



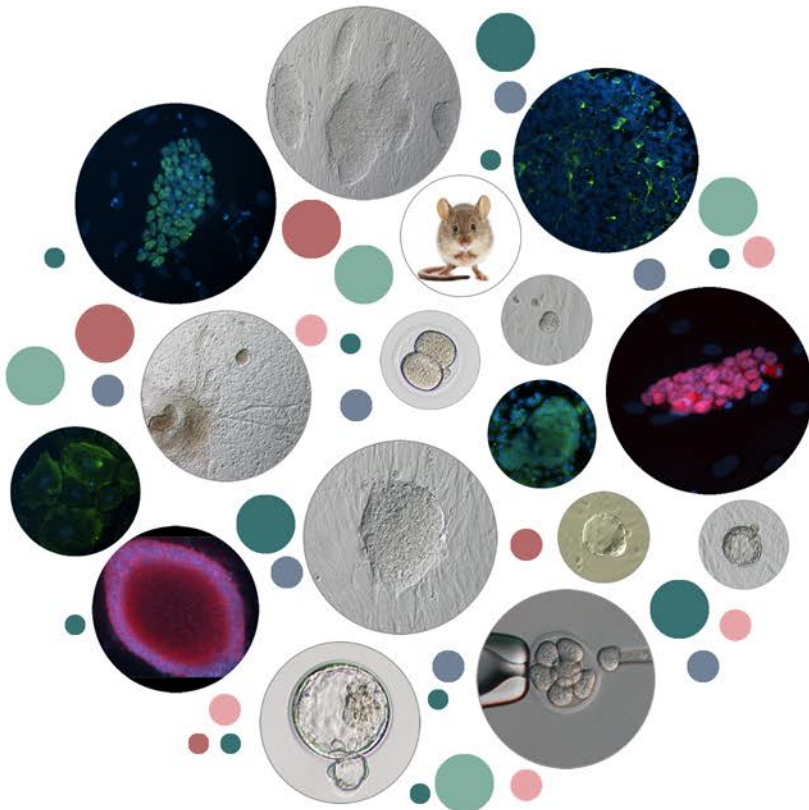
Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

Efecte de l'activitat de les vies de senyalització en la derivació de cèl·lules mare embrionàries de ratolí a partir de blastòmers aïllats



Marta Vila Cejudo

Tesi doctoral – Setembre 2017

UAB

Universitat Autònoma de Barcelona



Universitat Autònoma de Barcelona

Efecte de l'activitat de les vies de senyalització en la derivació de cèl·lules mare embrionàries de ratolí a partir de blastòmers aïllats

Marta Vila Cejudo

Memòria presentada per optar al Grau de Doctor en Biologia
Cel·lular per la Universitat Autònoma de Barcelona.

Bellaterra, 2017

Directors:

Dr. Josep Santaló Pedro i Dra. Elena Ibáñez de Sans

El **Dr. Josep Santaló Pedro**, catedràtic del Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona,

i la **Dra. Elena Ibáñez de Sans**, professora agregada del Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona,

Certifiquen:

Que **Marta Vila Cejudo** ha realitzat sota la seva direcció el treball d'investigació que s'exposa en la memòria titulada "**Efecte de l'activitat de les vies de senyalització en la derivació de cèl·lules mare embrionàries de ratolí a partir de blastòmers aïllats**" per optar al Grau de Doctora per la Universitat Autònoma de Barcelona.

Que aquest treball s'ha dut a terme a la Unitat de Biologia Cel·lular del Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona.

I per tal que així consti, firmen el present certificat.

Bellaterra, 28 de juny de 2017.

Aquesta tesi s'ha realitzat amb el finançament dels projectes AGL 2014-52408-R del Ministerio de Economía y Competitividad i 2014 SGR-524 de la Generalitat de Catalunya. La Marta Vila Cejudo ha gaudit d'una beca predoctoral per a Personal Investigador en Formació (PIF) concedida per la Universitat Autònoma de Barcelona.

