBs was significantly lower than from control-EBs (Figure 4a), indicating that p73 function is required for efficient endothelial differentiation. To determine the contribution of p73 isoforms in this process, we compared TA and DNp73 expression in undifferentiated mESC (gray bars) with that in differentiated CD31<sup>+</sup> ECs (black bars). Both isoforms were significantly upregulated in the CD31<sup>+</sup> population compared with the undifferentiated mESC, with DNp73 being predominant in ECs (Figure 4b). The non-endothelial differentiated CD31<sup>-</sup> cells (white bars) showed the opposite pattern of isoform expression (TA > DN). Analysis of EC markers revealed that CD31 and VE-cadherin levels were significantly lower in DDp73-CD31<sup>+</sup> cells (Figure 4c), confirming that p73 functional inhibition impairs EC differentiation.

So far our results suggest that p73 could be regulating some of the molecular pathways that control endothelial differentiation, migration and/or assembly of endothelial precursors. To address this, we analyzed VEGF-A and TGF- $\beta$  signaling, both altered in p73KO retinas. In agreement with previous publications,<sup>6,7</sup> DDp73-CD31<sup>+</sup> cells expressed lower levels of VEGF-A (Figure 4d). The expression of VEGFR1, a decoy of angiogenic signaling, was significantly higher in DDp73-CD31<sup>+</sup>, while VEGFR2 expression, the VEGF signaling transducer, was lower (Figure 4d). The VEGFR2/VEGFR1 ratio, which may be considered as a pro-angiogenic indicator,<sup>39</sup> was about five times lower in DDp73-CD31<sup>+</sup>. Furthermore, we detected a significant reduction in TGF- $\beta$  expression, with a concomitant attenuation in ID1 levels, in DDp73-CD31<sup>+</sup> cells (Figure 4e), all consistent with a decrease in the number of cells committed to endothelial lineage.<sup>40</sup>

Taken together, our data indicate that the lack of p73 in mESC attenuates endothelial differentiation, diminishes the angiogenic potential of the differentiated cells and hinders angiogenic sprouting of 3D-EBs, therefore demonstrating that

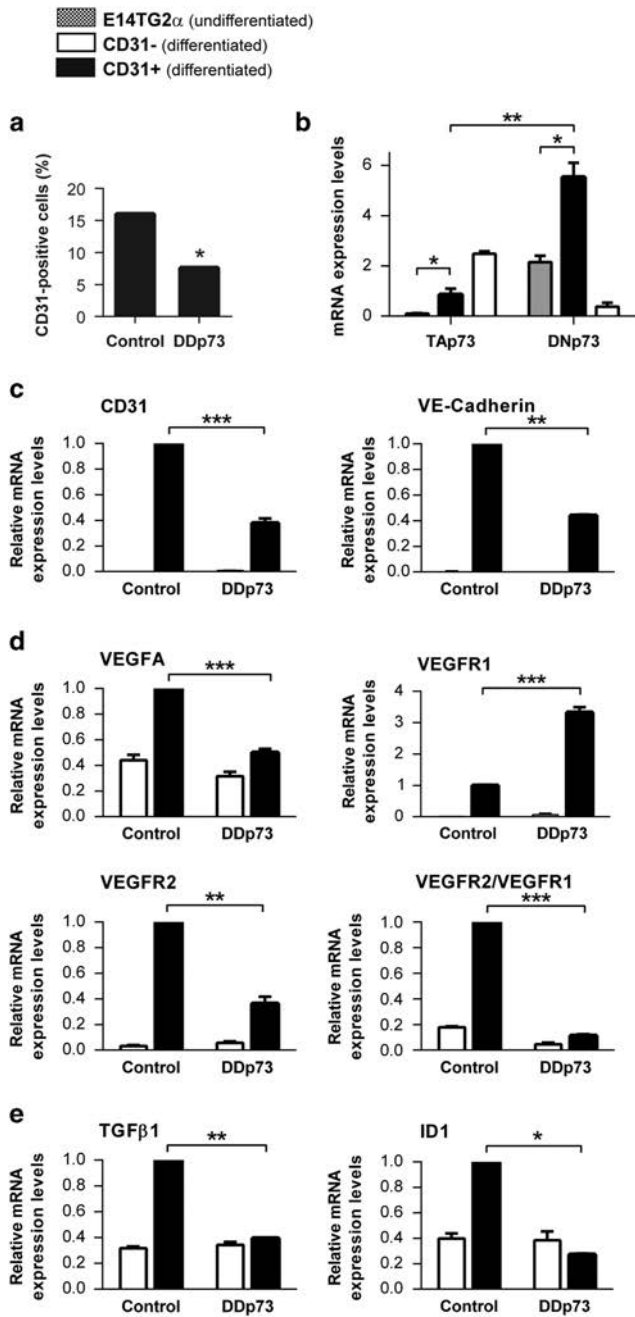


**Figure 3** Lack of p73 impairs the formation of vascular structures and endothelial sprouting of mESC and iPSC in the EB endothelial differentiation model. (a) Quantitative analysis of p73 isoform expression (TA and DN) by qRT-PCR in proliferating E14TG2a mESC. Ct-Tap73: 38.22 and  $\Delta$ Ct-Tap73: 0.099; Ct-DNp73: 33.78 and  $\Delta$ Ct-DNp73: 2.15 (b–c) EBs size, morphology and formation of vascular structures in WT and DDP73 mESC EBs under 2D differentiation culture conditions. (b) EBs were stained for CD31 expression and EB average diameter for individual EBs ( $n \geq 10$ ) was calculated after 7 days *in vitro* (7 DIV). (c) VE-cadherin immunostaining (green) shows that DDP73-EBs did not assemble into vascular networks. (d–f) Angiogenic sprouting in WT and DDP73 mESC EBs under 3D differentiation conditions. (d) Phase contrast images correspond to 7 DIV and 10 DIV EBs. Graph shows percentage of sprouting EBs at day 18. (e) CD31 expression (red) and (f) VE-cadherin expression (green) demonstrate that DDP73 mESC EBs failed to form a branched vascular network. Scale bars = 500  $\mu$ m (e, left panel), 100  $\mu$ m (e, right panel) and 250  $\mu$ m (f). (g,h) Angiogenic sprouting in WT and p73KO iPSC-EBs under 3D differentiation conditions. (g) Phase contrast images of 12 DIV iPSC-EBs illustrate sprouts in WT EBs, but not in the p73KO-iPSC-EBs. Graph represents percentage of sprouting EBs at day 18. (h) CD31 expression (red) highlighted that p73-deficient iPSC cannot form vascular structures. Data represent mean values  $\pm$  S.D.; equal-variance Student's *t*-test was performed to evaluate statistical differences. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

p73 is a positive regulator of *in vitro* vasculogenesis/angiogenesis, at least in part, by modulating pro-angiogenic signaling through the VEGF and TGF- $\beta$  pathways.

**DNp73 silencing interferes with HUVECs to undergo migration and tubulogenesis.** To show that p73 has a specific role in EC biology, independently of its possible effect

in other cell types within the retina or in the EBs, we used HUVECs. p73 isoforms were differentially expressed in HUVECs, with DNp73 expression being about 2.7 times higher than Tap73 ( $2.7 \pm 0.0002$ ; Ct-Tap73: 36.70 and  $\Delta$ Ct-Tap73: 0.00019; Ct-DNp73: 35.60 and  $\Delta$ Ct-DNp73: 0.00045). We suppressed p73 function with DDP73 or by an RNA interference knockdown (p73KD) using previously validated



**Figure 4** p73 functional inhibition hinders mESC endothelial differentiation, decreases endothelial marker expression and blunts the pro-angiogenic state of the obtained endothelial cells. (a) CD31 positive cells were isolated with magnetic beads and the obtained cell number was quantified. (b) qRT-PCR analysis of p73 isoform expression in proliferating undifferentiated E14Tg2a (square bars), differentiated non-endothelial CD31<sup>-</sup> negative cells (CD31<sup>-</sup>, white bars) and differentiated CD31 positive endothelial cells (CD31<sup>+</sup>, black bars) demonstrated that TA and DNp73 are differentially regulated during mESC endothelial differentiation. (c–e) Quantitative qRT-PCR analysis of endothelial cell marker expression (c), VEGF signaling (d) and TGF- $\beta$ /ID1 signaling (e), in CD31<sup>-</sup> (white bars) and CD31<sup>+</sup> cells (black bars) isolated from either control or p73DD-EBs. Bars represent mean values  $\pm$  S.D.; experiments were repeated twice; equal-variance Student's *t*-test was performed to evaluate statistical differences. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001

small interfering RNA (siRNA) oligos: p73i.4 for total-p73KD, TAp73i for specific TAp73 or DNp73i for DNp73-KD.<sup>8</sup> The maximal interference using these siRNAs occurs 72 h after transfection, lasting more than 48 h.<sup>8</sup> All angiogenic assays were carried out during this period. It is important to point out that p73KD did not affect HUVEC proliferation kinetics within this time frame (Supplementary figure 3).

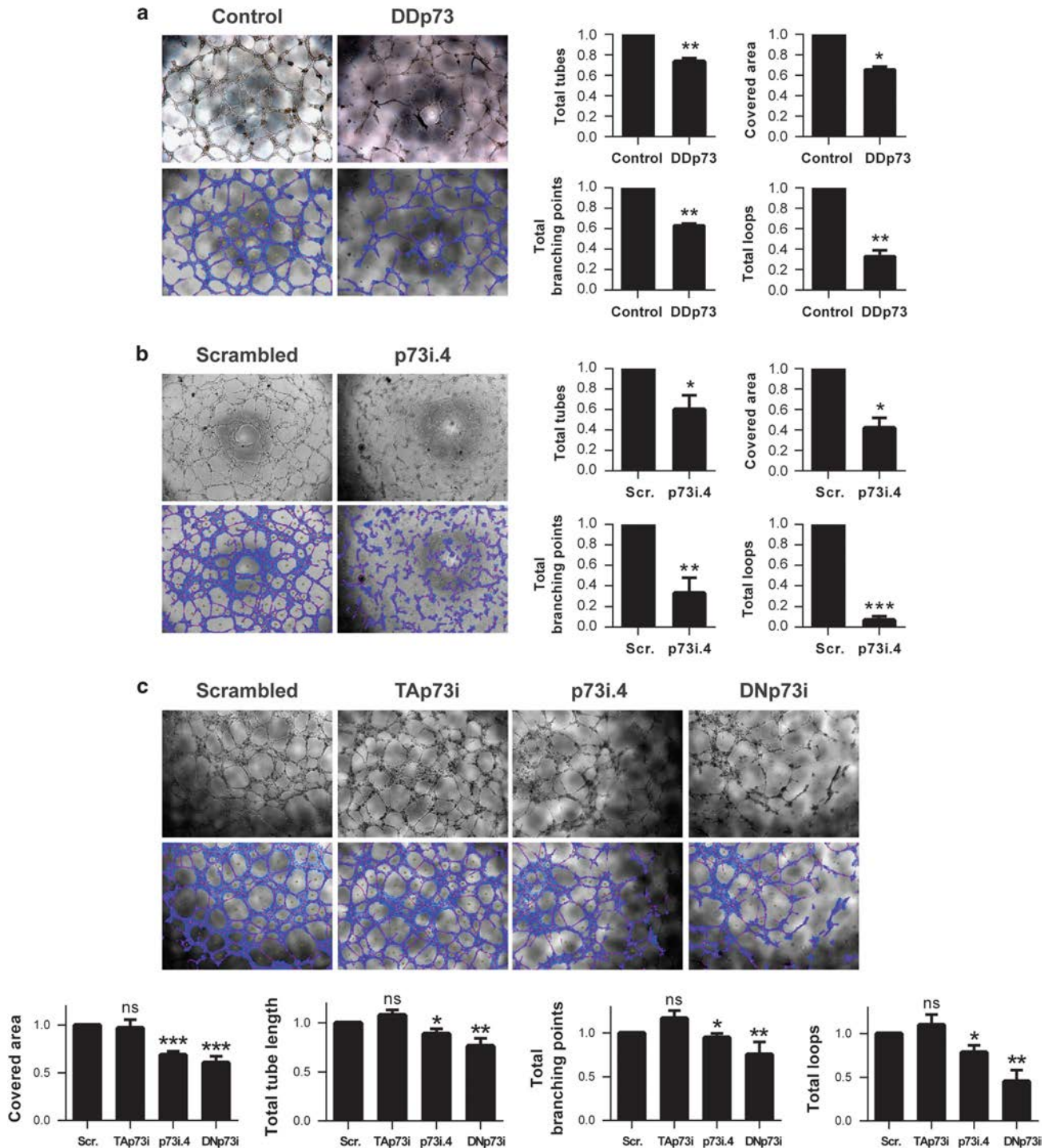
HUVECs were transfected with either DDp73 or siRNAi-p73i.4 and tube formation was monitored and quantitatively analyzed. p73-deficient HUVEC showed reduced tube formation capacity and networks with reduced area and fewer branching points and loops (Figures 5a and b). Total-p73KD and DNp73 in particular, but not TAp73 alone, provoked a significant reduction in all the analyzed parameters (Figure 5c). These parameters revealed a defective capacity of the interfered ECs to migrate and assemble into tubular structures, indicating that DNp73 deficiency results in an impaired endothelial morphogenesis. On the contrary, under normoxic conditions, there was no significant effect on any of the analyzed parameters after TAp73 KD.

Next, p73 role in EC migration was addressed by wound healing or 'scratch' assays.<sup>41</sup> The percentage of wound closure was significantly reduced upon functional inhibition or total p73KD (Figure 6a). DNp73KD, but not TAp73KD alone, attenuated wound closure (Figure 6c), indicating that DNp73 is a positive regulator of EC migration. We examined TA and DN expression kinetics after the wounding. As shown in Figure 6b, both isoforms were upregulated to a similar extent, indicating that the EC-characteristic DNp73 > TAp73 ratio was maintained. To conclusively demonstrate that DNp73 function was necessary for EC migration, we performed a phenotype recovery experiment. DNp73 overexpression in siRNA-p73i.4 cells restored the migratory capacity (Figure 6d), confirming DNp73 as a positive regulator of EC migration.

To elucidate the molecular mechanisms underlying the DNp73 regulation, we analyzed the VEGF and TGF- $\beta$  pathways. We examined phosphorylated ERK1/2 as a downstream indicator of VEGF signaling<sup>42</sup> and, as published,<sup>43</sup> both p73 isoforms regulated this pathway (Figure 7a). VEGF-A levels were strongly downregulated upon total p73 and DNp73 silencing, (Figures 7a and b), and barely affected after TAp73KD (Figure 7b), pointing to DNp73 as the predominant regulator on HUVEC normoxic cultures. However, transcriptional analysis indicated that ectopic DNp73 expression did not induce VEGF-A promoter activity (Supplementary Figure 4a), suggesting the existence of other downstream posttranscriptional regulatory mechanisms.

On the other hand, analysis of TGF- $\beta$ 1/ALK1/ID1 pathways showed that only DNp73 is upregulated by TGF- $\beta$ 1 treatment in a dose-dependent manner (Figure 7c), linking p73 differential regulation to the angiogenic TGF- $\beta$ 1 signaling axis. Indeed, DNp73 silencing resulted in significantly reduced p-SMAD1/5 and total SMAD1 proteins (Figure 7a), and TGF- $\beta$ 1, ALK1 and ID1 levels (Figure 7d), unequivocally demonstrating that DNp73 is required for TGF- $\beta$ 1/ALK1/ID1 signaling in ECs.

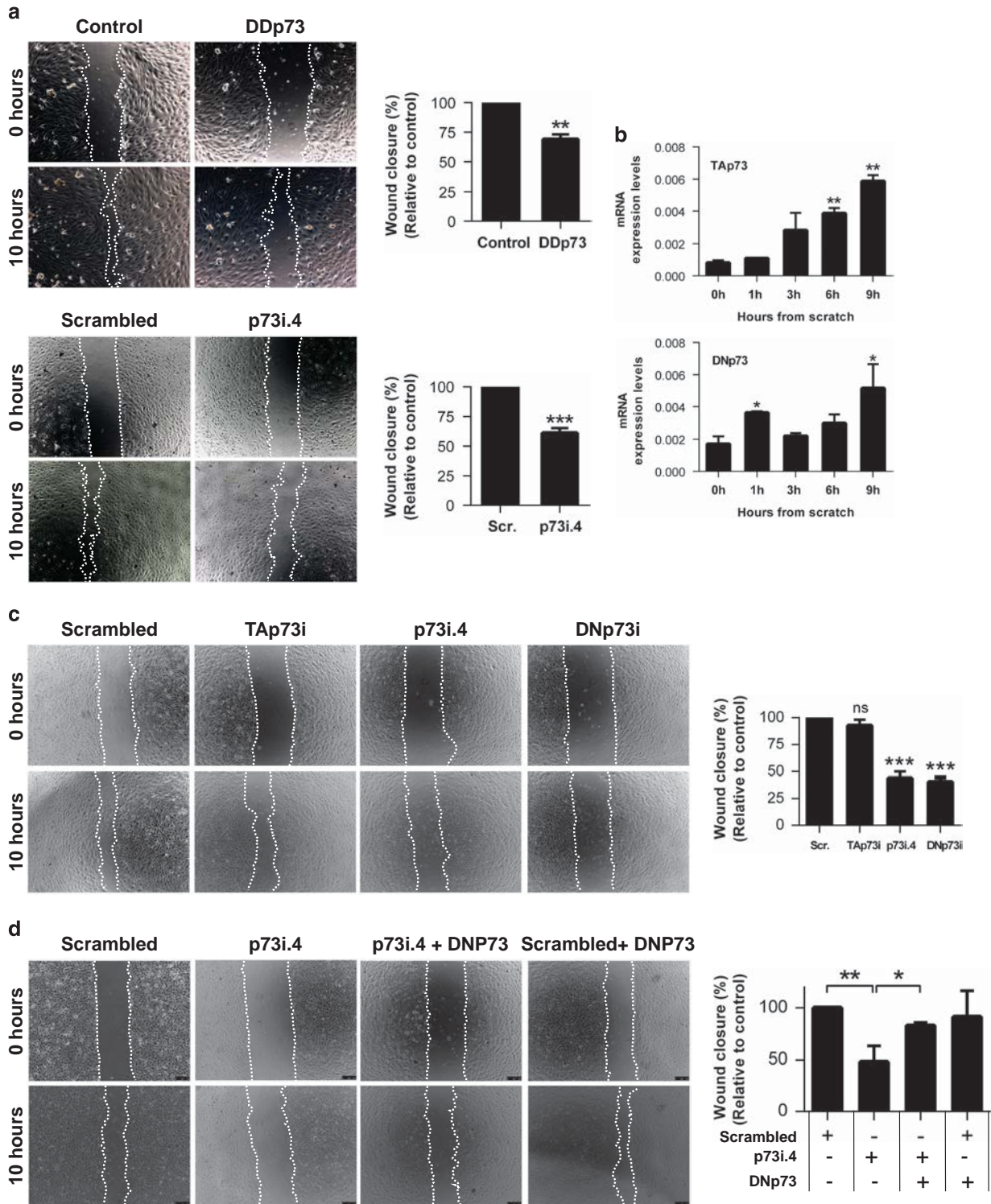
We have demonstrated p73 requirement for EC biology and vasculogenesis and, in particular, that DNp73 regulates EC migration and tube formation. However, our *in vivo* data also indicated that p73 deficiency could affect non-EC resulting in



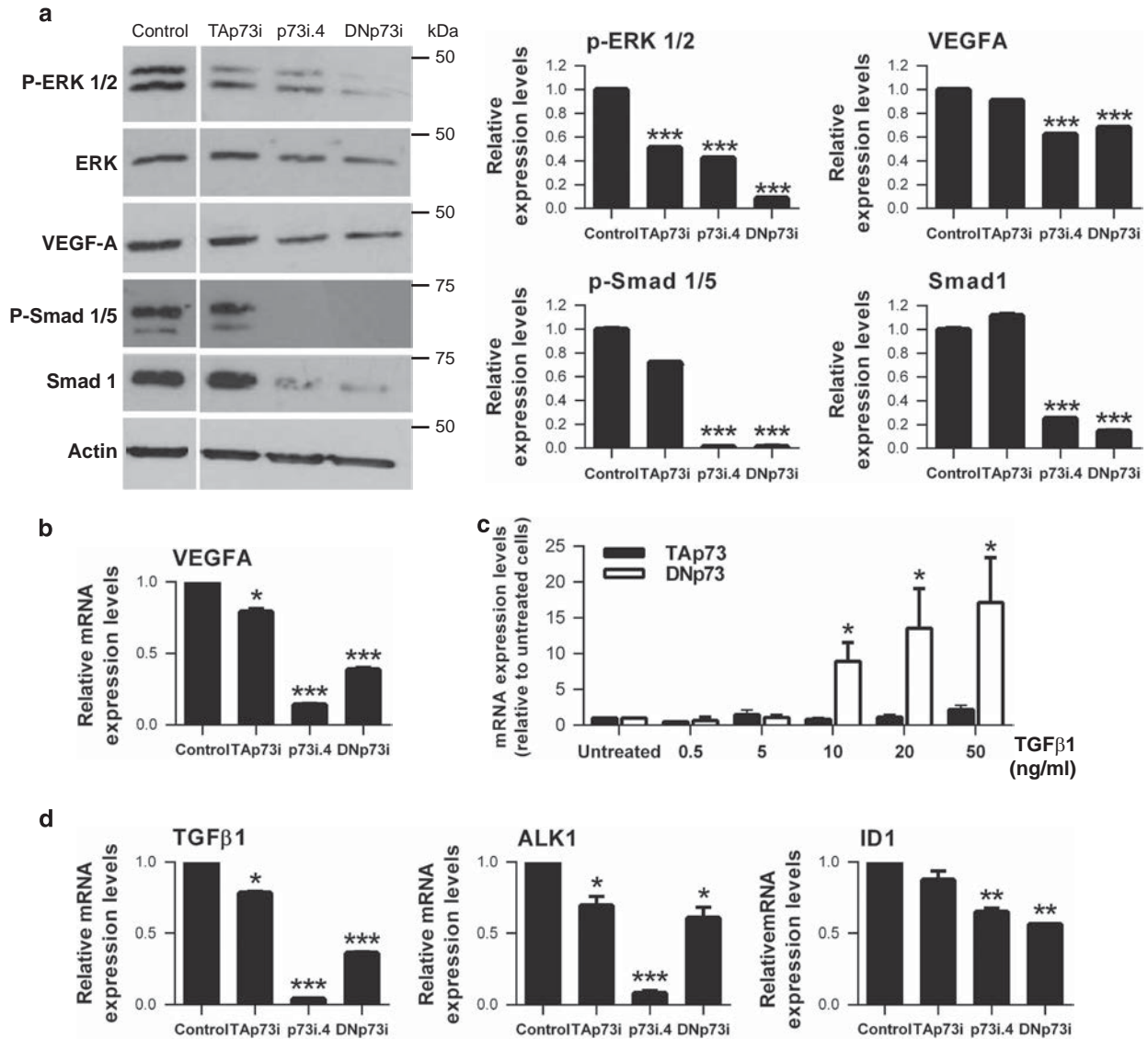
**Figure 5** p73 function, and DNP73 in particular, is required for tube morphogenesis in HUVEC. Tube formation assays on Matrigel in HUVEC upon (a) p73 functional inhibition – DDp73, (b) knockdown of total p73 – p73i.4 or (c) specific knockdown of TA or DNP73 isoforms – Tap73i and DNp73i, respectively. Tube formation was monitored microscopically and images were analyzed using WimTube software (Wimasis GmbH). Covered area, total tubes, total tube length, total branching points and total number of loops are shown as representative parameters. Experimental data were normalized to the control (a) or to the scrambled (Scr.; b,c). Data represent mean values  $\pm$  S.D.;  $n \geq 3$ , experiments were repeated at least three times; equal-variance Student's *t*-test was performed to evaluate statistical differences: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$

reduced pro-angiogenic milieu. We sought to address whether DNp73 could affect tumor angiogenesis, using the syngeneic transplantation model of B16-F10 melanoma.<sup>44</sup> Conditioned media (CM) was prepared from B16-F10 melanoma cells with

either silenced (Supplementary figure 4b) or transiently overexpressed DNp73 (Supplementary figure 4c), and its angiogenic effect on HUVEC was tested in scratch assays. DNp73-deficient CM retard, but do not suppress, HUVEC



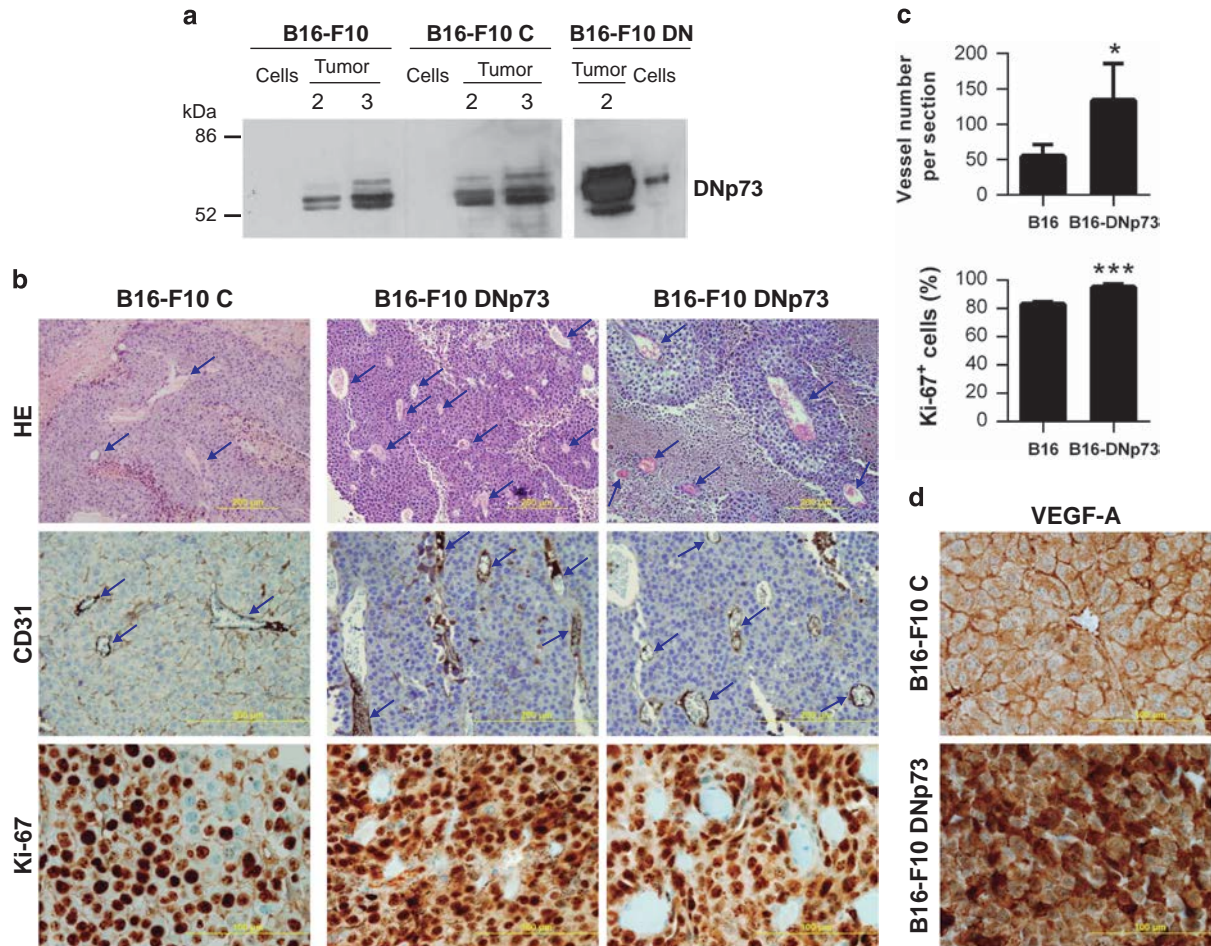
**Figure 6** p73, and DNp73 in particular, acts as a positive regulator of HUVEC migration. Wound healing assays (**a**) p73 functional inhibition (DDp73, upper panel) and total p73 knockdown (p73i.4, lower panel) or (**c**) specific knockdown of TA or DNp73 (TAp73i and DNp73i, respectively). Endothelial cell migration into the 'wound' denuded area was monitored microscopically and the percentage of wound closure after 10 h was calculated relative to the control. (**b**) Expression kinetics of p73 isoforms during wound-healing assays were analyzed by qRT-PCR. (**d**) HUVEC were cotransfected with p73i.4 siRNA (silencing of total p73) or scrambled oligos (Scr.) together with a DNp73 expressing plasmid, and a wound healing assay was performed. Data represent mean values  $\pm$  S.D.;  $n=3$ ; experiments were repeated at least three times; equal-variance Student's *t*-test was performed to evaluate statistical differences. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$



**Figure 7** Total p73 and specific DNp73 knockdown in HUVEC led to a decrease in the downstream angiogenic signaling. The indicated knockdown experiment was performed in HUVEC (p73i.4: total p73 knockdown; TAp73i: TAp73 specific knockdown; DNp73i: DNp73 specific knockdown). (a) Expression of P-ERK1/2, ERK, VEGF-A, P-Smad1/5 and Smad1 were analyzed by western blot and protein levels were quantified using Quantity One software (Bio-Rad). (b) Quantitative analysis of VEGF-A mRNA levels was done by qRT-PCR. (c, d) Quantitative analysis of TGF-β1, ALK1 and ID1 mRNA levels was done by qRT-PCR. Data represent mean values ± S.D.; experiments were repeated twice; equal-variance Student's *t*-test was performed to evaluate statistical differences. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001

wound healing, while DNp73-overexpressed CM failed to accelerate the healing rate. These data could be interpreted as that DNp73 does not alter B16-F10 cells angiogenic potential. However, we hypothesized that DNp73 positively regulates angiogenesis by repressing an anti-angiogenic factor. In this scenario, the previous assay might not be sensitive enough. Thus, constitutively expressing DNp73 clones (F10-DNp73), as well as vector controls, were generated. Cells were injected subcutaneously into C57BL/6 mice and palpable tumors were collected 2 or 3 weeks post injection. DNp73 protein levels in B16-F10 cells under normoxic culture conditions were compared with those from 2 or 3 weeks tumor extracts. As observed in Figure 8a,

cultured cells had very low DNp73 levels, but these were sensibly increased in tumors, indicating that DNp73 expression was favored and upregulated in the tumor environment by transcriptional independent mechanisms. Two weeks post injection B16-DNp73 tumors had higher vessel density, quantified by the number of CD31<sup>+</sup> structures (blue arrows), and higher mitotic index and VEGF-A expression than controls (Figures 8b–d). As microvessel density reflects the intercapillary distance determined by the net balance between the pro- and anti-angiogenic factors that stimulate vessel growth,<sup>45</sup> we can conclude that DNp73 expression enhances the angiogenic potential of B16-F10 cells. Therefore, our data demonstrate *TP73* requirement for endothelial differentiation,



**Figure 8** Constitutive DNp73 expression in the B16-F10 mouse melanoma cell line results in enhanced tumor vascularization. (a) DNp73 expression in B16-F10 cell extracts and tumor extracts were derived from a syngenic transplantation experiment. B16-F10 parental cells, or stable clones transfected with either DNp73 (B16-F10 DN) or vector control (B16-F10 C) were injected in C57BL/6 mice and tumors were collected after the indicated week number (2 and 3). (b) Histology and immunohistochemistry analysis of paraffin-embedded tissue sections of melanomas. Haematoxylin and eosin (HE) staining, as well as CD31 staining, revealed an increase in vessel density (blue arrows) in B16-F10 DN sections. Ki-67 proliferation antigen expression is also shown. Scale bar = 500  $\mu$ m (HE and CD31 staining); 100  $\mu$ m (Ki-67). (c) Quantification of vessel number (10 high-power fields per section; 5 sections per genotype) and Ki-67<sup>+</sup> cells (10 high-power fields; objective x40; 1000 cells/slide) from images in b. (d) VEGF-A expression in paraffin sections from B16-F10 and B16-F10 DN melanomas

angiogenesis and vasculogenesis under physiological conditions, and the role of DNp73 as a pro-angiogenic factor in EC and non-ECs.

## Discussion

p73 potential role in vascular biology has been addressed before, but not using developmental models. Here, we revealed *TP73* as a regulator of VEGF and TGF- $\beta$  signaling in vasculogenesis/angiogenesis under physiological conditions. Our *in vivo* data demonstrate that p73 is necessary for proper development of the retinal vasculature and to establish the appropriate pro-angiogenic signaling. The data presented here strongly supports the role of p73 as positive regulator of EC migration, vessel sprouting and tubulogenesis *in vivo*. However, our *in vivo* data indicated that p73 deficiency also affects non-ECs, hindering the guidance cues secreted by them, resulting altogether in reduced pro-angiogenic milieu.

To address p73 function we used mESC and iPSC models. The p73KO-EBs had smaller size and lower expression of endothelial markers; this could reflect a defect in cellular fate<sup>46</sup> but also, supports the idea that p73 function is required to effectively fulfill the endothelial differentiation process. In 3D EBs, p73 functional inhibition affected both the differentiation capacity and the ability to migrate and assemble into vascular networks. Similar altered vascular patterns have been described in EBs upon disruption of genes like *VEGF-A*,<sup>47,48</sup> its cellular receptor *VEGFR2*,<sup>49,50</sup> or the adhesion molecule *VE-cadherin*,<sup>51</sup> among others. Consistently, p73 deficiency resulted in a significant decreased expression of VEGF-A and, more importantly, a lower *VEGFR2/VEGFR1* ratio, which could be considered as a pro-angiogenic indicator. Moreover, in HUVEC, analysis of the morphogenic potential and migration capacity demonstrated that p73 function, DNp73 in particular, is necessary for the full angiogenic potential and the pro-angiogenic signaling through the VEGF pathway of these cells. These results are in agreement with the recently

proposed VEGF regulation by the p53 family members.<sup>52</sup> In this regard, p53 seems to have both a repressive and a required activating function on VEGF promoter activity.<sup>23</sup> Similarly, p73 role in VEGF-A regulation is complex and dependent upon the environmental conditions. Although our data concerning DNp73 function seem to be clear, TAp73 data appears controversial. On one hand, endogenous attenuation of TAp73 expression in HUVEC did not decrease tube formation or migration, but rather seem to have the opposite effect, hinting to a TAp73 anti-angiogenic effect. On the other hand, TAp73KD resulted in reduced VEGF-A mRNA levels, and TAp73 overexpression induced VEGF promoter activity in a luciferase reporter assay (data not shown), implying a TAp73 pro-angiogenic function. This scenario might reflect a context-dependent regulation of TAp73 and of the nature of its angiogenic role. Nevertheless, the molecular mechanism of this regulation remains elusive.

The TGF- $\beta$  pathway, inducer of EC fate in ESC, is another important regulator of angiogenic signaling and vascular homeostasis.<sup>40</sup> TGF- $\beta$  signaling operates as a rheostat that controls EC differentiation having both inhibitory and stimulating effects.<sup>53</sup> EC sprouting has been explained by a model in which TGF- $\beta$  synergizes with VEGF and Notch to drive migration, partly through induction of ID1, required for EC migration.<sup>54</sup> The link between the p53 family members and TGF- $\beta$  signaling in somatic cells has been previously established and it has been suggested, but never addressed, that the p53 homologs might interact with TGF- $\beta$  in development.<sup>24</sup> In this work we show that the absence of p73 results in a significant decrease in TGF- $\beta$ 1 and ID1 levels in all the models analyzed. Moreover, in HUVEC, specific DNp73KD has a strong and significant effect, downregulating EC migration and the TGF- $\beta$ 1/ALK1/ID1 signaling axis. These data demonstrate, for the first time, that DNp73 is a positive modulator of EC migration and angiogenic potential under physiological conditions through the regulation of the TGF- $\beta$  pathway. These DNp73 functions are in agreement with recent data indicating that DNp73 drives migration and invasion of non-metastatic melanoma cells facilitating the epithelial-mesenchymal transition phenotype of these cells.<sup>55</sup>

It has become increasingly clear that tumor vessel abnormalities contribute to create a microenvironment that facilitates tumor progression. Therefore, it is highly relevant to identify novel molecules involved in angiogenesis and to integrate them in the molecular networks that orchestrate vascular morphogenesis. The described DNp73 role is in accordance with the proposed TP73 function in oncogenesis, which seems to arise from the preferential expression of the DNp73 isoforms. Indeed, our data demonstrate that DNp73 protein levels are upregulated in the tumor environment by a transcriptional independent process. DNp73 upregulation is a frequent abnormality in solid cancers but, unlike p53, p73 is rarely mutated.<sup>56</sup> In this regard, DNp73 capacity to enhance the angiogenic potential of tumor cells will provide a positive advantage for tumor progression.

These results suggest that in the analyzed cellular milieu (standard normoxic cell culture conditions), DNp73, but not TAp73, is the positive regulator in EC migration and morphogenesis. Taken together, our data reveal, for the first time, that p73 is a positive regulator of EC migration, vessel

sprouting and tubulogenesis under physiological *in vivo* and *in vitro* conditions of angiogenesis, by modulating TGF- $\beta$  and VEGF signaling pathways. Moreover, the differential p73 isoform regulation, as well as the context-dependent p73 function, is necessary for the physiological control of the angiogenesis and vasculogenesis processes, and its deregulation might be an important event in tumor angiogenesis.

## Materials and Methods

**Mice husbandry and animal breeding.** Animal experiments were conducted in agreement with European (Council Directive 2010/63/UE) and Spanish regulations (RD 53/2013) on the protection of experimental animals with the appropriate institutional committee approval. Mice heterozygous for *Trp73* on a mixed background C57BL/6<sub>129</sub>/svJae<sup>14</sup> were backcrossed to C57BL/6, at least five times, to enrich for C57BL/6 background. Mice were genotyped as described before.<sup>14,57</sup>

**Retina dissection and flat-mount preparation.** Postnatal mice on day 5 and 7 were decapitated, and eyes were enucleated and fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS for 40 min. Retinas were dissected and washed with PBS for further processing. For whole-mount preparations, retinas were blocked in PBLEC buffer (0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1 mM MnCl<sub>2</sub>, 0.1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% TX-100 in PBS, pH 6.8) for 1 h at room temperature (RT), followed by incubation with 2  $\mu$ g/ml biotinylated isolectin B4 (Sigma, St. Louis, MO, USA) in PBLEC, at 4 °C overnight. Retinas were washed five times in PBS and incubated with 4  $\mu$ g/ml Streptavidin-Alexa488 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in 5% fetal bovine serum (FBS), 3% BSA, 0.1% TX-100 in PBS, for 2 h at RT. After the washes, retinas were blocked with 3% BSA for 2 h at RT and incubated with primary antibody anti GFAP 1 : 200 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), anti Collagen IV 1 : 100 (Serotec, Kidlington, Oxford, UK) or anti VEGFA 1 : 100 (Abcam, Cambridge, UK), in PBS, 3% BSA, 5% FBS, at 4 °C overnight. On the next morning, retinas were washed five times with PBS at RT (each washing for 30 min) and incubated thereafter with secondary antibody (donkey anti-rabbit Alexa594, Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA) in PBS, 3% BSA, 5% FBS. After PBS washing, retinas were mounted with Fluoromont G (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA). Representative images were analyzed independently using the AngioTool software (<https://ccrod.cancer.gov/confluence/display/ROB2/Home>). At least five animals from each individual genotype were used for the statistical analysis by Student's *t*-test.

**mESC and iPSCs culture, EB formation and endothelial 2D and 3D differentiation.** iPSC have been generated from early passage fibroblast from various *Trpp73* -/- E13.5 embryos or WT littermates (C57BL/6 background) by reprogramming using the piggyBac transposon system (kindly provided by Dr. Hämäläinen, Biomedicum Stem Cell Centre, Finland).<sup>58</sup> Eight independent WT-iPSC clones and five p73KO iPSC clones were generated and cultured as previously described (Martin-Lopez *et al.*, manuscript under preparation).

Murine ESC (E14TG2a cells, DDp73-E14TG2a and GFP<sup>+</sup>mESC) and iPSC were cultured on mouse fibroblast feeder cells in ESC medium (Dulbecco's modified Eagle's medium/Glutamax; Gibco, Carlsbad, CA, USA, 25 mM HEPES, 1.2 mM sodium pyruvate, 19 mM monothioglycerol; Sigma, 15% FBS, and 1000 units/ml leukemia inhibitory factor (LIF)).

**Generation of EBs and endothelial differentiation of mESC and iPSC.** The differentiation protocols were identical for ESC and for iPSC. For differentiation assays, EBs were formed by the hanging drop method as previously described.<sup>59</sup> Briefly, feeder cells were removed from either ESC or iPSC cultures by trypsinizing the cells and plating the obtained suspension on 1% gelatin-coated dishes in ESC medium for 30 min at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. The supernatant was collected and cells were counted. To form the EBs by hanging drops, a cell suspension of 60 000 cell/ml was prepared in EB medium (ESC medium without LIF) and 20  $\mu$ l drops were placed into a Petri dish lid. The drops were incubated at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, for 4 days. Then, EBs were flushed down from the lid with EBs medium and transferred to either gelatin-coated surfaces for 2D culture or into a collagen I matrix for 3D differentiation. For 2D, EBs were placed in eight-well glass culture slides (BD Falcon, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) in EB differentiation media (EB medium with 50 ng/ml VEGF<sub>165</sub>; Peprotech, Princeton, NJ, USA). For 3D differentiation, EBs were embedded into a collagen I suspension composed of



Ham's F12 medium (Promocell, Heidelberg, Germany), 6.26 mM NaOH, 20 mM HEPES, 0.117% NaHCO<sub>3</sub>, 1% glutamax I (Gibco) and 1.5 mg/ml collagen I (Advanced Biomatrix, San Diego, CA, USA) supplemented with 100 ng/ml VEGF<sub>165</sub>. In both protocols EB differentiation media was changed every 2 days. After 8–12 days for 2D differentiation, or 12–20 days for the 3D protocol, the differentiated EBs were processed and analyzed.