*Als meus pares,
a les meves àvies,
a la Mireia,
al Toni*

“però en mirar-lo, el camí no diu si vas a la glòria o bé al fracàs”

Cançó del dubte

Manel

ÍNDEX

Índex	1
Resum	3
Abstract	5
Abreviatures i acrònims	7
Introducció	9
1. Cèl·lules mare: definició i característiques generals	10
1.1 Potencial de diferenciació de les cèl·lules mare	10
1.1.1 Cèl·lules totipotents	10
1.1.2 Cèl·lules pluripotents.....	12
1.1.2.1 Cèl·lules mare embrionàries	12
1.1.2.2 Cèl·lules mare de l'epiblast.....	13
1.1.2.3 Cèl·lules embrionàries germinals	13
1.1.2.4 Cèl·lules mare germinals.....	14
1.1.2.5 Cèl·lules mare embrionàries obtingudes per transferència nuclear	14
1.1.2.6 Cèl·lules mare de pluripotència induïda	14
1.1.3 Cèl·lules multipotents	16
1.2 L'Estat de pluripotència	16
1.2.1 Pluripotència Naïve	16
1.2.2 Pluripotència Primed	17
1.2.3 Característiques diferencials	17
2. Aplicacions de les cèl·lules mare	20
3. Cèl·lules mare embrionàries de ratolí	22
3.1 Manteniment de la pluripotència naïve	23
3.1.1 Complex proteic de manteniment de la pluripotència.....	24

3.1.1.1 OCT4	24
3.1.1.2 SOX2	24
3.1.1.3 NANOG	25
3.1.1.4 Proteïnes secundàries del complex de manteniment de la pluripotència.....	26
3.1.2 Vies de senyalització implicades en el manteniment de la pluripotència	28
3.1.2.1 JAK/STAT	28
3.1.2.2 MAPK	32
3.1.2.3 TGFβ i BMP	35
3.1.2.4 Wnt	37
3.1.2.5 Unions Adherents	39
3.2 Variables que influeixen en la derivació i cultiu de línies de les cèl·lules mare embrionàries de ratolí.....	41
3.2.1 Fons genètic de la soca donadora d'embrions	41
3.2.2 Condicions de cultiu	43
3.2.2.1 Superfícies per al cultiu de les mESCs	43
3.2.2.2 Suplements del medi	44
3.2.2.3 Moduladors de les vies de senyalització	46
3.2.2.4 Origen de les cèl·lules mare embrionàries de ratolí	52
Objectius.....	59
Resultats	63
3.1 Genetic background, medium supplements and signaling modulators differently affect mouse embryonic stem cells derivation from whole embryos and single blastomeres	65
3.2 Unraveling the role of Wnt pathway in mESC derivation from isolated blastomeres from 8-cell embryos.....	91
Discussió	117
Conclusions	129
Bibliografia.....	133

RESUM

La derivació de línies de cèl·lules mare embrionàries (ESC) requereix que la pluripotència que presenten els embrions es mantingui en el cultiu in vitro. L'estudi de les ESC permet conèixer els mecanismes necessaris pel manteniment de la pluripotència i els processos de diferenciació cel·lular i aplicar els coneixements obtinguts en el camp de la medicina regenerativa. Per això, durant les últimes dècades, s'ha estudiat el procés de derivació i manteniment d'ESC en espècies model, com ara el ratolí. Aquests estudis han permès determinar que l'èxit de la derivació de línies de ESC de ratolí (mESC) recau en les condicions de cultiu i les característiques inherents dels embrions utilitzats per a començar el procés de derivació. Tanmateix, com que la majoria d'estudis s'han realitzat en línies derivades a partir de blastocists no es coneix quina és la influència d'aquestes variables en la derivació de mESC a partir de blastòmers aïllats ni tampoc les característiques que presenten les línies establertes en aquestes condicions. Per això, l'objectiu d'aquesta tesi és estudiar la influència de les condicions de cultiu i les característiques de les cèl·lules establertes a partir de blastòmers aïllats.

En un primer treball, es va estudiar la influència del fons genètic de la soca donadora d'embrions, els suplementes del medi de cultiu (KSR i N2B27) i la presència del còctel 2i, que activa la senyalització de la via de Wnt i inhibeix la senyalització de la via de les MAPK, en la derivació de línies de mESC a partir de blastòmers aïllats i blastocists sencers, utilitzats com a control. En aquest estudi, es va observar que tan sols els blastòmers provinents d'embrions de soques permissives cultivats en un medi suplementat amb KSR i en presència del còctel 2i, permetien establir línies de mESC amb eficiències raonablement elevades, properes al 25%. A més a més, els resultats d'aquest estudi van determinar que els blastòmers tenen uns requeriments més elevats que els blastocists per tal de poder establir línies de mESC.