**Immunostaining of EBs.** EBs on glass slides (days 8–12) or EBs in collagen gels (days 12–20) were fixed with 3.7% PFA and processed for whole-mount immunohistochemical staining as previously described.<sup>59</sup> The samples were analyzed in a LSM 510 META confocal microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany). The following dilutions and primary antibodies were used: rat anti CD31 1 : 1000 (Becton Dickinson), goat anti VE-Cadherin 1 : 500 (R&D Biosystems, Minneapolis, MN, USA), rabbit anti GFP 1 : 100 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), mouse anti Tuj1 1 : 1000 (Covance, Princeton, NJ, USA), mouse anti AFP 1 : 1000 (Immunostep, Salamanca, Spain), secondary antibodies were: Alexa568 donkey anti-rat IgG, Alexa488 donkey anti-goat IgG (Molecular Probes), FITC anti-IgG rabbit (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) and horseradish peroxidase-conjugated streptavidin (Vector, Burlingame, CA, USA).

**Magnetic sorting to enrich for CD31 positive cells.** CD31 positive cells were isolated at day 12 from differentiating EBs using DYNAL beads (Invitrogen) coated with rat anti-mouse CD31 antibody (Becton Dickinson), as previously described.<sup>60</sup> CD31 positive cells were collected using a magnetic particle concentrator (DynaL MPC, Carlsbad, CA, USA, 120-20) following the manufacturer's instructions. The supernatants, which contain the CD31 negative cells, were used as control.

**HUVEC culture, transfection and siRNA silencing.** HUVEC were kindly provided from Biomar Microbial Technologies (Leon, Spain). HUVEC were cultured on gelatin-coated dishes in endothelial basal medium, EBM (Lonza, Basel, Switzerland), with full supplements (Lonza) and they were used from passage 2 to passage 8.

Transient transfections of pcDNA3-DDp73 or pcDNA3 expression vectors were performed on 60–80% confluent HUVEC monolayers using Lipofectamine2000 Transfection Reagent (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. For gene silencing experiments, 100 nM of the indicated RNA interference oligos (Supplementary Table I) were transfected with Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. Medium was changed 5–24 h later and maximal silencing was detected after 72 h of siRNA transfection.

**HUVEC treatment with TGF- $\beta$ .** HUVEC were cultured for 12 h on gelatin-coated well-plates (15 800 cells/cm<sup>2</sup>) in EBM with full supplements (10% FBS). Cells were serum starved in EBM with full supplements and 0.2% FBS for 24 h. Then, cultures were treated with 0.5–50 ng/ml human TGF- $\beta$  (Peprotech) and RNA was isolated after 24 h for qRT-PCR analysis.

**In vitro migration assay.** Wound healing or scratch assays were performed on HUVEC confluent monolayers either 48 h after plasmid transfection or 72 h after RNA interference. The monolayers were wounded with a micropipette tip making a straight scratch. After the scraping, cells were washed with PBS and fresh medium was added. Cell cultures were imaged at 0 and 10 h after the scratch, using a phase contrast microscope (Leica DMI 3000B, Wetzlar, Germany) and a digital camera (Leica DFC 310FX, Wetzlar, Germany). Wound width was measured using Image J software (NIH). Wound closure rate was calculated as follows: (wound width T0h–wound width T10h)  $\times$  100/wound width T10h.

**In vitro tube formation assay.** A 96-well plate was coated with 100  $\mu$ l Matrigel matrix (Becton Dickinson) per well, and incubated at 37 °C for 30 min to allow gelling. HUVEC were seeded at a density of 125 000 cell/ml in 200  $\mu$ l of EBM medium. After 6 h, images were acquired with a phase contrast microscope (Leica) and analyzed using WimTube software (Wimasis GmbH, Munich, Germany).

**RNA isolation and real-time RT-PCR analysis.** Total RNA from mice retinas or cultured cells was extracted with TRI reagent solution (Ambion, Austin, TX, USA) according to the manufacturer's instructions. Up to 2  $\mu$ g of total RNA was used to synthesize cDNA using High Capacity RNA-to-cDNA kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Gene expression was detected by qRT-PCR in a StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) using FastStart

Universal SYBR Green Master (ROX; Roche, Basel, Switzerland). All protocols were performed according to the manufacturer's instructions. Primers sequences and conditions were described before<sup>61,62</sup> and are indicated in the Supplementary Table II. mRNA expression levels were expressed as 2 <sup>$\Delta$ Ct</sup> and normalized to 18S.

**Western blot analysis.** Western blotting was performed as previously described<sup>43</sup> with the following primary antibodies: rabbit anti-pSmad1/5 (Ser463-/465) 1 : 1000 (Cell Signaling, Danvers, MA, USA), rabbit anti Smad1 1 : 1000 (Cell Signaling), mouse anti-pERK 1 : 1000 (Santa Cruz Biotechnology), rabbit anti-ERK1 : 10 000 (Santa Cruz Biotechnology), rabbit anti-VEGF-A 1 : 1000 (Abcam) mouse anti Dnp73 1 : 1000 (Imgenex, San Diego, CO, USA), and rabbit anti Nanog 1 : 1000 (Chemicon, Billerica, TX, USA) followed by the appropriate HRP-conjugated secondary antibodies (Pierce, Waltham, MA, USA). The enhanced chemiluminescence was detected with Super Signal West-Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce).

**Syngeneic transplantation model, histology and immunohistochemistry.** We used the syngeneic transplantation model of B16-F10 melanoma injected subcutaneously in C57BL/6 mice described before.<sup>44</sup> The B16-F10 murine melanoma cell line was a gift from Instituto Biomar SA, Leon, Spain (original source: American Type Culture Collection, Barcelona, Spain) and were maintained in RPMI 1640 (Sigma) supplemented with 10% FBS (Sigma), 2 mM L-Glutamine (Gibco) and 100 IU/ml penicillin and 100 IU/ml streptomycin (Sigma). Cells in log-phase growth were harvested by brief trypsinization and were injected subcutaneously in the dorsal neck region of C57BL/6 mice (Charles River Laboratories, Saint Germain Nuelles, France) in 0.10 ml PBS (4  $\times$  10<sup>5</sup> cells/0.2 ml PBS; two injection/mice; two mice per group). Mice were killed by cervical dislocation when the tumor size was at least 200 mm<sup>3</sup>, that is, 10–14 days post-inoculation. Some mice were killed 3 weeks after implantation of the cells.

Formalin-fixed tumor sections were stained with hematoxylin and eosin (Sigma) or immunostained with the following antibodies: anti-CD31 (DAKO, Glostrup, Denmark), anti-VEGF-A (Abcam) and Ki-67 (Merk, Darmstadt, Alemania). The mitotic index was determined by quantifying Ki-67<sup>+</sup> cells 10 high-power fields (objective x40; 1000 cells/slide).

**Samples and statistical analyses.** The analyses were performed with data from three independent experiments, with at least five mice from each genotype in the case of *in vivo* studies. Statistical analyses were performed using the Student's two-tailed *t*-test (\**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001). The mean  $\pm$  S.D. of each value is represented as indicated in each figure legend.

## Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

**Acknowledgements.** This work was supported by Grants SAF2012-36143 from Spanish Ministerio de Economía y Competitividad and cofinanced by FEDER funds (to MCM), and Grant LE015A10-2 from the Junta de Castilla y Leon (to MCM). RF-A was holder of a predoctoral scholarship from the Spanish Ministry of Science and Education (AP2007-02022). MM-L is a holder of a predoctoral scholarship from Junta de Castilla y Leon (PIRTU 2010). Work in the LCW lab was supported by Grants from the Swedish Cancer Foundation and Swedish Science Council. We thank the Instituto Biomar SA (Leon, Spain) for kindly supplying HUVEC and B16-F10 cells. We also thank the Pathology Department at the Complejo Hospitalario de Leon (Leon, Spain) for technical help and assistance in tumor analysis.

1. Heinke J, Patterson C, Moser M. Life is a pattern: vascular assembly within the embryo. *Front Biosci (Elite Ed)* 2012; **4**: 2269–2288.
2. Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995; **11**: 73–91.
3. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; **407**: 249–257.
4. Blagosklonny MV. Apoptosis, proliferation, differentiation: in search of the order. *Semin Cancer Biol* 2003; **13**: 97–105.
5. Salimath B, Marme D, Finkenzeller G. Expression of the vascular endothelial growth factor gene is inhibited by p73. *Oncogene* 2000; **19**: 3470–3476.
6. Vikhanskaya F, Bani MR, Borsotti P, Ghilardi C, Ceruti R, Ghisleni G et al. p73 Overexpression increases VEGF and reduces thrombospondin-1 production: implications for tumor angiogenesis. *Oncogene* 2001; **20**: 7293–7300.

7. Guan M, Peng HX, Yu B, Lu Y. p73 Overexpression and angiogenesis in human colorectal carcinoma. *Jpn J Clin Oncol* 2003; **33**: 215–220.
8. Marques-García F, Ferrandiz N, Fernandez-Alonso R, González-Cano L, Herreros-Villanueva M, Rosa-Garrido M et al. p73 plays a role in erythroid differentiation through GATA1 induction. *J Biol Chem* 2009; **284**: 21139–21156.
9. Jost CA, Marin MC, Kaelin WG Jr. p73 is a simian [correction of human] p53-related protein that can induce apoptosis. *Nature* 1997; **389**: 191–194.
10. Jung MS, Yun J, Chae HD, Kim JM, Kim SC, Choi TS et al. p53 and its homologues, p63 and p73, induce a replicative senescence through inactivation of NF-Y transcription factor. *Oncogene* 2001; **20**: 5818–5825.
11. Ishimoto O, Kawahara C, Enjo K, Obinata M, Nukiwa T, Ikawa S. Possible oncogenic potential of DeltaNp73: a newly identified isoform of human p73. *Cancer Res* 2002; **62**: 636–641.
12. Zaika AI, Slade N, Erster SH, Sansome C, Joseph TW, Pearl M et al. Np73, a dominant-negative inhibitor of wild-type p53 and TAp73, is up-regulated in human tumors. *J Exp Med* 2002; **196**: 765–780.
13. Buhlmann S, Putzer BM. DNp73 a matter of cancer: mechanisms and clinical implications. *Biochim Biophys Acta* 2008; **1785**: 207–216.
14. Yang A, Walker N, Bronson R, Kaghad M, Oosterwegel M, Bonnin J et al. p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. *Nature* 2000; **404**: 99–103.
15. Adamo L, Garcia-Cardena G. The vascular origin of hematopoietic cells. *Dev Biol* 2012; **362**: 1–10.
16. Iacovino M, Chong D, Szatmari I, Hartweck L, Rux D, Caprioli A et al. HoxA3 is an apical regulator of haemogenic endothelium. *Nat Cell Biol* 2011; **13**: 72–78.
17. Papetti M, Herman IM. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; **282**: C947–C970.
18. Ferrara N, Gerber HP, Lecouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; **9**: 669–676.
19. Bertolino P, Deckers M, Lebrin F, ten Dijke P. Transforming growth factor-beta signal transduction in angiogenesis and vascular disorders. *Chest* 2005; **128**: 585s–590s.
20. Pardali E, Goumans MJ, ten Dijke P. Signaling by members of the TGF-beta family in vascular morphogenesis and disease. *Trends Cell Biol* 2010; **20**: 556–567.
21. Goumans MJ, Liu Z, ten Dijke P. TGF-beta signaling in vascular biology and dysfunction. *Cell Res* 2009; **19**: 116–127.
22. Wang X, Abraham S, McKenzie JA, Jeffs N, Swire M, Tripathi VB et al. LRG1 promotes angiogenesis by modulating endothelial TGF-beta signalling. *Nature* 2013; **499**: 306–311.
23. Farhang Ghahremani M, Goossens S, Haigh JJ. The p53 family and VEGF regulation: "It's complicated". *Cell cycle* 2013; **12**: 1331–1332.
24. Cordenonsi M, Dupont S, Maretto S, Ininga A, Imbriano C, Piccolo S. Links between tumor suppressors: p53 is required for TGF-beta gene responses by cooperating with Smads. *Cell* 2003; **113**: 301–314.
25. Jakobsson L, Kreuger J, Claesson-Welsh L. Building blood vessels—stem cell models in vascular biology. *J Cell Biol* 2007; **177**: 751–755.
26. Yoshida Y, Yamanaka S. Recent stem cell advances: induced pluripotent stem cells for disease modeling and stem cell-based regeneration. *Circulation* 2010; **122**: 80–87.
27. Kohler EE, Wary KK, Li F, Chatterjee I, Urao N, Toth PT et al. Flk1+ and VE-cadherin-endothelial cells derived from iPSCs recapitulates vascular development during differentiation and display similar angiogenic potential as ESC-derived cells. *PLoS One* 2013; **8**: e85549.
28. Yurugi-Kobayashi T, Itoh H, Yamashita J, Yamahara K, Hirai H, Kobayashi T et al. Effective contribution of transplanted vascular progenitor cells derived from embryonic stem cells to adult neovascularization in proper differentiation stage. *Blood* 2003; **101**: 2675–2678.
29. Narazaki G, Uosaki H, Teranishi M, Okita K, Kim B, Matsuoka S et al. Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells. *Circulation* 2008; **118**: 498–506.
30. Taura D, Sone M, Homma K, Oyamada N, Takahashi K, Tamura N et al. Induction and isolation of vascular cells from human induced pluripotent stem cells—brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; **29**: 1100–1103.
31. Uemura A, Kusuhara S, Katsuta H, Nishikawa S. Angiogenesis in the mouse retina: a model system for experimental manipulation. *Exp Cell Res* 2006; **312**: 676–683.
32. Poulaki V. Angiogenesis assays. *Methods Mol Biol* 2011; **731**: 345–358.
33. Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, Abramsson A et al. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol* 2003; **161**: 1163–1177.
34. Fantin A, Vieira JM, Gestri G, Denti L, Schwarz Q, Prykhodzhiy S et al. Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction. *Blood* 2010; **116**: 829–840.
35. Figg W, Folkman J. *Angiogenesis: An Integrative Approach from Science to Medicine*. Springer: NY, USA, 2008.
36. Baffert F, Le T, Sennino B, Thurston G, Kuo CJ, Hu-Lowe D et al. Cellular changes in normal blood capillaries undergoing regression after inhibition of VEGF signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; **290**: H547–H559.
37. Allinson KR, Lee HS, Fruttiger M, McCarty JH, Arthur HM. Endothelial expression of TGFbeta type II receptor is required to maintain vascular integrity during postnatal development of the central nervous system. *PLoS One* 2012; **7**: e39336.
38. Irwin M, Marin MC, Phillips AC, Seelan RS, Smith DI, Liu W et al. Role for the p53 homologue p73 in E2F-1-induced apoptosis. *Nature* 2000; **407**: 645–648.
39. Koch S, Tugues S, Li X, Gualandi L, Claesson-Welsh L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem J* 2011; **437**: 169–183.
40. Puceat M. TGFbeta in the differentiation of embryonic stem cells. *Cardiovasc Res* 2007; **74**: 256–261.
41. Wong MK, Gottlieb AI. *In vitro* reendothelialization of a single-cell wound. Role of microfilament bundles in rapid lamellipodia-mediated wound closure. *Lab Invest* 1984; **51**: 75–81.
42. Abedi H, Zachary I. Vascular endothelial growth factor stimulates tyrosine phosphorylation and recruitment to new focal adhesions of focal adhesion kinase and paxillin in endothelial cells. *J Biol Chem* 1997; **272**: 15442–15451.
43. Fernandez-García B, Vaque JP, Herreros-Villanueva M, Marques-García F, Castrillo F, Fernandez-Medarde A et al. p73 cooperates with Ras in the activation of MAP kinase signaling cascade. *Cell Death Differ* 2007; **14**: 254–265.
44. Fidler IJ, Nicolson GL. Organ selectivity for implantation survival and growth of B16 melanoma variant tumor lines. *J Natl Cancer Inst* 1976; **57**: 1199–1202.
45. Hlatky L, Hahnfeldt P, Folkman J, Li Y, Berthiaume F, Toner M. Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us. *J Natl Cancer Inst* 2002; **94**: 883–893.
46. Park J, Cho CH, Parashurama N, Li Y, Berthiaume F, Toner M et al. Microfabrication-based modulation of embryonic stem cell differentiation. *Lab Chip* 2007; **7**: 1018–1028.
47. Bauth VL, Redick SD, Scalia A, Harmaty M, Carmeliet P, Rapoport R. Characterization of the vasculogenic block in the absence of vascular endothelial growth factor-A. *Blood* 2000; **95**: 1979–1987.
48. Ng YS, Ramsauer M, Loureiro RM, D'Amore PA. Identification of genes involved in VEGF-mediated vascular morphogenesis using embryonic stem cell-derived cystic embryoid bodies. *Lab Invest* 2004; **84**: 1209–1218.
49. Hidaka M, Stanford WL, Bernstein A. Conditional requirement for the Flk-1 receptor in the *in vitro* generation of early hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 7370–7375.
50. Jakobsson L, Kreuger J, Holmborn K, Lundin L, Eriksson I, Kjellén L et al. Heparan sulfate in trans potentiates VEGFR-mediated angiogenesis. *Dev Cell* 2006; **10**: 625–634.
51. Vittet D, Buchou T, Schweitzer A, Dejana E, Huber P. Targeted null-mutation in the vascular endothelial-cadherin gene impairs the organization of vascular-like structures in embryoid bodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 6273–6278.
52. Bid HK, Roberts RD, Cam M, Audino A, Kurmasheva RT, Lin J et al. DeltaNp63 promotes pediatric neuroblastoma and osteosarcoma by regulating tumor angiogenesis. *Cancer Res* 2014; **74**: 320–329.
53. Pardali E, Ten Dijke P. TGFbeta signaling and cardiovascular diseases. *Int J Biol Sci* 2012; **8**: 195–213.
54. Holderfield MT, Hughes CC. Crosstalk between vascular endothelial growth factor, notch, and transforming growth factor-beta in vascular morphogenesis. *Circ Res* 2008; **102**: 637–652.
55. Steder M, Alla V, Meier C, Spitschak A, Pahnke J, Fürst K et al. DNp73 exerts function in metastasis initiation by disconnecting the inhibitory role of EPLIN on IGF1R-AKT/STAT3 signaling. *Cancer Cell* 2013; **24**: 512–527.
56. Alexandrova EM, Moll UM. Role of p53 family members p73 and p63 in human hematological malignancies. *Leukemia & lymphoma* 2012; **53**: 2116–2129.
57. Flores ER, Sengupta S, Miller JB, Newman JJ, Bronson R, Crowley D et al. Tumor predisposition in mice mutant for p63 and p73: evidence for broader tumor suppressor functions for the p53 family. *Cancer Cell* 2005; **7**: 363–373.
58. Wolftjen K, Michael IP, Mohseni P, Desai R, Mileikovsky M, Hämäläinen R et al. piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* 2009; **458**: 766–770.
59. Li X, Claesson-Welsh L, Shibuya M. Chapter 13 VEGF receptor signal transduction. *Methods Enzymol* 2008; **443**: 261–284.
60. Magnusson P, Rolny C, Jakobsson L, Wikner C, Wu Y, Hicklin DJ et al. Deregulation of Flk-1/vascular endothelial growth factor receptor-2 in fibroblast growth factor receptor-1-deficient vascular stem cell development. *J Cell Sci* 2004; **117**: 1513–1523.
61. Tomasini R, Tsuchihara K, Wilhelm M, Fujitani M, Rufini A, Cheung CC et al. TAp73 knockout shows genomic instability with infertility and tumor suppressor functions. *Genes Dev* 2008; **22**: 2677–2691.
62. Kudryashova E, Wu J, Havton LA, Spencer MJ. Deficiency of the E3 ubiquitin ligase TRIM32 in mice leads to a myopathy with a neurogenic component. *Hum Mol Genet* 2009; **18**: 1353–1367.

Supplementary Information accompanies this paper on Cell Death and Differentiation website (<http://www.nature.com/cdd>)



# Hypoxia-inducible TAp73 supports tumorigenesis by regulating the angiogenic transcriptome

Iqbal Dulloo<sup>1</sup>, Beng Hooi Phang<sup>1</sup>, Rashidah Othman<sup>1</sup>, Soo Yong Tan<sup>2</sup>, Aadhitthya Vijayaraghavan<sup>3</sup>, Liang Kee Goh<sup>3</sup>, Marta Martin-Lopez<sup>4</sup>, Margarita M. Marques<sup>4</sup>, Chun Wei Li<sup>5</sup>, De Yun Wang<sup>5</sup>, Maria Carmen Marín<sup>4</sup>, Wa Xian<sup>6</sup>, Frank McKeon<sup>7</sup> and Kanaga Sabapathy<sup>1,3,8,9</sup>

**The functional significance of the overexpression of unmutated TAp73, a homologue of the tumour suppressor p53, in multiple human cancers is unclear, but raises the possibility of unidentified roles in promoting tumorigenesis. We show here that TAp73 is stabilized by hypoxia, a condition highly prevalent in tumours, through HIF-1 $\alpha$ -mediated repression of the ubiquitin ligase Siah1, which targets TAp73 for degradation. Consequently, TAp73-deficient tumours are less vascular and reduced in size, and conversely, TAp73 overexpression leads to increased vasculature. Moreover, we show that TAp73 is a critical regulator of the angiogenic transcriptome and is sufficient to directly activate the expression of several angiogenic genes. Finally, expression of TAp73 positively correlates with these angiogenic genes in several human tumours, and the angiogenic gene signature is sufficient to segregate the TAp73<sup>Hi</sup>- from TAp73<sup>Low</sup>-expressing tumours. These data demonstrate a pro-angiogenic role for TAp73 in supporting tumorigenesis, providing a rationale for its overexpression in cancers.**

p73, a homologue of the p53 tumour suppressor, exists as two main forms<sup>1–3</sup>: the full-length TAp73 that exhibits tumour-suppressor functions and is capable of inducing cell death<sup>4,5</sup>, and the DNp73 form that lacks the amino-terminal transactivation domain, and is oncogenic through its ability to inhibit both TAp73- and p53-dependent tumour suppressive functions<sup>6,7</sup>. TAp73 has been shown to be induced by a variety of stress signals and to lead to cell death<sup>8–10</sup>, and its absence predisposes mice to spontaneous tumour formation<sup>5</sup>, albeit at several orders of magnitude less than its tumour-suppressor homologue p53 (ref. 11). These data indicate a tumour suppressor role; however, p73 is rarely mutated in human cancers, but has instead been noted to be upregulated in many cancers<sup>2,12,13</sup>, including breast, gastric and ovarian, raising the possibility that it may also have pro-tumorigenic functions. In this respect, we have previously demonstrated that TAp73 can support cellular survival in combination with c-Jun, an activator-protein (AP)-1 factor that is often activated in cancers<sup>14</sup>. Furthermore, TAp73 has been shown to activate a variety of target genes that have growth-supporting functions, including the anti-apoptotic caspase-2S (ref. 15), cyclin

D1 (ref. 14) and glucose-6-phosphate dehydrogenase, to activate the pentose phosphate pathway<sup>16</sup>, with the last two genes involved in promoting cellular proliferation. Consistently, lack or reduction of p73 expression results in reduced cellular proliferation<sup>14,16,17</sup>, further supporting its role in this process and potentially in promoting tumorigenesis, and suggesting that contextual settings could dictate the function of TAp73 within the tumour. Here we have explored the tumour-supporting functions of TAp73, and whether there is a correlation between TAp73 expression and hypoxia, a condition that is prevalent in cancers and has been associated with chemo-resistance and cellular survival<sup>18,19</sup>. Our data support the notion that TAp73 is pro-tumorigenic, and induced by hypoxia, resulting in the regulation of the angiogenic transcriptome to support tumorigenesis.

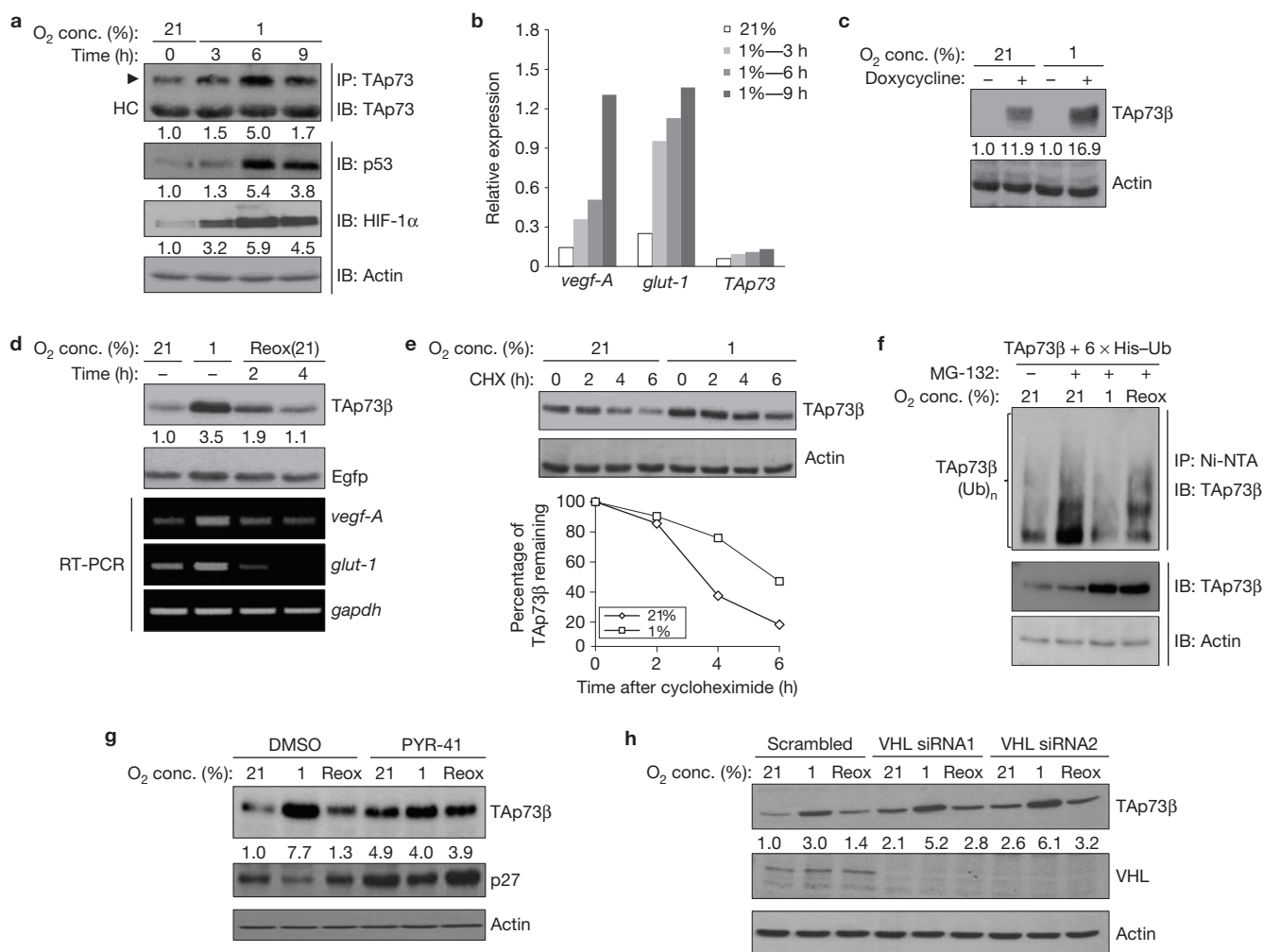
## RESULTS

### TAp73 is stabilized by hypoxia

Exposure of human colon cancer HCT116 cells to hypoxia (1% oxygen) resulted in a temporal increase in endogenous TAp73 levels, concomitant with p53 and the hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$

<sup>1</sup>Division of Cellular & Molecular Research, Humphrey Oei Institute of Cancer Research, National Cancer Centre, Singapore 169610, Singapore. <sup>2</sup>Department of Pathology, Singapore General Hospital, Singapore 169608, Singapore. <sup>3</sup>Cancer and Stem Cell Biology Program, Duke-NUS Graduate Medical School, Singapore 169857, Singapore. <sup>4</sup>Instituto de Biomedicina (IBIOMED), Campus Universitario, León 24071, Spain. <sup>5</sup>Department of Otolaryngology, Yong Loo Lin School of Medicine, National University of Singapore, Singapore 119228, Singapore. <sup>6</sup>Institute of Medical Biology, A-STAR, Singapore 138672, Singapore. <sup>7</sup>Genome Institute of Singapore, A-STAR, Singapore 138672, Singapore. <sup>8</sup>Department of Biochemistry, Yong Loo Lin School of Medicine, National University of Singapore, Singapore 119228, Singapore.

<sup>9</sup>Correspondence should be addressed to K.S. (e-mail: cmrksb@nccs.com.sg)

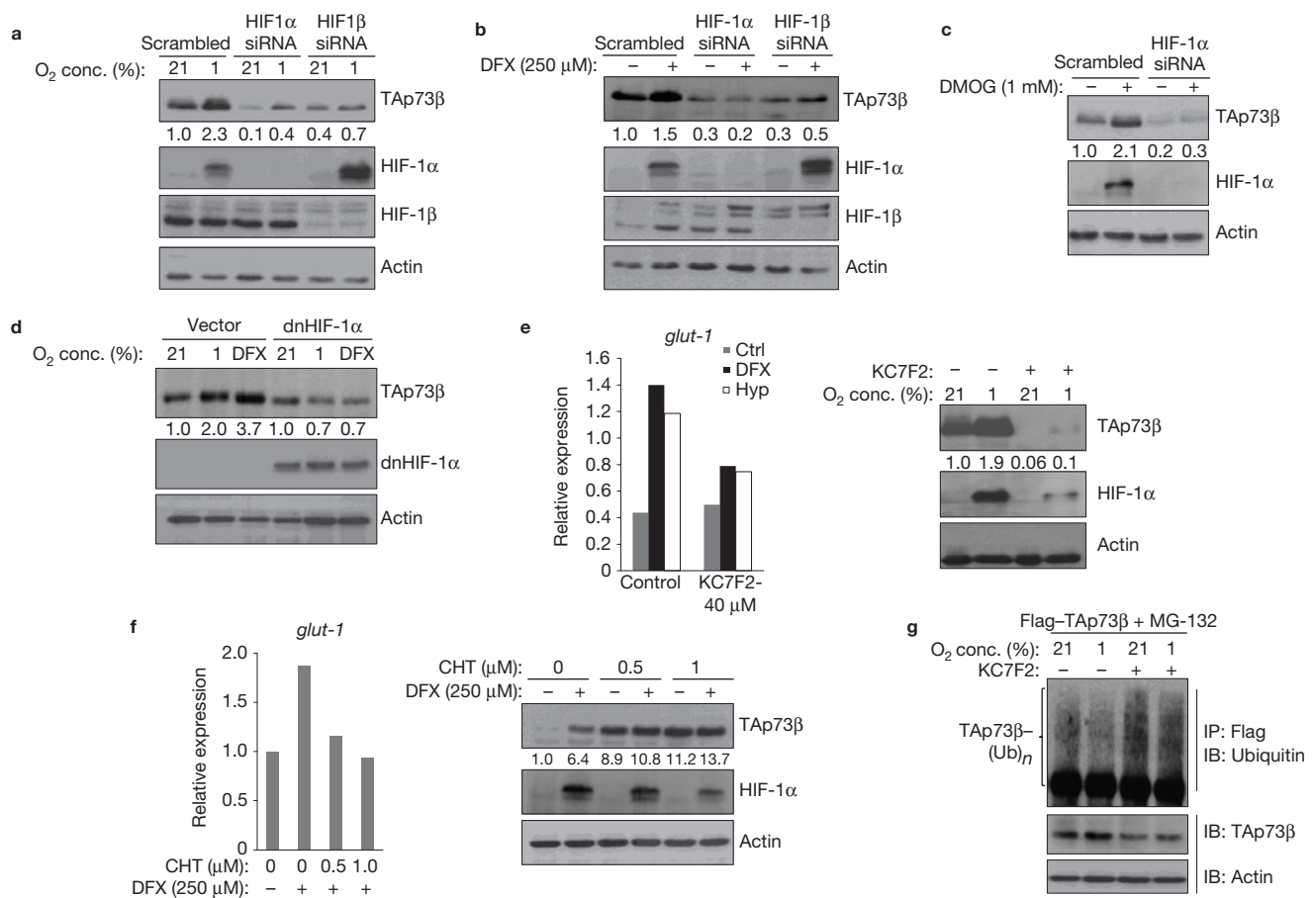


**Figure 1** Hypoxia induces the stabilization of TAp73. **(a,b)** HCT116 cells were incubated in 1% O<sub>2</sub> as indicated and endogenous TAp73 (arrowhead) was detected by immunoprecipitation (IP) and immunoblotting (IB) with anti-p73 antibody. p53 and HIF-1 $\alpha$  levels were detected by direct IB. Heavy chain (HC) and actin levels are shown in **a**. Numerical values below the gels indicate quantification of the bands relative to 21% O<sub>2</sub>. Endogenous *TAp73*, *glut-1* and *vegf-A* relative to *gapdh* were measured in the same experiment by real-time qPCR analysis (**b**). **(c)** Saos-2 TAp73 $\beta$ -inducible cells were induced with 2  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> of doxycycline for 24 h in 1% O<sub>2</sub> and TAp73 levels were determined by IB. **(d)** Levels of transfected TAp73 $\beta$  in H1299 cells were assessed by IB on exposure to 1% O<sub>2</sub> for 24 h, and on reoxygenation (Reox) at 21% O<sub>2</sub> for 2 h and 4 h (upper panel). Egfp levels are shown for equal transfection efficiency. *Vegf-A* and *glut-1* levels were determined by semi-quantitative RT-PCR (lower panel). **(e)** Half-life of TAp73 $\beta$  in H1299 cells was measured in the presence of 1% O<sub>2</sub> on addition of 50  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> cycloheximide (CHX)

for the indicated time periods (upper panel) and quantified (lower panel). **(f)** Effect of 1% O<sub>2</sub> and rapid reoxygenation at 21% O<sub>2</sub> for 1 h on TAp73 $\beta$  ubiquitylation in H1299 cells transfected with the indicated plasmids was assessed by immunoprecipitation using Ni-NTA agarose beads followed by immunodetection with anti-p73 antibody (upper blot). MG132 was added for a brief period of 1 h before collection. **(g)** Effects of inhibiting ubiquitylation using of 40  $\mu$ M PYR-41 on exposure to 1% O<sub>2</sub> and reoxygenation at 21% O<sub>2</sub>, on transfected TAp73 $\beta$  in H1299 cells. p27 levels were determined as a control for PYR-41 effectiveness. **(h)** Effects of 1% O<sub>2</sub> and reoxygenation with 21% O<sub>2</sub> on transfected TAp73 $\beta$  in Saos2 cells in which *vhl* expression was silenced (using 2 independent siRNAs) were assessed by IB. Data from one experiment are shown as averages of two biological replicates from two separate cellular extracts, which yielded similar results (for **b**). All data are representative of 3 independent experiments. Uncropped images of blots/gels are shown in Supplementary Fig. 6.

expression, a key regulator of the hypoxic response<sup>18–20</sup> (Fig. 1a), and hypoxic target genes such as *vegf-A* and *glut-1*, without any effect on *TAp73* messenger RNA (Fig. 1b). To determine whether this effect is at the protein level and to avoid p53-related effects, we used the p53 null human osteosarcoma Saos-2 cells that express either TAp73 $\alpha$  or TAp73 $\beta$  (the two main TAp73 isoforms<sup>1</sup>) in a doxycycline-inducible manner, in which their steady-state levels were also increased by hypoxia (Fig. 1c and Supplementary Fig. 1a). TAp73 $\alpha$  and TAp73 $\beta$  transiently transfected in p53 null human lung adenocarcinoma H1299 cells were similarly upregulated by

hypoxia (Fig. 1d and Supplementary Fig. 1a) and reduced on reoxygenation (Fig. 1d), highlighting the tight dependence of TAp73 expression on oxygen tension. Elevation of TAp73 $\beta$  following hypoxia correlated with increased half-life ( $T_{1/2}$ ) from  $\sim$ 3 h to  $>$ 5 h as measured by cycloheximide pulse-chase (Fig. 1e) and reduction in ubiquitylation, which was reversed following reoxygenation (Fig. 1f). Consistently, inhibition of ubiquitylation using the chemical inhibitor of the E1 ubiquitin-activating enzyme (PYR-41; ref. 21) elevated basal TAp73 $\beta$  levels, similar to its effect on p27, a labile protein degraded by ubiquitylation<sup>22</sup>, and compromised its reduction



**Figure 2** HIF-1 $\alpha$  is required for TAp73 stabilization in response to hypoxia. (**a–d**) Effects of 1% O<sub>2</sub> (**a**) or the hypoxia mimetics DFX (250  $\mu$ M; **b**) and DMOG (1 mM; **c**) on transfected TAp73 $\beta$  in H1299 cells in the presence of siRNA against *hif-1 $\alpha$*  or *hif-1 $\beta$*  (**a–c**), or on over-expression of dominant-negative HIF-1 $\alpha$  (dnHIF-1 $\alpha$ ; **d**), were analysed by IB. (**e**) Expression of HIF-1 $\alpha$  was inhibited using 40  $\mu$ M KC7F2, an HIF-1 $\alpha$  translational inhibitor, in H1299 cells and the effects of 1% O<sub>2</sub> or DFX on transfected TAp73 $\beta$  levels (right panel) and HIF-1 $\alpha$  transcriptional target *glut-1* (left panel) were assessed by IB and real-time qPCR, respectively. (**f**) Transcriptional activity of HIF-1 $\alpha$  was inhibited using CHT, an HIF-1 $\alpha$  transcriptional inhibitor, in H1299 cells, to determine the effect on treatment with

250  $\mu$ M DFX on transfected TAp73 $\beta$  levels (right panel) and *glut-1* (left panel), as described. (**g**) H1299 cells transfected with TAp73 $\beta$  and exposed to 1% O<sub>2</sub> in the presence of 40  $\mu$ M KC7F2, an HIF-1 $\alpha$  translational inhibitor, were used for ubiquitination assay after pulldown with anti-FLAG agarose beads followed by IB with anti-Ub antibody (upper blot). Ubiquitylated TAp73 $\beta$  is indicated as TAp73 $\beta$ -(Ub)<sub>n</sub>. Total TAp73 levels were detected by direct IB (lower blot). Data from one experiment are shown as averages of two biological replicates from two separate cellular extracts, which yielded similar results (for **e,f**). All data are representative of 3 independent experiments. Uncropped images of blots/gels are shown in Supplementary Fig. 6.

following reoxygenation (Fig. 1g). These data demonstrate that hypoxia stabilizes TAp73 through a mechanism that involves the ubiquitin degradation pathway. As the Von Hippel–Lindau (VHL) E3 ligase protein is an important regulator of the hypoxic response<sup>23</sup>, we examined its role by silencing its expression (Fig. 1h and Supplementary Fig. 1b) or by expression of the dominant-negative C111S mutant Nedd8-conjugating enzyme Ubc12 (dnUbc12), which inhibits the function of all cullin-based E3 ubiquitin ligases<sup>24</sup> (Supplementary Fig. 1c). Neither abrogated the oxygen-mediated regulation of TAp73 $\beta$ , alluding to the existence of other pathways in the regulation of TAp73 levels by hypoxia.

### HIF-1 $\alpha$ is required for TAp73 stabilization by hypoxia

We took a two-pronged approach to examine the role of the HIFs and to identify E3 ligases that would regulate TAp73 stability on hypoxia. Silencing of *hif-1 $\alpha$*  or its transcriptional co-factor

*hif-1 $\beta$*  (ref. 20) reduced TAp73 $\beta$  increase after hypoxia (Fig. 2a), or following treatment with deferoxamine (DFX; Fig. 2b) and dimethylxaloylglycine (DMOG; Fig. 2c)—prolyl hydroxylase inhibitors that mimic hypoxic conditions—suggesting that HIF-1 $\alpha$  and its transcriptional activity are required for TAp73 regulation by hypoxia. Expression of a dominant-negative HIF-1 $\alpha$  mutant also abrogated the increase of TAp73 $\beta$  expression after hypoxia and DFX treatment (Fig. 2d). Furthermore, addition of KC7F2, which selectively suppresses cellular HIF-1 $\alpha$  synthesis<sup>25</sup>, or chetomin (CHT), which blocks the interaction between HIF-1 $\alpha$  and p300/CREB, and hence affects HIF-1 $\alpha$ -mediated transcriptional activity<sup>26</sup>—though having nonspecific effects on baseline TAp73 levels—inhibited the upregulation of TAp73 $\beta$  following hypoxia or DFX treatment respectively, and the concomitant induction of *glut-1* (Fig. 2e,f), together confirming the requirement of HIF-1 $\alpha$  and its transactivation potential in regulating TAp73 abundance. Treatment with KC7F2 also

abrogated the decrease in TAp73 $\beta$  ubiquitylation following hypoxia (Fig. 2g), indicating that HIF-1 $\alpha$  might be involved in regulating TAp73 stabilization through the ubiquitin-degradation system.