Tenint en compte els resultats obtinguts, en un segon treball es va estudiar amb més profunditat l'efecte de les vies de Wnt i MAPK en la derivació de mESC a partir de blastòmers aïllats i les característiques de les línies tractades amb diferents moduladors d'aquestes vies. Els resultats d'aquest treball van apuntar que l'activació de la via de Wnt és determinant per a la derivació de línies de mESC a

partir de blastòmers aïllats. A més a més, els resultats van mostrar que les eficiències de derivació augmenten quan es combinen parelles de moduladors, essent màximes en el tractament amb 2i. L'activació de la via de Wnt va fer que les cèl·lules presentessin característiques de l'estat de pluripotència *naïve*. En canvi, la inhibició de la via combinada amb altres moduladors, va comportar una reducció en l'activitat transcripcional de la via i va fer que les mESC presentessin característiques de l'estat de pluripotència *primed*.

En conjunt, els resultats d'aquesta tesi posen de manifest que el fons genètic dels embrions, els suplementes del medi i sobretot les vies de senyalització modulen l'eficiència de derivació i determinen les característiques que presenten les línies de mESC establertes a partir de blastòmers aïllats, i que aquestes variables afecten d'una manera diferent les línies que s'estableixen a partir de blastocists i blastòmers aïllats.

ABSTRACT

Embryonic stem cell (ESC) derivation requires that the pluripotency of the embryos is maintained under *in vitro* conditions. The fundamental studies on ESC reveal the mechanisms required to maintain ESC pluripotency and differentiation, which can be applied in regenerative medicine studies. Therefore, during the last decades the derivation process has been studied in several model organisms, such as the mouse. These studies have determined that mouse ESC (mESC) derivation depends on culture conditions and the intrinsic features of the embryos used to start the derivation process. Nevertheless, most mESC derivation studies have been performed with whole embryos, and little is known about the influence of these variables when mESC are derived from isolated blastomeres or the features of the lines established. In this scenario, the present thesis aims to study the influence of culture conditions and the features of mESC lines established from single isolated blastomeres.

First, we assessed the influence of the genetic background of the mouse strains, the medium supplements (KSR and N2B27) and the presence of the 2i cocktail, which activates Wnt signaling pathway and inhibits MAPK pathway, in mESC derivation from single blastomeres and blastocysts, used as positive control. We found that only blastomeres isolated from embryos from permissive strains cultured in KSR-supplemented medium and 2i allowed moderately high derivation efficiencies (25%). In addition, blastomeres were found to have higher requirements than whole blastocysts to derive mESC lines.

According to these results, second, we extensively analyzed the effect of Wnt and MAPK pathways in mESC derivation from isolated blastomeres and the features of mESC lines established under the different pathway modulations. We found that the activity of Wnt pathway was determinant to derive mESC lines from single blastomeres. Moreover, we found that derivation efficiencies increased when modulators were combined, achieving the best derivation rates with the 2i-treated blastomeres. Wnt activation resulted in cells displaying features of naïve pluripotency. Whereas Wnt inhibition, combined with other modulators, resulted in a reduction of transcription of Wnt-target genes and cells displaying features of primed pluripotency.

All in all, our results reveal that embryo's genetic background, medium supplements and, especially, signaling pathways determine the derivation efficiency and the features of the mESC lines established from isolated blastomeres, and that these variables differently affect mESC established from whole blastocysts and isolated blastomeres.