### Siah1 is suppressed by HIF-1 $\alpha$ under hypoxic conditions to regulate TAp73 levels

Employing a candidate approach, we noted that exposure to hypoxia led to a decrease in expression of several E3 ligases, in parallel with an increase in *vegf-A* (Supplementary Fig. 2a). As increased TAp73 levels following hypoxia would require the suppression of an E3 ligase in an HIF-1 $\alpha$ -dependent manner, we performed a time-course analysis under hypoxic conditions and observed that increase in HIF-1 $\alpha$  level was correlated with the downregulation of the *siah1* E3 ligase (Fig. 3a), which was reversed after reoxygenation concomitant to the decrease in TAp73 and *glut-1* (Fig. 3b). Silencing *hif-1 $\alpha$*  and *hif-1 $\beta$*  expression or CHT treatment rescued hypoxia-mediated downregulation of *siah1* and inhibited *glut-1* expression (Fig. 3c and Supplementary Fig. 2b), without any significant effects on other candidate E3 ligases tested (Supplementary Fig. 2c,d). Co-expression of wild-type (WT) Siah1, but not the catalytic mutant (Siah1- $\Delta$ RING; ref. 27), with TAp73 $\beta$  led to a marked decrease in the steady-state levels of TAp73 $\beta$  (Fig. 3d), which was also confirmed by a decrease in its half-life ( $T_{1/2}$ ; from  $\sim$ 3 h to  $<$ 1.5 h; Fig. 3e). Conversely, silencing of *siah1* expression abrogated the oxygen-mediated regulation of TAp73 $\beta$  (Fig. 3f and Supplementary Fig. 2e), and rescued the reduction of TAp73 $\beta$  induced by *hif-1 $\alpha$*  silencing unlike other E3 ligases tested (Fig. 3g), thereby establishing the hierarchical order of HIF-1 $\alpha$ -mediated *siah1* suppression in regulating TAp73 levels. Finally, co-immunoprecipitation showed that Siah1 could bind to TAp73 $\alpha$  independently of its RING domain (Fig. 3h). These data demonstrate that following hypoxia, HIF-1 $\alpha$  promotes TAp73 stabilization by inhibiting the Siah1-mediated degradation of TAp73.

### TAp73 is required for efficient blood vessel formation in tumours

To understand the relevance of these findings, we evaluated whether TAp73 expression would affect tumour angiogenesis, a process that is regulated by hypoxia and required for tumour formation<sup>28,29</sup>. Two independent sets of TAp73 $^{-/-}$  and TAp73 $^{+/+}$  mouse embryonic fibroblasts<sup>15</sup> (MEFs) transformed with E1a/ras oncogenes were used to induce tumours subcutaneously in immune-deficient *scid* mice (Supplementary Fig. 3a), in which the absence of TAp73 led to a significant reduction in tumour volume (Fig. 4a). Immunohistochemical analysis indicated that although all tumours expressed relatively equivalent levels of HIF-1 $\alpha$ , the density and size of blood vessels detected by CD34 staining were markedly reduced in TAp73 $^{-/-}$  tumours (Fig. 4b). Evaluation of apoptosis and proliferation using TUNEL and Ki67 staining respectively revealed no significant differences (Fig. 4c). To confirm these data, we used WT and p73 $^{-/-}$  primary MEFs that lack all isoforms of p73 (Supplementary Fig. 3b) to generate induced pluripotent stem cells (iPSCs), which give rise to teratomas spontaneously on injection<sup>30</sup>, without the expression of any exogenous oncogenes. Whereas there was no difference in the proliferation rates of the iPSCs lacking p73 (Supplementary Fig. 3c), the absence of p73 led to reduced vasculature in the teratomas that were formed, as determined by anti-CD31 and

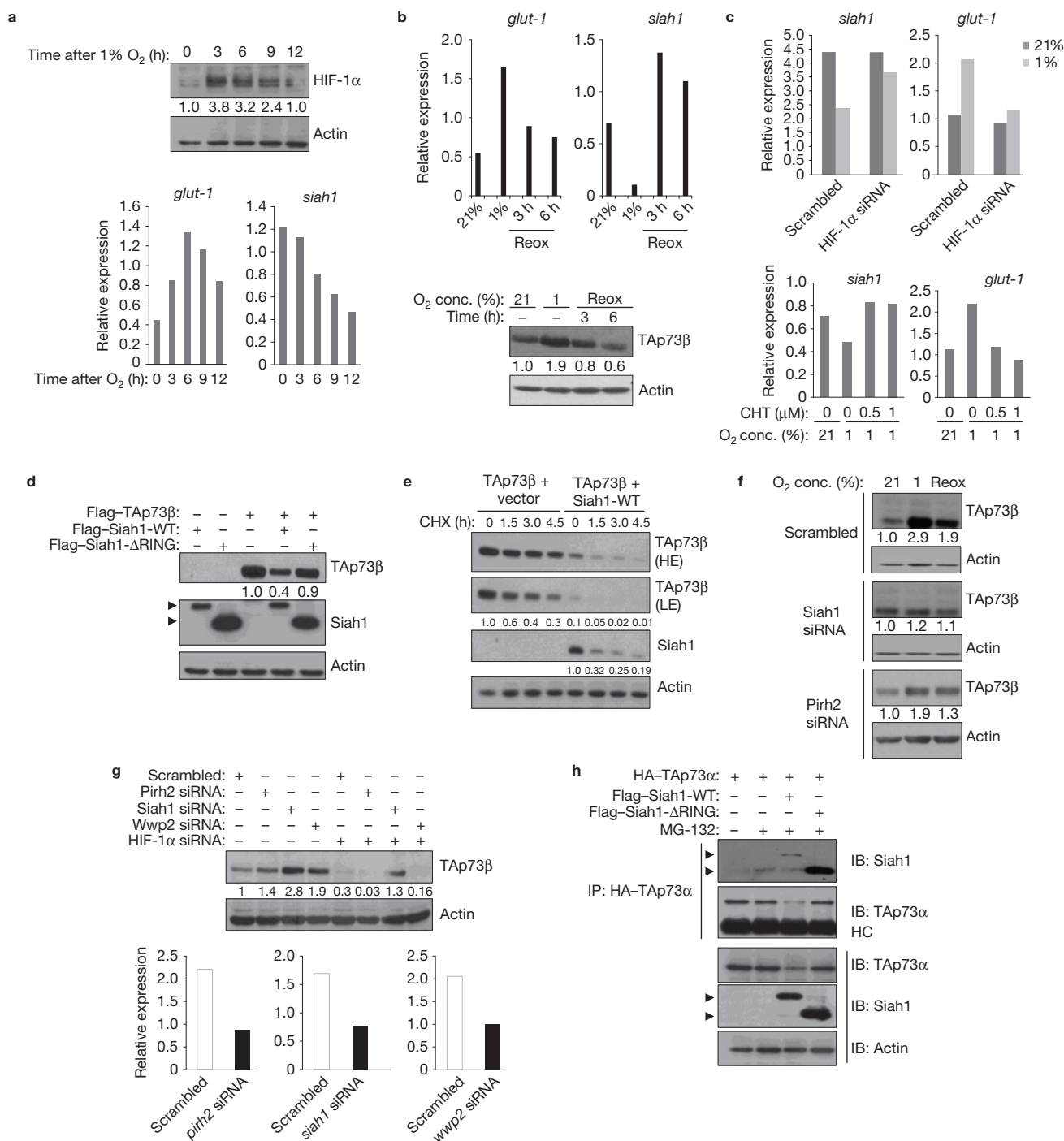
*Vegf-A* staining, especially in endothelial cells (Fig. 4d), corroborating the data obtained with the E1a/ras-transformed cell system. We further examined whether TAp73 expression was sufficient to induce blood vessel formation in tumours, by using the doxycycline-inducible TAp73 $\beta$ -H1299 (Fig. 4e, left panel), or TAp73 $\beta$ -Saos-2 (Supplementary Fig. 3e) cell lines to form tumours in *scid* mice. Tumour staining revealed that following TAp73 $\beta$  expression, there were more CD34 $^{+}$  blood vessels compared with the untreated group (Fig. 4e, right panel), without any differences in apoptosis or proliferation (Supplementary Fig. 3d). These results support the notion that TAp73 expression is required for efficient blood vessel formation in tumours.

### TAp73 regulates angiogenic gene expression

To evaluate the mechanisms underlying the angiogenic defects observed in TAp73-deficient tumours, we interrogated the gene expression profiles of E1a/Ras-transformed TAp73 $^{-/-}$  and TAp73 $^{+/+}$  MEFs exposed to equal hypoxic conditions. We noted differential regulation of several physiological processes by TAp73, including cell death and survival and tissue development (Supplementary Table 1). To gain insights specifically into angiogenesis, we analysed a panel of 84 angiogenic genes selected from the Mouse Angiogenesis & Angiogenic Growth Factors RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array (Qiagen gene lists), 49 of which were identified to be differentially expressed in TAp73 $^{-/-}$  and TAp73 $^{+/+}$  cells (Fig. 5a and Supplementary Table 2), and formed a molecular network associated with cardiovascular system development and function (Supplementary Table 3). Many of these genes are known positive regulators of angiogenesis, including *eng*, *mdk*, *pdgf-B* and so on<sup>31-33</sup>, and were also noted to be upregulated in a TAp73-dependent manner in an earlier profiling study<sup>34</sup>. These were grouped as important for blood vessel development by gene ontology clustering (Supplementary Table 4). We therefore selected this group of 28 positive regulators (Supplementary Table 5) for further validation. As for the classical p73 target genes *p21* and *Mdm2*, expression of these angiogenic genes was significantly dependent on TAp73 expression, being downregulated in TAp73 $^{-/-}$  MEFs (Fig. 5b and Supplementary Fig. 4a) and on TAp73 silencing (Fig. 5c and Supplementary Fig. 4b). Hypoxic conditions were also unable to elicit a robust increase in the expression of several of these genes, including *vegf-A*, *nrp1*, *flt1*, *srf*, *aggf1* and *egr1* in the absence of TAp73, despite the induction of functional HIF-1 $\alpha$  as observed by the upregulation of *glut-1* (Fig. 5d). Furthermore, silencing *siah1* led to an increase in the expression of angiogenic genes in TAp73 $^{+/+}$  cells but not in TAp73 $^{-/-}$  cells (Supplementary Fig. 4c), confirming its role upstream of TAp73. Conversely, inducible expression of TAp73 $\beta$  led to the upregulation of many of these genes within 6 h, similar to *mdm2* (Fig. 5e and Supplementary Fig. 4d). Similar results were obtained with TAp73 $\alpha$ , but not with p53, indicating specificity of this process (Supplementary Fig. 4e). These data demonstrate that TAp73 is required for efficient expression of several pro-angiogenic genes in both basal and hypoxia-induced states in mouse and human cells.

### Angiogenic genes are regulated by TAp73 independent of HIF-1 $\alpha$ -binding site and its apoptotic potential

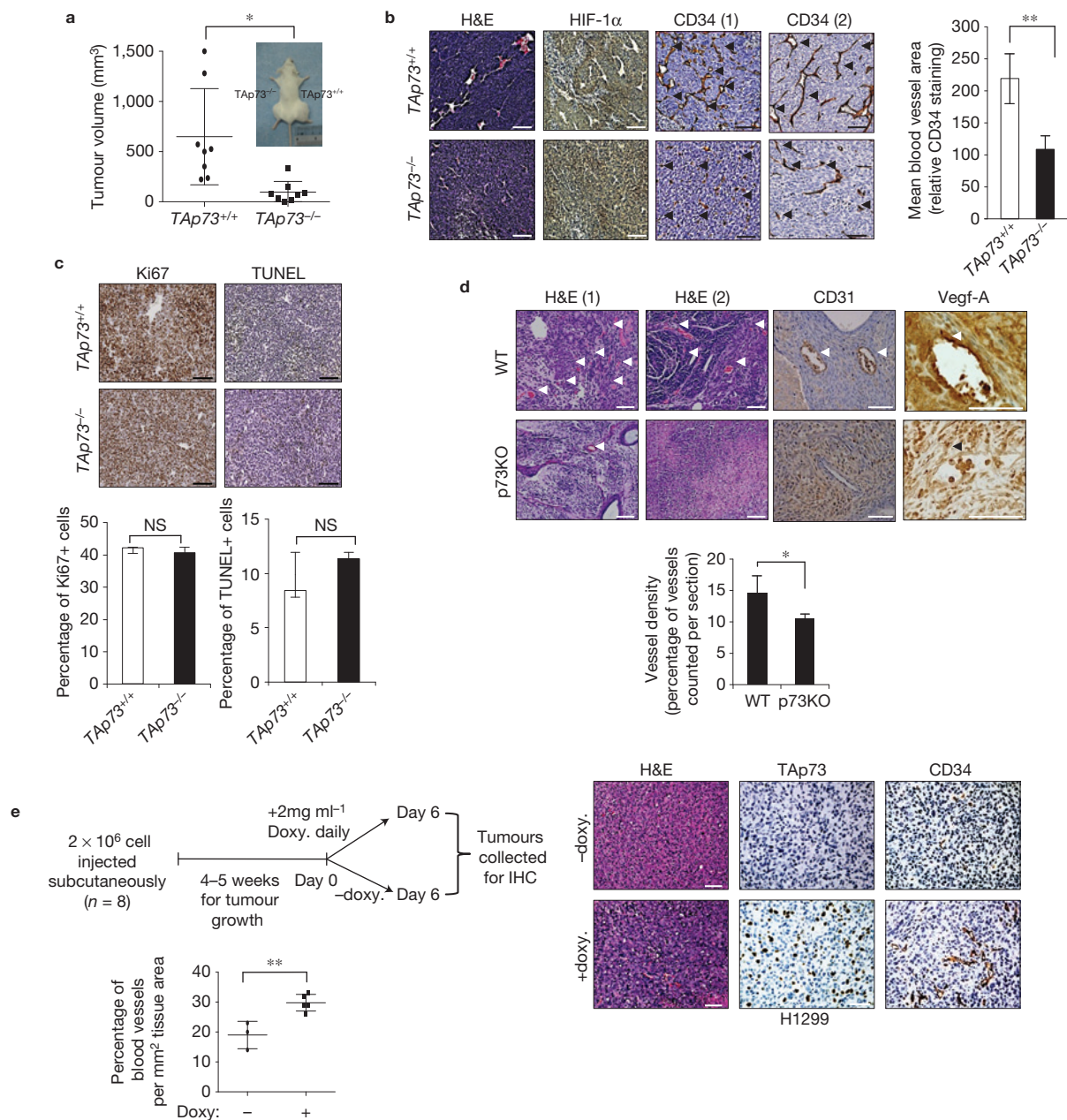
Analysis of global genomic sites bound by TAp73 in human cancer cells by chromatin immunoprecipitation (ChIP)-sequence analysis<sup>35</sup>



**Figure 3** HIF-1 $\alpha$  suppresses *siah1* to regulate TAp73 on hypoxia. (a) Evaluation of the effect of 1% O<sub>2</sub> on expression of HIF-1 $\alpha$  by IB (upper panel) and *siah1* and *glut-1* by real-time qPCR (lower panels) in H1299 cells, in a temporal manner. (b) *siah1* and *glut-1* were determined by real-time qPCR analysis (upper panels) on hypoxia and reoxygenation, in H1299 cells transfected with TAp73, detected by IB (lower panel). (c) Expression of *siah1* and *glut-1* in H1299 cells exposed to 1% O<sub>2</sub> on siRNA-mediated silencing of *hif-1 $\alpha$*  (upper panels) or CHT treatment (lower panels) was determined by real-time qPCR analysis. (d,e) Effects of co-expression of either WT or  $\Delta$ RING mutant Siah1 on TAp73 levels in H1299 cells (d), or on the half-life of TAp73 $\beta$  as determined by cycloheximide (CHX) pulse-chase experiment (e), was assessed by IB (H.E, high exposure; L.E, low exposure). Arrowheads indicate Siah1 proteins. (f,g) Effect of siRNA-mediated *siah1* or *pirh2* silencing alone (f) or after

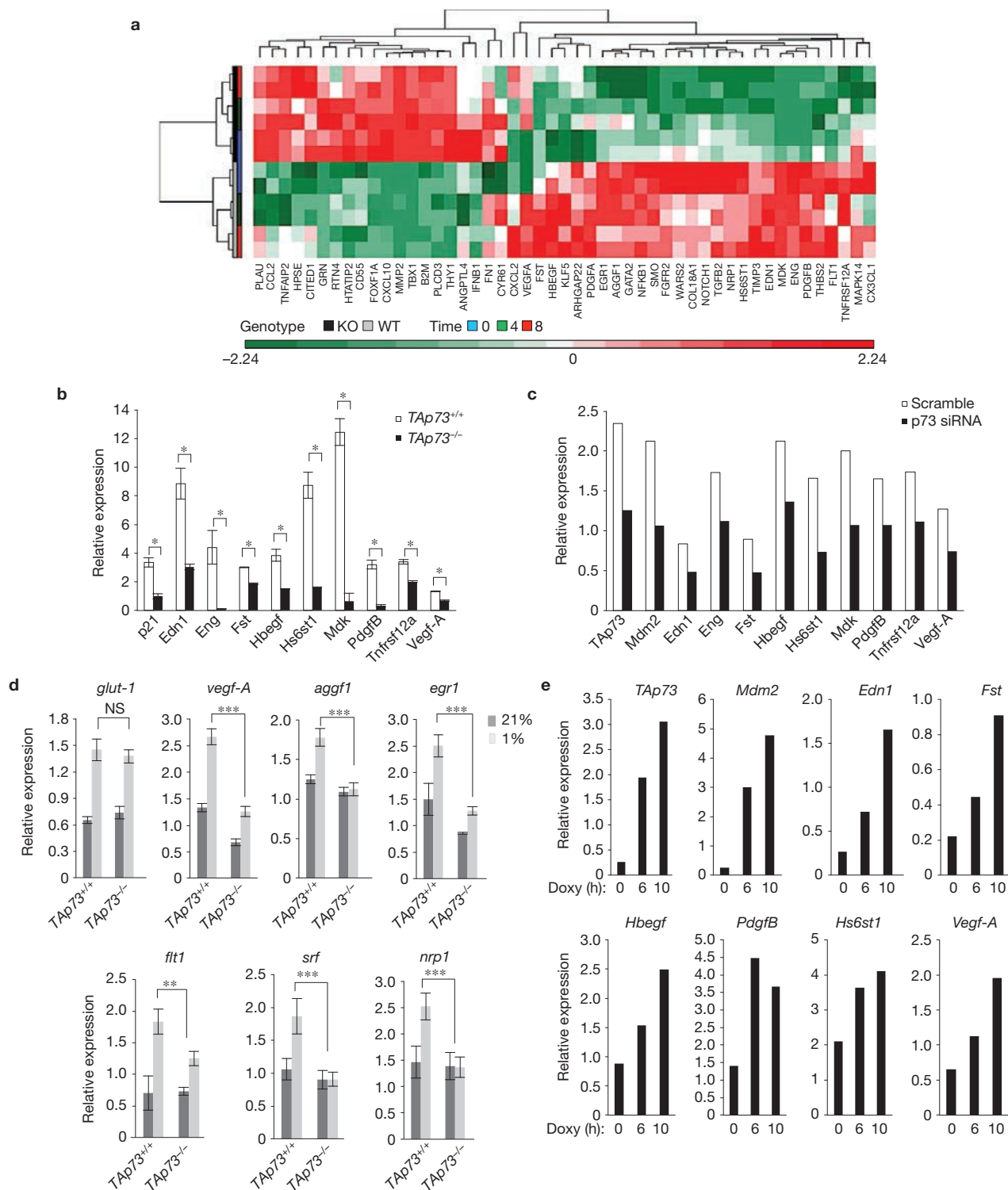
co-silencing with *hif-1 $\alpha$*  (g) on transfected TAp73 levels in H1299 cells exposed to 1% O<sub>2</sub> and reoxygenated at 21% O<sub>2</sub> (f) was determined by IB. Efficiency of knockdown for indicated genes is shown by real-time qPCR in the lower panel (g). (h) Co-immunoprecipitation of transfected HA-TAp73 $\alpha$  with either WT or  $\Delta$ RING mutant Siah1 in H1299 treated with 20  $\mu$ M MG-132 was performed with anti-HA agarose beads followed by IB with the indicated antibodies (upper blot). Total TAp73 $\alpha$  and Siah1 levels were detected by IB (lower blot). Arrowheads indicate Siah1 proteins. MG132 was added briefly before collection to allow the retention of polyubiquitylated species. Data from one experiment are shown as averages of two biological replicates from two separate cellular extracts, which yielded similar results (for a-c,g). All data are representative of 3 independent experiments. Uncropped images of blots/gels are shown in Supplementary Fig. 6.





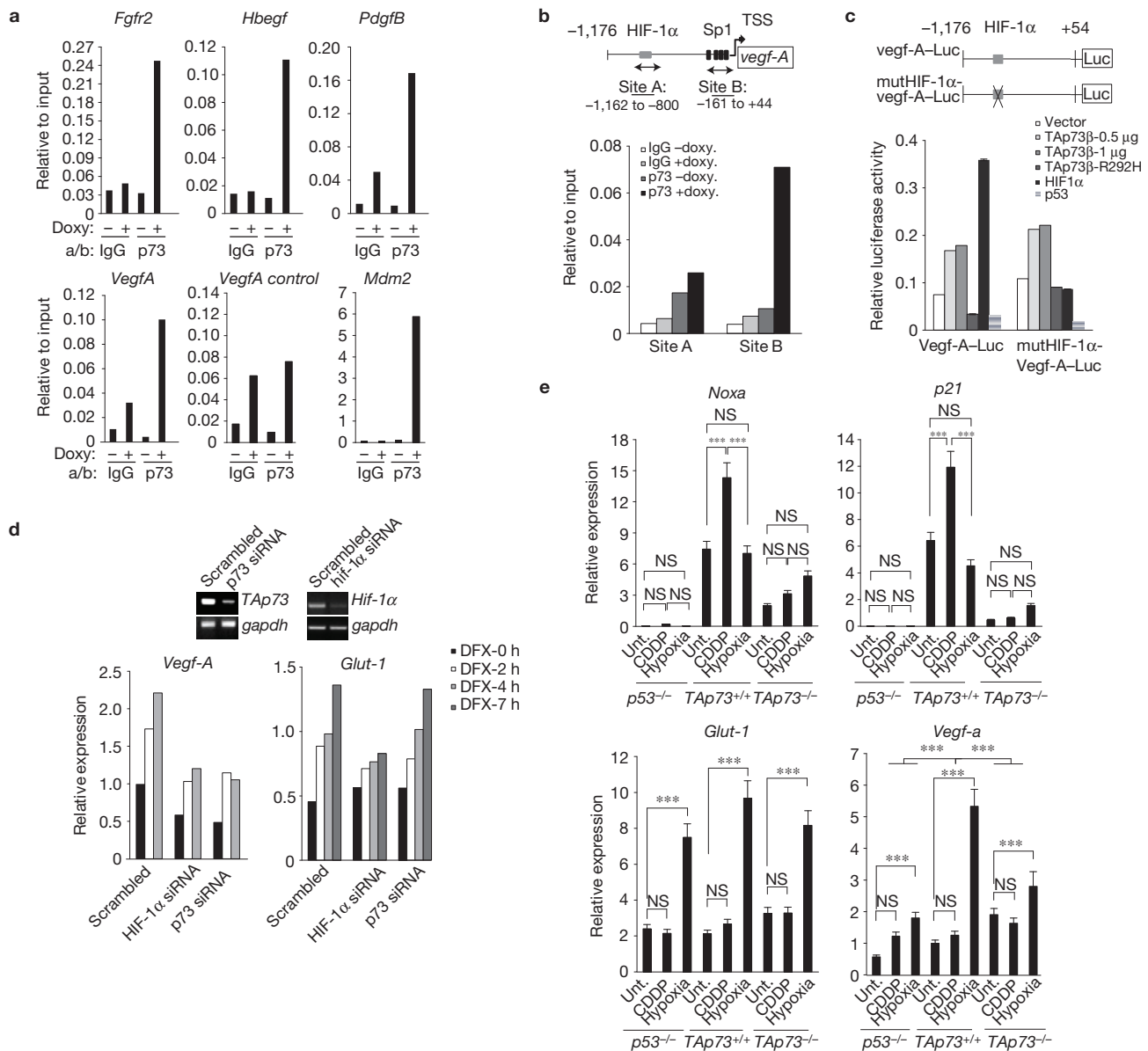
**Figure 4** p73 is required for efficient vasculature in tumours. **(a,b)** SCID mice were injected subcutaneously on either flank with E1a/Ras-transformed TAp73<sup>+/+</sup> and TAp73<sup>-/-</sup> cells and tumours were analysed to evaluate the effect of TAp73 absence on blood vessel formation and tumour growth. The graph shows the size of tumours derived from each mouse (each dot represents a mouse;  $n=8$  mice,  $*P < 0.05$  by Student's *t*-test), with a representative mouse shown in the inset in **a**. Tumours were stained for H&E, HIF-1 $\alpha$  and CD34 (**b**, left panel). CD34(2) represents a higher magnification of CD34(1). Scale bars, 100  $\mu$ m for all except CD34(2), where it is 50  $\mu$ m. Mean blood vessel area based on CD34<sup>+</sup> staining was quantified using Angiosight ( $n=4$  mice,  $**P < 0.01$  by Student's *t*-test; **b**, right panel). Arrowheads indicate blood vessels. Data are presented as mean  $\pm$  s.d. **(c)** Tumours generated by injection with TAp73<sup>+/+</sup> and TAp73<sup>-/-</sup> cells into SCID mice were stained for TUNEL (to determine cell death) and Ki67 (to determine cellular proliferation), and representative images are shown. Scale bars, 100  $\mu$ m. Lower panels show quantification using Angiosight ( $n=4$  mice,  $P=NS$ : not significant by Student's *t*-test). Data are presented as means  $\pm$  s.d. **(d)** Tumours from WT or p73-deficient

(p73KO) iPSCs injected subcutaneously into SCID mice were similarly stained for H&E (on 2 independent samples), CD31 (for blood vessels) and Vegf-A. Arrowheads indicate positions of CD31<sup>+</sup> blood vessels. Scale bars, 100  $\mu$ m. Vessel density was quantified by counting CD31<sup>+</sup> vessel structures under high-power fields (10 high-power fields per section; 5 sections per genotype). At least three different iPSC clones for each genotype ( $n=3$  mice for WT and  $n=4$  mice for p73KO, generated from different animals; 2 injections per mouse; 2 mice per clone;  $*P < 0.05$  by Student's *t*-test). Data are presented as means  $\pm$  s.d. **(e)** Schematic of subcutaneous injection of H1299-TAp73 $\beta$ -inducible cells in SCID mice (upper left panel). Once tumours grew to a size of about 100 mm<sup>3</sup>, mice were then divided into two groups: one control group ( $n=3$  mice) and one group where mice were gavaged with 2 mg ml<sup>-1</sup> of doxycycline daily for 6 days ( $n=5$  mice) before tumours were collected for immunohistochemical (IHC) analysis. Tumours were stained for H&E, TAp73 and CD34 (right panels). Scale bars, 100  $\mu$ m. Blood vessels staining with CD34<sup>+</sup> were quantified using SlidePath Tissue IA ( $**P < 0.01$  by Student's *t*-test; lower left panel). Data are presented as means  $\pm$  s.d.



**Figure 5** The angiogenic transcriptome is regulated by TAp73. **(a)** Heat map showing 49 angiogenic genes differentially expressed between E1a/Ras-transformed TAp73<sup>+/+</sup> and TAp73<sup>-/-</sup> MEFs on exposure to 1% O<sub>2</sub> for 4h/8h by microarray analysis. Red and green represent over- and under-expressed genes, respectively, as per the scale on the x axis. The y axis represents treatment and genotypic information as indicated below the figure. **(b–d)** Real-time qPCR analysis was carried out using TAp73<sup>+/+</sup> and TAp73<sup>-/-</sup> MEFs at steady-state ( $n=4$  biological replicates from four separate cellular extracts; **b**) or on exposure to 1% O<sub>2</sub> for 4h ( $n=4$  biological replicates from four

separate cellular extracts; **d**), and on siRNA-mediated p73 silencing in H1299 cells **(c)**. (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  by unpaired Mann–Whitney test in **b** and two-way ANOVA in **d**). Data are presented as mean  $\pm$  s.d. for **b,d**. **(e)** Effect of inducible TAp73 expression on the indicated pro-angiogenic genes was assessed using Saos-2-TAp73 $\beta$  inducible cells induced for 6 h and 10h beforehand by real-time qPCR. Data from one experiment are shown as averages of two biological replicates from two separate cellular extracts, which yielded similar results (for **c,e**). All data are representative of 3 independent experiments.



**Figure 6** TAp73 regulates angiogenic genes independent of HIF-1 $\alpha$  and its apoptotic potential. **(a)** ChIP analyses with anti-p73 and anti-IgG antibodies on regulatory genomic fragments of pro-angiogenic genes were carried out using Saos-2-TAp73 $\beta$  inducible cells after 8 h induction. Real-time qPCR was used to quantify the fragments pulled down with anti-p73 and IgG antibodies, relative to input. *Vegf-A* genomic control region refers to the site A as indicated in **b**. **(b)** Schematic illustrating regions on endogenous *vegf-A* promoter with sites A/B denoting the location of ChIP primers used to locate TAp73 and HIF-1 $\alpha$  binding sites (upper panel). Saos-2-TAp73 $\beta$  inducible cells were induced and used for ChIP analyses, before quantification of pulled-down fragments corresponding to sites A and B by real-time qPCR (lower panel). **(c)** Schematic illustrating *vegf-A* promoter linked to the *luciferase* gene (*vegf-A-luc*) containing either WT or mutated-HIF-1 $\alpha$ -binding site (mutHIF-1 $\alpha$ ; upper

panel). The graph shows relative luciferase activity of indicated promoters in the presence of TAp73 $\beta$ , TAp73 $\beta$ -R292H, HIF-1 $\alpha$  and p53 (lower panel). **(d)** Effect of inhibiting *p73* or *Hif-1 $\alpha$*  expression by siRNA-mediated silencing on expression of *vegf-A* and *glut-1* on treatment with 250  $\mu$ M DFX for the indicated time points, was analysed by real-time qPCR. Insets show semi-quantitative PCR of the knockdown efficiencies. **(e)** Cisplatin (CDDP)- or hypoxia-induced target gene expression was analysed by real-time qPCR in MEFs of the indicated genotypes. Unt.: untreated ( $n=3$  biological replicates from three separate cellular extracts; \*\*\* $P < 0.001$ , NS: not significant by 2-way ANOVA). Data are presented as mean  $\pm$  s.d. Data from one experiment is shown as averages of two biological replicates from two separate cellular extracts, which yielded similar results (for **a-d**). All data are representative of 3 independent experiments.

revealed that TAp73 was bound to the regulatory elements of several of the angiogenic genes identified in our study (Supplementary Fig. 4f). Our ChIP analysis indeed showed that TAp73 $\beta$  induction led to its enhanced binding to the genomic regulatory fragments of *fgfr2*, *hbegf*, *pdgfb* and *vegf-A* (Fig. 6a), similar to the canonical *Mdm2* promoter.

*In silico* analysis of the genomic fragments bound by TAp73 did not yield any potential HIF-1 $\alpha$  response elements, indicating that TAp73 might positively regulate these genes independent of HIF-1 $\alpha$ . ChIP analysis indicated that TAp73 $\beta$  was bound to a cluster of Sp1 sites (indicated as site B) distinct from the known HIF-1 $\alpha$  response

element of *vegf-A* promoter (indicated as site A; Fig. 6b), as has also been shown previously<sup>36</sup>. To confirm this observation, we used the luciferase reporter gene driven by the *vegf-A* promoter and found that expression of TAp73 $\beta$ , but not the DNA-binding domain mutant of TAp73 $\beta$  (TAp73 $\beta$ -R292H) or the tumour-suppressive p53 that is known to suppress *vegf-A* expression<sup>37</sup>, led to an enhancement of *vegf-A* promoter activity, similar to HIF-1 $\alpha$  (Fig. 6c). Moreover, mutation of the HIF-1 $\alpha$ -binding site on the *vegf-A* promoter did not affect TAp73 $\beta$ -mediated transactivation, although it completely eliminated HIF-1 $\alpha$ -mediated activation (Fig. 6c), indicating independence of TAp73-mediated *vegf-A* expression of HIF-1 $\alpha$ . We further evaluated the role of TAp73 by silencing its expression, which compromised *vegf-A* expression both at the basal state as well as following treatment with DFX, to a similar extent as that seen with *hif-1 $\alpha$*  silencing (Fig. 6d). In contrast, TAp73 silencing did not affect *glut-1*, the HIF-1 $\alpha$ -regulated hypoxia inducible gene<sup>38</sup>, highlighting specificity of TAp73-mediated angiogenic gene activation.

Given the established role of TAp73 in inducing apoptosis under DNA-damaging conditions<sup>4</sup>, we explored the functional dichotomy in its ability to regulate the expression of stress-induced p53-target genes versus angiogenic genes on hypoxia. Treatment with the DNA-damaging agent cisplatin (CDDP) led to an expected increase in *p21* and *noxa* in a p53- and p73-dependent manner, but not to an increase of *glut-1* or *vegf-A* in cells of all genotypes (Fig. 6e). On the contrary, hypoxia induced the expression of *vegf-A*, but not *p21* and *noxa*, in a p73-dependent manner. These data indicate that TAp73 is capable of regulating the appropriate transcriptional program depending on the inducing context.

### Expression HIF-1 $\alpha$ , TAp73 and Vegf-A are positively correlated in human clinical samples

To examine the clinical relevance of these findings, we analysed colonic adenocarcinomas and infiltrating ductal carcinomas of the breast, which have been shown to overexpress TAp73 (ref. 12), for TAp73 and VEGF-A expression by immunohistochemistry, the latter chosen as an initial surrogate marker of angiogenesis. Specificity of the TAp73 antibody was confirmed by immunohistochemistry using an inhibitory peptide against the whole TA domain of p73 (Fig. 7a,b and Supplementary Fig. 5a). Categorization based on intensity of immunostaining revealed that whereas almost all cancer tissues expressed TAp73, a large proportion (>50%) expressed medium to intense staining (grades 2 and 3 together), which significantly correlated with the intensity of VEGF-A expression ( $P < 0.001$  for both colonic adenocarcinomas and breast carcinomas; Fig. 7a,b). The positive correlation between TAp73 and VEGF-A intensity varied between mild to moderate (Kendall's tau-b value was estimated at 0.223 and 0.356 for colonic adenocarcinomas and breast carcinomas, respectively). Carbonic anhydrase IX (CAIX), a marker for tumour hypoxia<sup>39</sup>, as well as HIF-1 $\alpha$  staining confirmed that these human tumour tissues were hypoxic and their expression was positively correlated with TAp73 (Kendall's tau-b value was estimated at 0.167 and 0.225 for colonic adenocarcinomas and breast carcinomas, respectively). Although there were very few tumours with grade 3 staining for CAIX and HIF-1 $\alpha$ , the grade 2 and 3 TAp73 tumours contained significantly more grade 2/3 stains for CAIX and HIF-1 $\alpha$  ( $P = 0.021$  and  $P = 0.0228$  for colonic adenocarcinomas and breast carcinomas, respectively;

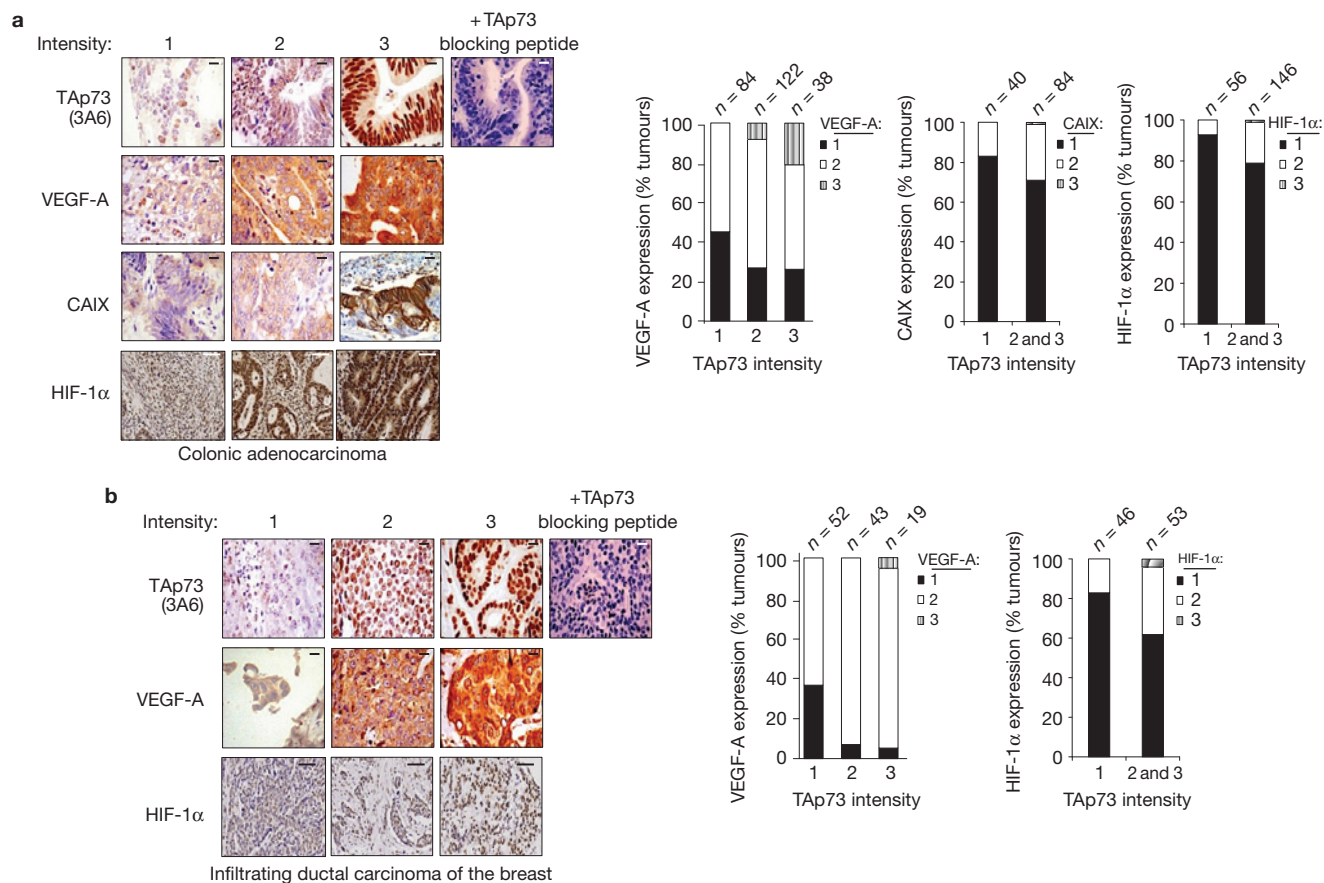
Fig. 7a,b). Further analysis of nasal polyps that express TAp73 (ref. 40) and harbour hypoxic regions<sup>41</sup> also confirmed that TAp73 was specifically co-expressed with VEGF-A in the ciliated epithelial layers and in hyperplastic glands, to varying extents (Supplementary Fig. 5b), together demonstrating that TAp73 expression does indeed correlate with VEGF-A expression in human tissues.

To corroborate TAp73 expression with a larger panel of angiogenic genes, we performed an unbiased clustering of a gene expression data set of gastric cancers<sup>42</sup>, which have been shown to overexpress TAp73 (ref. 13) and are highly angiogenic<sup>43</sup>, using either the validated 28-pro-angiogenic gene or the overall differentially expressed 49-angiogenic gene signature. Principal component analysis and hierarchical clustering indicated that both angiogenic signatures were capable of segregating the p73<sup>Hi</sup>- and p73<sup>Low</sup>-expressing gastric tumours (Fig. 8a,b). To evaluate the correlation of individual angiogenic genes with TAp73 expression, we determined their levels in the gastric cancer data set and observed that many of these genes had a statistically significant positive correlation with TAp73 expression (Fig. 8c and Supplementary Table 6). Consistently, these angiogenic genes were also inversely correlated with SIAH1 expression (Fig. 8d). Moreover, analysis of p73 and HIF-1 $\alpha$  and SIAH1 expression revealed a positive correlation between p73 and HIF-1 $\alpha$  and a negative correlation between HIF-1 $\alpha$  and SIAH1 as well as SIAH1 and p73, consistent with the observed effect of HIF-1 $\alpha$  on TAp73 through the suppression of SIAH1 (Fig. 8e). The collective 28-pro-angiogenic gene signature was also negatively correlated with SIAH1, further supporting the presence of this axis *in vivo* (Fig. 8f). Together, these data show that p73 expression strongly correlates with several angiogenic genes in the clinical context, and that their expression signatures are able to distinguish between TAp73 levels in human cancers.

### DISCUSSION

The role for TAp73 in promoting angiogenesis reported in the present study is consistent with its functions beyond tumour suppression. TAp73 has been shown to have growth inhibitory properties, as it is activated by a variety of stress signals and contributes to cell death<sup>4</sup>. However, clinical data report TAp73 overexpression in cancer<sup>2,12,13</sup>, indicating that other possible scenarios can exist, including the possibility of co-expression with mutant p53 or the DNp73 form, both of which have been shown to inhibit TAp73 functions<sup>44,45</sup>, thereby negating the need to mutate the overexpressed TAp73. Nonetheless, the finding that TAp73 can regulate angiogenic genes is in accordance with known data<sup>14–17</sup> demonstrating its ability to directly transactivate several anti-apoptotic/survival genes, and supports the notion that TAp73 can indeed actively promote cellular survival in a context-dependent manner. It is noteworthy that although hypoxia is similar to serum-stimulation<sup>46</sup> and DNA-damaging agents<sup>4</sup> in terms of inducing TAp73, the TAp73-mediated transcriptional programs regulated by the growth/survival versus the death/arrest programs seem to be distinct and separable as reported here, which could provide an explanation for its dual role.