ABREVIATURES I ACRÒNIMS

ZI	<i>2-inhibitors composed by CHIR99021 and PD0325901</i> ; Combinació d'inhibidors composta de CHIR99021 i PD0325901
ACTH	<i>Adrenocorticotropic Hormone</i> ; Hormona proteica adrenocorticòtropla
ALP	<i>Alkaline Phosphatase</i> ; Fosfatasa alcalina
APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
BMP	<i>Bone Morphogenetic Proteins</i> ; Proteïnes morfogèniques de l'os
DIA	<i>Differentiation Inhibitory Activity</i> ; Polipèptid inhibidor de l'activitat diferenciadora
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNMT	<i>DNA methyltransferase</i> ; DNA metil-transferases
ECC	<i>Embryonal Carcinoma Cells</i> ; Cèl·lules mare tumorals
EGC	<i>Embryonic Germ Cells</i> ; Cèl·lules mare germinals
EpiSC	<i>Epiblast-derived Stem Cells</i> ; Cèl·lules mare de l'epiblast
ERK	<i>Extracellular signal-Regulated Kinases</i> ; Quinases reguladores del senyal extracel·lular
ESC	<i>Embryonic Stem Cells</i> ; Cèl·lules mare embrionàries
ESRRB	<i>Estrogen-Related Receptor β</i> ; Receptor β relacionat amb l'estrogen
FCS	<i>Fetal Calf Serum or Fetal Bovine Serum</i> ; Sèrum fetal boví
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i> ; Factor de creixement de fibroblasts
FZD	<i>Frizzeld</i>
GEF	<i>Guanine Exchange Factor</i> ; Factor d'intercanvi del nucleòtid de guanina
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i> ; Proteïna fluorescent verda
GDP	<i>Guanin DiPhosphate</i> ; Guanina difosfat
GTP	<i>Guanin TriPhosphate</i> ; Guanina trifosfat
GSC	<i>Germ Stem Cells</i> ; Cèl·lules mare germinals
GSK3	<i>Glycogen synthetase kinase 3</i> ; Quinasa de la glicogen sintetasa 3
hESC	<i>human Embryonic Stem Cells</i> ; Cèl·lules mare embrionàries humanes
HFF	<i>Human Foreskin Fibroblasts</i> ; Fibroblasts de prepuci humà
ICM	<i>Inner Cell Mass</i> ; Massa cel·lular interna
iPSC	<i>induced Pluripotent Stem Cells</i> ; Cèl·lules mare de pluripotència induïda
KSR	<i>KnockOut Serum Replacement</i> ; Substitutiú del sèrum <i>KnockOut</i>
LEF	<i>Lymphocyte Enhancer Binding Factor</i> ; Factor potenciador de limfòcits

LIF	<i>Leukemia Inhibitory Factor</i> ; Factor Inhibidor de la leucèmia
LRP	<i>Low Density Lipoprotein Receptor</i> ; Receptor de la lipoproteïna de baixa densitat
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i> ; Proteïnes quinasa activades per mitògens
MEF	<i>Mouse Embryonic Fibroblasts</i> ; Fibroblasts embrionaris de ratolí
mESC	<i>mouse Embryonic Stem Cells</i> ; Cèl·lules mare embrionàries de ratolí
MSC	<i>Mesenchymal Stem Cells</i> ; Cèl·lules mare mesenquimatoses
NT-ESC	<i>Nuclear Transfer – Embryonic Stem Cells</i> ; Cèl·lules mare embrionàries obtingudes per transferència nuclear
OSKM	OCT4, SOX2, KLF4 and C-MYC
PE	<i>Primitive endoderm</i> ; Endoderma Primitiu
PGC	<i>Primordial Germ Cells</i> ; Cèl·lules primordials germinals
PGD	<i>Preimplantation Genetic Diagnosis</i> ; Diagnòstic Genètic Preimplantacional
SC	<i>Stem Cells</i> ; Cèl·lules mare
TCF	<i>T Cell Factor</i> ; Factor de les cèl·lules T
TE	<i>Trophectoderm</i> ; Trofectorma
TF	<i>Transcription Factor</i> ; Factors de transcripció
TGF	<i>Transforming Growth Factors</i> ; Factors transformadors del creixement
TSC	<i>Trophoblast Stem Cells</i> ; Cèl·lules mare del trofoblast

1. CÈL·LULES MARE: DEFINICIÓ I CARACTERÍSTIQUES

GENERALS

Les cèl·lules mare (SCs) són cèl·lules úniques degut a les seves propietats: la capacitat de renovar-se indefinidament i la pluripotència, que sota determinats estímuls externs, els permet diferenciar-se i donar lloc a qualsevol teixit derivat de les tres làmines embrionàries (ectoderma, mesoderma i endoderma) (*Biswas and Hutchins, 2007*).