In this context, three reports have emerged during the final revisions of this manuscript, suggesting both supportive and opposing roles for p73 in angiogenesis<sup>47–49</sup>. p73 was shown to be required for vasculogenesis and angiogenesis in multiple systems during development and differentiation<sup>47</sup>, strongly supporting the data



**Figure 7** Positive correlation between TAp73, Vegf-A and HIF-1 $\alpha$  protein expression in human tumours. (a,b) Expression of TAp73 and Vegf-A in colonic adenocarcinoma ( $n=244$  tumour samples; a) and infiltrating ductal carcinoma of the breast ( $n=114$  tumour samples; b) was determined by immunohistochemistry. Intensity of TAp73, VEGF-A, HIF-1 $\alpha$  and CAIX (another hypoxic marker) staining was ranked as grades from 1 to 3, with 1 being the lowest and 3 being the highest, and representative images are

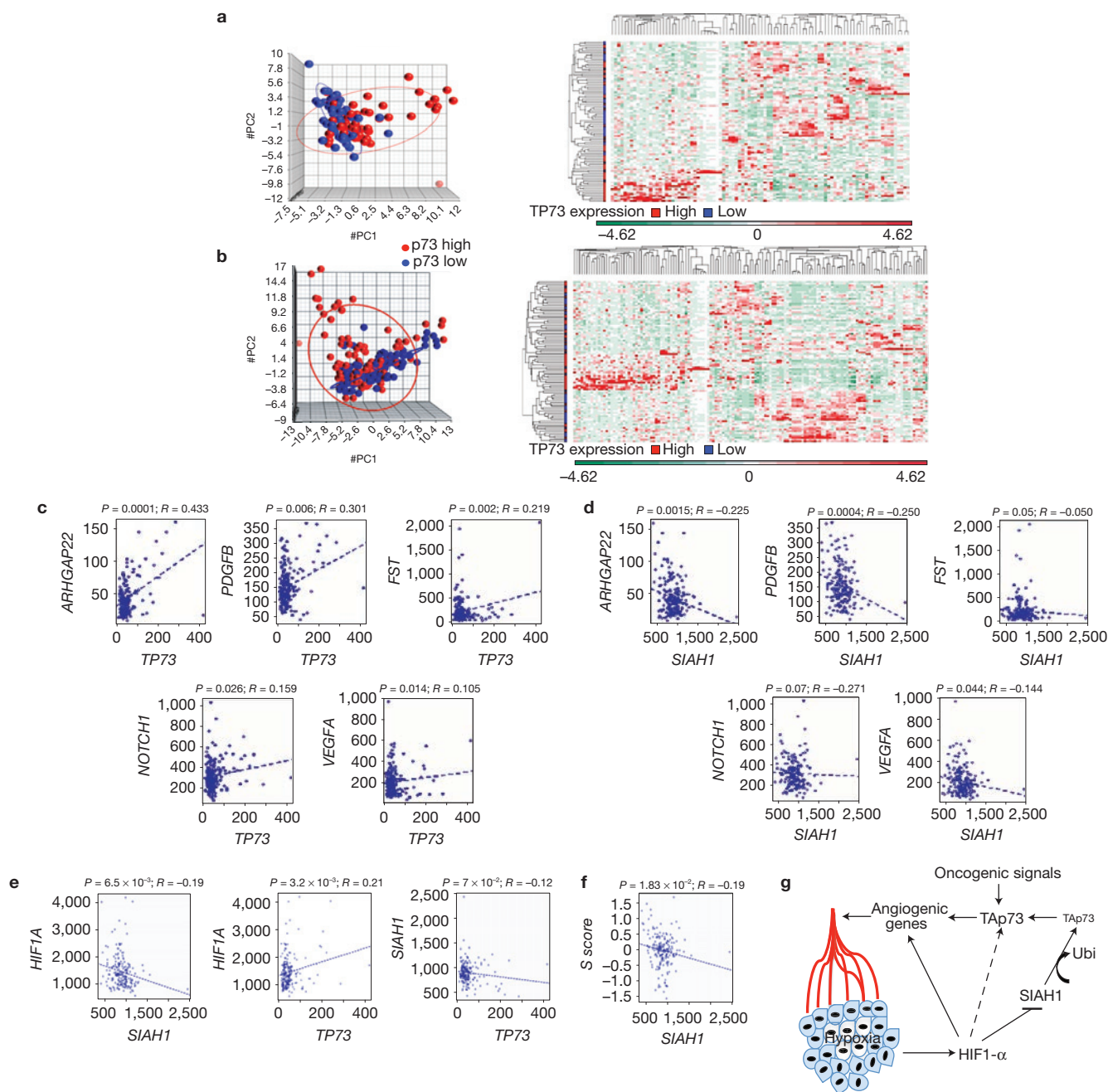
shown. Scale bars, 0.9 $\mu$ m (TAp73, VEGF-A, CAIX); 100 $\mu$ m (HIF-1 $\alpha$ ). Bar graphs show the percentage distribution of various VEGF-A, HIF-1 $\alpha$  and CAIX intensities in samples relative to TAp73 intensity. The numbers of tumours with grade 3 HIF-1 $\alpha$  and CAIX staining were minimal, and hence, have been grouped as combined TAp73 grade 2 and 3 groups in the graph. Specificity of TAp73 (3A6) antibody was confirmed with a blocking peptide against the whole transactivation (TA) domain of p73 in a grade 3 TAp73 tumour.

reported here. In contrast, two studies showed the ability of TAp73 to inhibit HIF-1 $\alpha$ -mediated angiogenesis<sup>48,49</sup>, through the recruitment and degradation of HIF-1 $\alpha$  by Mdm2 E3 ligase in an oxygen-independent manner<sup>48</sup>. Our data highlight the pro-angiogenic function of TAp73 particularly in hypoxic conditions, which is the predominant physiological milieu in growing solid tumours and where HIF-1 $\alpha$  is highly expressed and regulated by oxygen-dependent mechanisms. However, one could also envisage that the apparently opposing observations<sup>48,49</sup> might illustrate a possible regulatory feedback mechanism by which TAp73 turns off the angiogenic process (for example, when sufficient oxygen and nutrients reach proliferating tumour cells) that was initially triggered by HIF-1 $\alpha$  and subsequently supported by TAp73 in response to hypoxic stimuli. In addition, we and others<sup>16</sup> have shown that absence of TAp73 leads to smaller xenograft tumours using both independently derived MEFs from TAp73-knockout (KO) mice and cancer cells deficient in TAp73. The opposite observations in the latest studies could be attributed to the induced tumour suppressive activity of TAp73 in non-hypoxic conditions in the carcinogen-treated and xenograft mice models used<sup>48</sup>. Nevertheless, all of these data further emphasize the

contextual importance for the dual role of TAp73 in promoting or suppressing tumorigenesis.

TAp73 stabilization following hypoxia depends on HIF-1 $\alpha$  and its ability to downregulate *siah1* transcriptionally, although we were unable to evaluate the corresponding decrease in Siah1 protein owing to unavailability of good antibodies. Interestingly, however, hypoxia leads to an increase in expression of Siah2, a homologue of Siah1 and a positive regulator of HIF-1 $\alpha$ , as previously described<sup>50</sup>. These observations indicate that Siah proteins may have distinct functions and their dynamic regulation of TAp73 and HIF-1 $\alpha$  might be critical to ensure a proper angiogenic response to hypoxic conditions. Given that expression of multiple E3 ligases was also reduced on hypoxia, and silencing the expression of some led to an increase in TAp73 levels, it is possible that other E3 ligases besides Siah1 could contribute to TAp73 stabilization, in an HIF-1 $\alpha$ -independent or -dependent manner, highlighting the complex nature of the hypoxic response in TAp73 stabilization.

Comparison of the p53 family members reveals that p53 and TAp63 generally have a negative impact on angiogenesis, with *vegfa* used as a model target<sup>37,51,52</sup>. However, p53 expression was



**Figure 8** Correlation of the expression of *TAp73*, *SIAH1* and several angiogenic genes in clinical gastric tumour samples. **(a,b)** Principal component analysis (PCA; left panels) and hierarchical clustering (right panels) of gastric cancer data set was performed using the *TAp73*-regulated 28-pro-angiogenic **(a)** or the overall differentially expressed 49-angiogenic **(b)** gene signature, to segregate  $p73^{\text{Hi}}$ - from  $p73^{\text{Low}}$ -expressing tumours. Red and blue represent high and low  $p73$  expressers, respectively, for PCA. **(c-f)** Correlation plots of *TAp73* **(c)** or *SIAH1* **(d)** expression with selected angiogenic genes with significant Pearson correlation in the gastric cancer data set are shown. Similarly, correlation plots among *HIF-1 $\alpha$* , *SIAH1* and *p73* are shown **(e)**. Moreover, the

correlation of *siah1* expression with the 28-pro-angiogenic gene signature (S score) is indicated **f**. *R*, Pearson correlation coefficient; *x* and *y* axes denote the respective genes being analysed. **(g)** Model. Hypoxia-mediated *HIF-1 $\alpha$*  induction in tumours leads to the suppression of *siah1* expression, which otherwise degrades *TAp73*. Stabilized *TAp73* results in the transactivation of a large array of angiogenic genes independent of *HIF-1 $\alpha$* , thereby resulting in increased blood vessel density. It should be noted that hypoxia and *HIF-1 $\alpha$*  could also work through other E3 ligases to stabilize *TAp73*, and oncogenic signals in tumours that lead to elevated *TAp73* levels could also promote angiogenesis independent of hypoxia.

shown to lead to a short early upregulation of *vegf-A* in response to acute hypoxia through a  $p53$ -binding site on its promoter, followed by suppression<sup>52</sup>. It is noteworthy that *TAp73* does not bind to this site, which is adjacent to the *HIF-1 $\alpha$*  site (site A in

Fig. 6b). Similarly, *TAp73* has been shown to either suppress or activate the *vegf-A* promoter<sup>36,53</sup>. In our study, *TAp73* seems to regulate the expression of *vegf-A* and other pro-angiogenic genes independently of canonical  $p53$ -binding sites, further distinguishing

its distinct biological functions as a non-classical tumour-suppressor compared with p53. Moreover, our data demonstrate that the absence of TAp73 leads to a significant angiogenic defect in tumours, and conversely, inducible expression of TAp73 but not p53 was sufficient to promote the expression of several angiogenic genes and increase tumour vascularization. The analysis of human tumour samples also revealed a positive correlation between p73 and several angiogenic genes. Furthermore, absence of TAp73 at normoxia, where HIF-1 $\alpha$  is barely expressed, was sufficient to reduce the basal expression of several hypoxia-regulated angiogenic genes, prompting the speculation that other cancer-associated pathways that can upregulate TAp73 expression might also allow it to regulate the angiogenic program in non-hypoxic conditions. The impairment in blood vessel structure and density in p73-deficient tumours with functional HIF-1 $\alpha$ , and the activation of angiogenic genes by TAp73 in the absence of HIF-1 $\alpha$ -binding elements, further alludes to a distinct but complementary role of TAp73 to HIF-1 $\alpha$  in supporting angiogenesis.

In summary, the results presented here demonstrate that TAp73 has properties that support tumorigenesis, providing an explanation for its seemingly paradoxical overexpression in many human cancers. Under hypoxic conditions, one mechanism that leads to TAp73 stabilization is through the HIF-1 $\alpha$ -mediated *siah1* suppression, which consequently results in increased angiogenesis through the activation of angiogenic target genes independent of HIF-1 $\alpha$  (Fig. 8g). Notwithstanding the induction by hypoxia, the ability of TAp73 to regulate the angiogenic transcriptome, especially in cancers where it is overexpressed, would therefore promote tumour cell survival. □

## METHODS

Methods and any associated references are available in the [online version of the paper](#).

*Note: Supplementary Information is available in the [online version of the paper](#)*

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Y. Li (NUS), E. Mationg-Kalaw (SGH Path-NCCS Translational Laboratory) and M. Koh (Singhealth Tissue Repository) for technical assistance, and C. Lim and X. Min for help with statistical analysis. We are grateful to F. Mechta-Grigoriou, T. Hagen, S.-I. Matsuzawa and T. W. Mak for the *vegf-A* promoter-luciferase, dnHIF-1 $\alpha$ , *siah1* WT/ $\Delta$ RING mutant plasmids, and the TAp73<sup>-/-</sup> and TAp73<sup>+/-</sup> MEFs, respectively. We also acknowledge the Advanced Molecular Pathology Laboratory (AMPL) for the histological services provided. This study was supported by grants from the National Medical Research Council to K.S., and by grant SAF2012-36143 from the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad, co-financed by FEDER funds to M.C.M.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

I.D. designed the experiments, performed the research work, analysed the data and helped with writing of the manuscript. B.H.P. and R.O. performed the research work and analysed the data. S.Y.T., C.W.L. and D.Y.W. performed the immunohistochemistry work on human samples. A.V. and L.K.G. performed the gastric cancer data set analysis. M.M.-L., M.M.M. and M.C.M. performed the experiments related to iPSC generation and the associated teratoma studies. W.X. and E.M. provided the TAp73 antibody and advised on its use. K.S. designed the experiments, analysed the data, supervised the project and wrote the manuscript. All authors reviewed the manuscript.

## COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.

Published online at [www.nature.com/doi/10.1038/ncb3130](http://www.nature.com/doi/10.1038/ncb3130)

Reprints and permissions information is available online at [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints)

- Melino, G., De Laurenzi, V. & Vousden, K. H. p73: friend or foe in tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 605–615 (2002).
- Stiewe, T. & Pützer, B. M. Role of p73 in malignancy: tumor suppressor or oncogene? *Cell Death Differ.* **9**, 237–245 (2002).
- Bisso, A., Collavin, L. & Del Sal, G. p73 as a pharmaceutical target for cancer therapy. *Curr. Pharm. Des.* **17**, 578–590 (2011).
- Lin, K. W., Nam, S. Y., Toh, W. H., Dulloo, I. & Sabapathy, K. Multiple stress signals induce p73beta accumulation. *Neoplasia* **6**, 546–557 (2004).
- Tomasini, R. *et al.* TAp73 knockout shows genomic instability with infertility and tumor suppressor functions. *Genes Dev.* **22**, 2677–2691 (2008).
- Levrero, M. *et al.* The p53/p63/p73 family of transcription factors: overlapping and distinct functions. *J. Cell Sci.* **113**, 1661–1670 (2000).
- Buhlmann, S. & Pützer, B. M. DNP73 a matter of cancer: mechanisms and clinical implications. *Biochim. Biophys. Acta* **1785**, 207–216 (2008).
- Gong, J. G. *et al.* The tyrosine kinase c-Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced DNA damage. *Nature* **399**, 806–809 (1999).
- Agami, R., Blandino, G., Oren, M. & Shaul, Y. Interaction of c-Abl and p73 $\alpha$  and their collaboration to induce apoptosis. *Nature* **399**, 809–813 (1999).
- Yuan, Z. M. *et al.* p73 is regulated by tyrosine kinase c-Abl in the apoptotic response to DNA damage. *Nature* **399**, 814–817 (1999).
- Donehower, L. A. *et al.* Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* **356**, 215–221 (1992).
- Zaika, A. I., Kovalev, S., Marchenko, N. D. & Moll, U. M. Overexpression of the wild type p73 gene in breast cancer tissues and cell lines. *Cancer Res.* **59**, 3257–3263 (1999).
- Kang, M. J. *et al.* Loss of imprinting and elevated expression of wild-type p73 in human gastric adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.* **6**, 1767–1771 (2000).
- Vikhanskaya, F. *et al.* p73 supports cellular growth through c-Jun-dependent AP-1 transactivation. *Nat. Cell Biol.* **9**, 698–705 (2007).
- Toh, W. H., Logette, E., Corcos, L. & Sabapathy, K. TAp73 $\beta$  and DNP73 $\beta$  activate the expression of the pro-survival caspase-2S. *Nucleic Acids Res.* **36**, 4498–5509 (2008).
- Du, W. *et al.* TAp73 enhances the pentose phosphate pathway and supports cell proliferation. *Nat. Cell Biol.* **15**, 991–1000 (2013).
- Lefkimmiatis, K. *et al.* p73 and p63 sustain cellular growth by transcriptional activation of cell cycle progression genes. *Cancer Res.* **69**, 8563–8571 (2009).
- Bertout, J. A., Patel, S. A. & Simon, M. C. The impact of O<sub>2</sub> availability on human cancer. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 967–975 (2008).
- Semenza, G. L. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene* **29**, 625–634 (2010).
- Semenza, G. L. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 721–732 (2003).
- Yan, Y. *et al.* Inhibitors of ubiquitin-activating enzyme (E1), a new class of potential cancer therapeutics. *Cancer Res.* **67**, 9472–9481 (2007).
- Pagano, M. *et al.* Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science* **269**, 682–685 (1995).
- Kaelin, W. G. Jr The von Hippel-Lindau tumour suppressor protein: O<sub>2</sub> sensing and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 865–873 (2008).
- Chew, E. H., Poobalasingam, T., Hawkey, C. J. & Hagen, T. Characterization of cullin-based E3 ubiquitin ligases in intact mammalian cells—evidence for cullin dimerization. *Cell. Signal.* **19**, 1071–1080 (2007).
- Narita, T. *et al.* Identification of a novel small molecule HIF-1 $\alpha$  translation inhibitor. *Clin. Cancer Res.* **15**, 6128–6136 (2009).
- Kung, A. L. *et al.* Small molecule blockade of transcriptional coactivation of the hypoxia-inducible factor pathway. *Cancer Cell* **6**, 33–43 (2004).
- Hu, G. & Fearon, E. R. Siah-1 N-terminal RING domain is required for proteolysis function, and C-terminal sequences regulate oligomerization and binding to target proteins. *Mol. Cell Biol.* **19**, 724–732 (1999).
- Pugh, C. W. & Ratcliffe, P. J. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat. Med.* **9**, 677–684 (2003).
- Liao, D. & Johnson, R. S. Hypoxia: a key regulator of angiogenesis in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **26**, 281–290 (2007).
- Wernig, M. *et al.* *In vitro* reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* **448**, 318–324 (2007).
- Battagay, E. J., Rupp, J., Iruela-Arispe, L., Sage, E. H. & Pech, M. PDGF-BB modulates endothelial proliferation and angiogenesis *in vitro* via PDGF beta-receptors. *J. Cell Biol.* **125**, 917–928 (1994).
- Ten Dijke, P., Goumans, M. J. & Pardoll, E. Endoglin in angiogenesis and vascular diseases. *Angiogenesis* **11**, 79–89 (2008).
- Weckbach, L. T. *et al.* Midkine acts as proangiogenic cytokine in hypoxia-induced angiogenesis. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **303**, H429–H438 (2012).
- Rosenbluth, J. M., Mays, D. J., Pino, M. F., Tang, L. J. & Pietenpol, J. A. A gene signature-based approach identifies mTOR as a regulator of p73. *Mol. Cell Biol.* **28**, 5951–5964 (2008).
- Koeppl, M. *et al.* Crosstalk between c-Jun and TAp73 $\alpha/\beta$  contributes to the apoptosis-survival balance. *Nucleic Acids Res.* **39**, 6069–6085 (2011).
- Vikhanskaya, F. *et al.* p73 overexpression increases VEGF and reduces thrombospondin-1 production: implications for tumor angiogenesis. *Oncogene* **20**, 7293–7300 (2001).
- Zhang, L. *et al.* Wild-type p53 suppresses angiogenesis in human leiomyosarcoma and synovial sarcoma by transcriptional suppression of vascular endothelial growth factor expression. *Cancer Res.* **60**, 3655–3661 (2000).

38. Chen, C., Pore, N., Behrooz, A., Ismail-Beigi, F. & Maity, A. Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia. *J. Biol. Chem.* **276**, 9519–9525 (2001).
39. Potter, C. & Harris, A. L. Hypoxia inducible carbonic anhydrase IX, marker of tumour hypoxia, survival pathway and therapy target. *Cell Cycle* **3**, 164–167 (2004).
40. Li, C. W. *et al.* Role of p63/p73 in epithelial remodeling and their response to steroid treatment in nasal polyposis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **127**, 765–772 (2011).
41. Hsu, Y. C. *et al.* Increased expression of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  in the nasal polyps. *Am. J. Otolaryngol.* **28**, 379–383 (2007).
42. Ooi, C. H. *et al.* Oncogenic pathway combinations predict clinical prognosis in gastric cancer. *PLoS Genet.* **5**, e1000676 (2009).
43. Kitadai, Y. Angiogenesis and lymphangiogenesis of gastric cancer. *J. Oncol.* **2010**, 468725 (2010).
44. DiComo, C. J., Gaiddon, C. & Prives, C. p73 function is inhibited by tumor-derived p53 mutants in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 1438–1449 (1999).
45. Pozniak, C. D. *et al.* An anti-apoptotic role for the p53 family member, p73, during developmental neuron death. *Science* **289**, 304–306 (2000).
46. Weiss, R. H. & Howard, L. L. p73 is a growth-regulated protein in vascular smooth muscle cells and is present at high levels in human atherosclerotic plaque. *Cell Signal.* **13**, 727–733 (2001).
47. Fernandez-Alonso, R. *et al.* p73 is required for endothelial cell differentiation, migration and the formation of vascular networks regulating VEGF and TGF $\beta$  signaling. *Cell Death Differ.* <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2014.214> (2015).
48. Amelio, I. *et al.* TAp73 opposes tumor angiogenesis by promoting hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  degradation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **112**, 226–231 (2015).
49. Stantic, M. *et al.* TAp73 suppresses tumor angiogenesis through repression of proangiogenic cytokines and HIF-1 $\alpha$  activity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **112**, 220–2225 (2015).
50. Nakayama, K. *et al.* Siah2 regulates stability of prolyl-hydroxylases, controls HIF1 $\alpha$  abundance, and modulates physiological responses to hypoxia. *Cell* **117**, 941–952 (2004).
51. Senoo, M., Matsumura, Y. & Habu, S. TAp63 $\gamma$  (p51A) and dNp63 $\alpha$  (p73L), two major isoforms of the p63 gene, exert opposite effects on the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene expression. *Oncogene* **21**, 2455–2465 (2002).
52. Farhang, G. M., Goossens, S. & Haigh, J. J. The p53 family and VEGF regulation: "It's complicated". *Cell Cycle* **12**, 1331–1332 (2013).
53. Salimath, B., Marmé, D. & Finkenzeller, G. Expression of the vascular endothelial growth factor gene is inhibited by p73. *Oncogene* **20**, 7293–7300 (2001).



## METHODS

**Cells and reagents.** Cells lines used were as follows: human cell lines—HCT116 colon carcinoma cells, p53 null H1299 lung adenocarcinoma cells, p53 null Saos2 osteosarcoma cells (obtained from ATCC) and the last two being also with the inducible TAp73 $\beta$ -construct-tet-on system<sup>14</sup>; isogenic Saos2 cells inducibly expressing TAp73 $\alpha$ , TAp73 $\beta$  or p53 (ref. 54); p73 mouse fibroblasts—TAp73<sup>+/+</sup> and TAp73<sup>-/-</sup> (gift from T. Mak, The Campbell Family Institute for Breast Cancer Research, Canada), stably expressing E1a and Ras constructs<sup>5</sup>; HEK293 human embryonic kidney parental cells or those that stably express the mutant dnUbc12-HA under the tet-on system were a gift from T. Hagen (National University of Singapore, Singapore). Two micrograms per millilitre of doxycycline (Sigma-Aldrich) was added to HEK293-dnUbc12-HA cells and Saos2/H1299 TAp73 $\beta$  inducible cells to induce dnUbc12 and TAp73 $\beta$  respectively. All cells were tested for mycoplasma contamination. Chemicals and inhibitors used: PYR-41 (Biogenova), dimethylxaloylglycine (DMOG), chetomin (Santa Cruz Biotechnology), deferoxamine (Sigma-Aldrich), KC7F2 (Merck Millipore), MG-132 (Calbiochem).

Hypoxia was induced by incubating cells in a modular incubator chamber (Billups-Rothenberg) containing 1% O<sub>2</sub> at 37 °C for 24 h, unless otherwise stated. The chamber containing cells was flushed for 1.5 min at 2 PSI with 1% O<sub>2</sub> and sealed to create the hypoxia conditions. Reoxygenation was carried out by placing the hypoxic cells back at 21% O<sub>2</sub>, for indicated durations. For half-life determination under hypoxia, medium containing 50  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> cycloheximide was de-gassed 2 h before adding to hypoxic cells. Modulator was flushed with 1% O<sub>2</sub> in between every collection at indicated time points.

**Plasmids, siRNAs and transfection.** Plasmids used in this study: pCDNA3.1, Flag-TAp73 $\beta$ , HA-TAp73 $\alpha$ , TAp73 $\beta$ , TAp73 $\beta$ -R292H, p53, B-gal, 6 $\times$ -His-Ub, Egfp, dnHIF-1 $\alpha$  and HA-dnUbc12 were gifts from T. Hagen. -1176-Vegf-A-luc and mutHIF-1 $\alpha$ -Vegf-A-luc were gifts from F. Mechta-Grigoriou (Institut Curie, INSERM, France). WT Siah1 and  $\Delta$ RING mutant Siah1 Flag-tagged plasmids were gifts from S.-I. Matsuzawa (The Burnham Institute, USA). Cells ( $2 \times 10^5$ ) were transfected with the various plasmids (0.2–0.5  $\mu$ g of DNA) using Lipofectamine Plus-Reagent (Life Technologies). The total amount of transfected DNA was equalized with an appropriate amount of pCDNA3.1 vector in all cases. Cells were generally collected 24 h–48 h after transfection for luciferase analyses and immunoblotting. siRNA transfections were performed using the Transmessenger transfection kit (Qiagen) and cells were collected 48–72 h post transfection. Target sequence of siRNAs used: human *hif-1 $\alpha$* : 5'-CTAACTGGACACAGTGTGT-3'; human *hif-1 $\beta$* : 5'-GGTCAGCAGTCTTCATGA-3'; human *Siah1*: 5'-GATAGGAACACGCAAGCAA-3'; human *p73*: 5'-CGGATTCAGCATGGACGT-3'; human *pirh2*: 5'-CCAACAGACUUGUGAAGAA-3'; human *wpp2*: 5'-CAGGAUGGGAGAUGAAUA-3'; human *csn5*: 5'-GGAUCACCAUUACUUUAAAG-3' and scrambled control: 5'-AATTCTCCGAACGTGTCACGT-3', human *vhl*: 5'-ACGATGGGCTTCTGGTTAA-3'. Other siRNAs against human *siah1* (sc 37495), mouse *siah1* (sc 37496) and human *vhl* (sc 36816) were purchased from Santa Cruz Biotechnology.

**Luciferase assay.** Cells were transiently transfected with 0.2  $\mu$ g of the relevant plasmids along with the reporter constructs (Vegf-A-luc, mutHIF-1 $\alpha$ -Vegf-A-luc) and 0.1  $\mu$ g of  $\beta$ -galactosidase construct to normalize for transfection efficiency. Luciferase assays were performed in triplicate as described previously<sup>14,15</sup>.

**Real-time qPCR analyses.** Total RNA was prepared from cells using TRIZOL Reagent (Life Technologies) and converted into single-strand cDNA using Superscript II Reverse Transcriptase (Life Technologies). Real-time quantitative RT-PCR (qPCR) was carried out using Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Science) and Maxima SYBR Green (Fermentas) according to the manufacturers' protocols. All primers used in this study are shown in Supplementary Table 7.

**Immunoblotting and co-immunoprecipitation.** Immunoblot analysis was performed essentially as described previously<sup>14</sup>. Typically, 50  $\mu$ g and 1,000  $\mu$ g of protein lysate were used for immunoblot and immunoprecipitation analyses respectively. For co-immunoprecipitation, lysates were first pre-cleared by incubation with 20  $\mu$ l of 50% slurry of mouse IgG-agarose beads (Sigma-Aldrich) for 2 h, followed by incubation with 30  $\mu$ l of anti-HA agarose beads (Santa Cruz Biotechnology) for 4 h at 4 °C under constant rotation. Beads were then washed  $\times 4$  with NP-40 lysis buffer and protein complexes were eluted in 2 $\times$ SDS sample protein loading buffer. Detection was done using enhanced Chemiluminescent reagent (Amersham) or Super signal West Dura (Pierce). Antibodies used in this study are: anti-p73 (ER15; 1:1,000; Calbiochem), anti-p73 (GC15; 1:1,000; Calbiochem), anti-HA (Y-11; 1:2,000; Santa Cruz Biotechnology), anti-FLAG (M2; 1:2,000; Stratagene), anti-Itch (611198, 1:1,000; BD Biosciences), anti-p27 (C-19; 1:500; Santa Cruz Biotechnology), anti-actin (AC-74, 1:5,000; Sigma-Aldrich), anti-Egfp (B-2; 1:2,000; Santa Cruz Biotechnology), anti-HIF-1 $\alpha$  (1:250; BD Biosciences),

anti-HIF-1 $\beta$  (2B10; 1:1,000; Abcam), anti-VHL (1:250; BD Pharmingen) and anti-Ub (P4D1; 1:1,000; Santa Cruz Biotechnology). Bands for immunoblots were quantified using ImageStudio Lite (LI-COR Biosciences) and Gel-Pro Analyzer 3.1.

**In vivo ubiquitylation assay.** For assays using exogenous ubiquitin, H1299 cells were transfected with the relevant plasmids together with 2  $\mu$ g of 6 $\times$ His-ubiquitin plasmid. Before collection, cells were treated with 10  $\mu$ M MG-132 for 6 h. Cells were lysed in 500  $\mu$ l of buffer A (6 M guanidinium-HCl, 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 8.0, 10 mM imidazole), and the lysate was sonicated for 30 s to reduce viscosity and then mixed on a rotator with 50  $\mu$ l (settled volume) of nickel-NTA-agarose beads (Qiagen) for 4 h at 4 °C. The beads were washed  $\times 1$  with the lysis buffer,  $\times 1$  with lysis buffer diluted in 25 mM Tris-HCl (pH 6.8) with 20 mM imidazole (1:4), and  $\times 2$  with 1 ml of 25 mM Tris-HCl (pH 6.8) with 20 mM imidazole. Purified proteins were eluted by boiling the beads in  $\times 2$  sample loading buffer supplemented with 250 mM imidazole and analysed by immunoblotting. For assays using endogenous ubiquitin, ubiquitylated p73 species were immunoprecipitated with anti-FLAG M2-agarose beads (Sigma-Aldrich), similar to co-immunoprecipitation analysis. However, lysis and washing buffers were additionally supplemented with 5 mM N-ethylmaleimide (Sigma-Aldrich) to inhibit isopeptidase and deubiquitylase enzymes.

**Chromatin immunoprecipitation.** Inducible or transfected cells were fixed with 1% formaldehyde for 10 min at room temperature, and the reaction was stopped by addition of glycine to a final concentration of 125 mM for 15 min. Cells were then washed twice with ice-cold PBS and once with KM buffer (pH 6.8, 10 mM NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 5 mM dithiothreitol, 10% glycerol, 10 mM MOPS), and lysed for 30 min using 4 ml KM buffer with 1% NP40 and protease inhibitors at 4 °C. Thereafter, the buffer was adjusted with 2.7 ml 5 M NaCl for 60 min at 4 °C and cells were collected with TE buffer and the extracts were sonicated  $\times 5$  with 10 s pulse for 3 min each, with intervals of about 5 min on ice. Samples were centrifuged at 15,800g at 4 °C for 30 min and supernatant was collected. Four hundred microlitres of sample was used for immunoprecipitation with 5  $\mu$ l of anti-p73 (ER-15+GC-15; Calbiochem) or mouse IgG for 2 h at 4 °C. Ten microlitres of Dynabeads Protein A and G (Life Technologies) were added for a further 2 h. Immunocomplexes were washed with  $\times 2$  RIPA buffer,  $\times 1$  HS buffer (0.1% SDS, 1% Triton X, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 8, 500 mM NaCl),  $\times 1$  LS buffer (0.1% SDS, 1% Triton X, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl),  $1 \times 0.25$  M LiCl buffer and  $1 \times 0.5$  M LiCl buffer at 37 °C for 10 min, follow by  $\times 2$  RIPA buffer and  $\times 2$  TE buffer. DNA protein complex was eluted with TE buffer containing 1% SDS. Protein DNA complex was then reverse crosslinked by addition of 200 mM NaCl for 4 h at 65 °C, followed by proteinase K treatment at a final concentration of 500  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> at 55 °C for 2 h. DNA was eluted using a DNA extraction kit (Qiagen).

For all ChIP experiments, real-time qPCR analyses were performed. Relative occupancy values were calculated after normalization with ChIP input DNA. All ChIP experiments were repeated at least three times. The primers used for real-time qPCR to quantify the ChIP-enriched DNA are shown in Supplementary Table 7.

**Mouse xenograft studies.** E1a/RAS-transformed MEFs or H1299-TAp7 $\beta$ - or Saos2-TAp7 $\beta$ -inducible cells ( $2 \times 10^6$  per 0.1 ml of PBS) were injected subcutaneously into both the left and right flanks of 5-week-old immunodeficient SCID female mice. For MEFs, tumours were allowed to grow for 5 weeks and tumour volume was measured before collection. For H1299-TAp7 $\beta$ - and Saos2-TAp7 $\beta$ -inducible cells, tumours were allowed to grow to approximately 100 mm<sup>-3</sup> and mice were randomly separated into control or treatment groups. One hundred microlitres of doxycycline at a dose of 2 mg ml<sup>-1</sup> was administered by oral gavage daily for 6 days before tumours were collected in the treatment group.

For the other tumour studies, induced pluripotent stem cells (iPSCs) were generated from early passage primary MEFs from various p73<sup>-/-</sup> E13.5 embryos or WT littermates (C57BL/6 background) by reprogramming using the piggyBac transposon system<sup>55</sup>. Eight independent iPSC clones for the WT and five iPSC clones for the p73KO were generated. Typically  $4 \times 10^6$  cells were implanted subcutaneously into 8- to 10-week-old SCID mice. At least three different iPSC clones (generated from different animals) for each genotype (2 injections per mouse; 2 mice per clone) were used in the studies. Mice were euthanized by cervical dislocation when the tumour size was at least 200 mm<sup>-3</sup>, which were formalin-fixed and used for immunohistochemistry studies.

No statistical method was used to pre-determine sample size. Numbers of mice for each group are indicated in figure legends. Tumour volume was calculated with the equation  $V$  (in mm<sup>-3</sup>) =  $a \times b^2 \times 0.5$ , where  $a$  is the longest diameter and  $b$  is the shortest diameter. All animal experiments were carried with the approval of the Singhealth Institutional Animal Care and User Committee (IACUC), and in accordance with European (Council Directive 2010/63/UE) and Spanish regulations (RD 53/2013) on the protection of experimental animals with the appropriate institutional guidelines. The investigators were not blinded to allocation during experiments and outcome assessment.

**Clinical samples.** Nasal polyp tissues were obtained from patients with nasal polyposis who were scheduled for functional endoscopic sinus surgery in the department of Otolaryngology, National University of Singapore. Approval to conduct this study and informed consent from all subjects were obtained from the National Healthcare Group Domain Specific Review Board of Singapore (to D.Y.W.). Similarly, tissue micro-array (TMA) sections with breast infiltrating ductal carcinoma, normal colon and colonic adenocarcinoma tissues were obtained from the Singhealth Tissue Repository on approval from Singhealth Centralized IRB and informed consent from all subjects (to S.Y.T.).

**Immunohistochemistry.** For nasal polyps, samples were fixed in formalin, embedded in paraffin and sectioned at 4  $\mu$ m with a Leica microtome (Leica Microsystems). Expression of indicated proteins was examined by immunohistochemical staining using a DAKO EnVision<sup>+</sup> System-HRP system (Dako) and pH 6.0 antigen retrieval buffer. For human and mouse tumours, paraffin sections were processed using Bond Epitope Retrieval Buffer, Bond Leica Automated Staining and Bond Refine Kit (Leica Microsystems). Antibodies used for human tissues: anti-TAp73 (3A6; F.M. and W.X.), anti-Vegf-A (A-20; Santa Cruz Biotechnology; and Abcam), anti-HIF-1 $\alpha$  (H-206; Santa Cruz Biotechnology), anti-CAIX (NB100-417; Novus Biologicals), anti-MNF116 (Dako), anti-CD31 (JC70A, Dako) and anti-Ki67 (MIB-1; Dako). Antibodies used for mouse tissues: anti-p73 (GC15; Calbiochem), anti-HIF-1 $\alpha$  (ab2185; Abcam) and anti-CD34 (MEC14.7; Santa Cruz Biotechnology). All antibodies were used at a dilution of 1:100, except for the TAp73 antibody, which was used at 1:10 dilution. All slides were counterstained with haematoxylin. Species- and subtype-matched antibodies were used as negative controls. Staining was quantified using the whole cross-section of each tumour. Quantification of TAp73 and Vegf-A expression was done blindly by a research pathologist without reference to sample IDs.

For p73 blocking peptide experiments, tissues were either incubated with the indicated antibody alone or in combination with the p73 blocking peptide at various concentrations. Blocking peptide was synthesized against the whole transactivation (TA) domain of p73 protein (amino acids 1–62; Shanghai Mocell Biotech.).

Investigators were blinded when staining and analysing the stains for both human and mouse tumour samples. Quantification of blood vessel density and size were carried out blindly by a research technician at the service company using Angiosight and SlidePath Tissue IA (Leica Microsystems). Values were calculated on the basis of the total area of a cross-section of each tumour.

**Microarray analyses.** RNA was extracted from control and hypoxia-treated TAp73<sup>+/+</sup> and TAp73<sup>-/-</sup> MEFs using the QIAGEN RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. RNA quality was assessed on a 2100 Bioanalyzer (Agilent), and total RNA was hybridized to an Illumina MouseWG-6 v2 BeadChip array ( $n = 4$  for each genotype). Differential gene expression was determined comparing TAp73<sup>-/-</sup> with TAp73<sup>+/+</sup> using Partek Genomics Suite 6.6. The identities of angiogenesis genes were found by Partek Gene Ontology (GO), enrichment analysis and cross-reference to gene lists from Angiogenesis and Angiogenic Growth Factors RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array (SABiosciences). Raw data

were also downloaded from the Gene Expression Omnibus (GEO) for H1299 cells retrovirally transfected with TAp73 $\beta$  and Gfp control<sup>34</sup> and analysed using Partek Genomics Suite 6.6.

**Gastric cancer data set analyses.** A panel of angiogenesis genes was collated from genes filtered from the microarray of *in vivo* mouse experiments (MEFs) to evaluate their expression with respect to TAp73 levels in gastric cancer. Two hundred primary gastric tumours from Asian patients reported previously (referenced accession number GSE15460) were used in this study<sup>42</sup>. Samples were stratified into low and high TAp73 expressions. Genomics data were pre-processed using MAS5 and analysed with Partek Genomics Suite 6.6. Hierarchical clustering and principal component analysis plots were generated using the panel of selected angiogenic genes. Pearson correlation was used in evaluating association of *p73*, *hif-1 $\alpha$*  and *Siah1* expression with the angiogenic genes and the *P* values are indicated in the figures. Pathway analyses were performed using the Ingenuity Pathway Analysis (IPA) software. For evaluation of networks associated with high and low p73 expression, the top 100 differentially expressed genes were used. *S* scores were computed using the signature-score method presented in ref. 56.

**Statistical analysis.** Results were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (s.d.) of three or more biological replicates and representative data are shown from three independent experiments, unless otherwise indicated. Student's *t*-test was used to determine whether the observed difference was statistically significant for Figs 4a–e and 8c–f and Supplementary Fig. 3b,d. Similarly, an unpaired Mann–Whitney test was used for Fig. 3b,c (upper panel) and Fig. 5b and Supplementary Fig. 4a,c. Significance was defined as  $P < 0.05$  (adjusted for Bonferroni correction). For calculating correlation of TAp73 with the other markers in tumours (Figs 7 and 8), Fisher's exact test and a Mantel–Haenszel test were used. For the direction and strength of the correlation of expression in tumours, Kendall's tau-b test was used. Significance was defined as  $P < 0.01$ . Two-way ANOVA was used to determine significance between different genotypes in Figs 5d and 6e. All analyses were done using GraphPad Prism, SAS version 9.3 and PASW Statistics 18. \* represents  $P < 0.05$ ; \*\* represents  $P < 0.01$  and \*\*\* represents  $P < 0.0001$ .

**Accession numbers.** Microarray data generated in this study are available at GEO with primary accession number GSE62236. Data from primary gastric tumours from Asian patients have the referenced accession number GSE15460. Data from H1299 cells retrovirally transfected with TAp73 $\beta$  and Gfp control have the referenced accession number GSE11673.

54. Balint, E., Phillips, A. C., Kozlov, S., Stewart, C. L. & Vousden, K. H. Induction of p57(KIP2) expression by p73beta. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **99**, 3529–3534 (2002).
55. Woltjen, K. *et al.* piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* **458**, 766–770 (2009).
56. Hsiao, T. H. *et al.* Utilizing *signature-score* to identify oncogenic pathways of cholangiocarcinoma. *Trans. Cancer Res.* **2**, 6–17 (2013).