Degut a aquestes característiques, les SCs representen una eina clau per a la recerca dels mecanismes implicats en el manteniment de la pluripotència així com en el procés de diferenciació cel·lular. D'altra banda, ofereixen la possibilitat de desenvolupar un seguit de noves teràpies basades en la regeneració dels teixits, que formen part del camp de medicina regenerativa.

1.1 POTENCIAL DE DIFERENCIACIÓ DE LES CÈL·LULES MARE

Es coneix com a potencial de diferenciació la capacitat que tenen les SCs de donar lloc a una major o menor quantitat de teixits especialitzats. Aquesta capacitat ve determinada per l'origen de les SCs. Així doncs, distingim diferents tipus de SCs segons el seu origen i potencial de diferenciació.

1.1.1 CÈL·LULES TOTIPOTENTS

Anomenem cèl·lules totipotents a aquelles que poden desenvolupar un organisme complet i donar lloc a qualsevol cèl·lula especialitzada, incloent les cèl·lules que donaran lloc als teixits extraembrionaris (*Condic, 2014*).

Durant el desenvolupament preimplantacional les cèl·lules de l'embrió es segreguen, inicialment, en dos llinatges cel·lulars. D'una banda es forma el trofocoderm (TE), un epiteli polaritzat que envolta l'embrió i que durant la gestació donarà lloc a la major part dels teixits extraembrionaris. D'altra banda, la població de cèl·lules que queda envoltada pel TE dona lloc a la massa cel·lular interna (ICM), que originarà totes les cèl·lules que formaran part de l'organisme i algunes estructures externes com ara el sac vitel·lí i el sac amniòtic.

Apunt 1: Segregació dels llinatges cel·lulars per a la formació del blastocist

Es coneix que fins a l'estadi de 8 cèl·lules no es comença a determinar el destí dels blastòmers a l'embrió i que aquest es determina en funció de la posició que ocupen els blastòmers i les unions que estableixen entre ells. Les cèl·lules de l'embrió es segreguen en dues poblacions cel·lulars determinades per la posició interna o externa i l'expressió excloent de *Cdx2* (donant lloc a les cèl·lules del TE) o *Oct4* (donant lloc a la ICM). Aquestes dues poblacions es mantenen durant poc temps, ja que ben aviat les cèl·lules de la ICM experimentaran una nova segregació. En aquest cas, la distinció està dirigida per l'expressió de *Nanog* i *Sall4*. Les cèl·lules que expressin aquests gens donaran lloc a l'epiblast i es mantindran pluripotents. En canvi, l'expressió de *Gata6* conduirà a la formació de l'endoderma primitiu. L'expressió dels marcadors juntament amb les unions intercel·lulars i l'apoptosi selectiva de certes cèl·lules donarà lloc a aquesta segona onada de segregació (Chazaud et al., 2006; Arnold and Robertson, 2009; Rossant and Tam, 2009) (Figura 1).

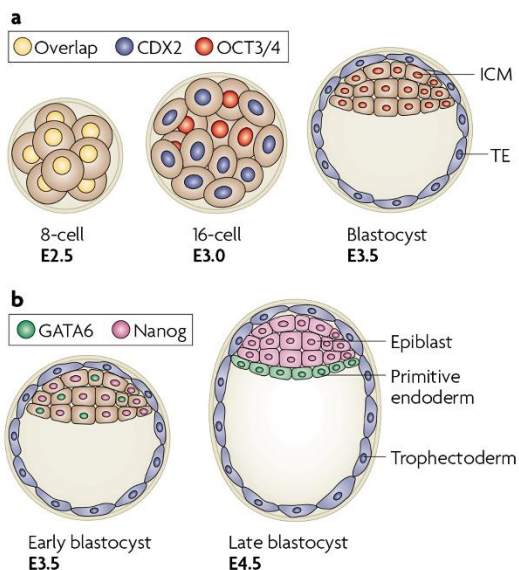


Figura 1 Esquema de l'expressió de proteïnes determinants dels diferents llinatges cel·lulars durant el desenvolupament embrionari preimplantacional. Reproduït amb el permís de Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Molecular Cell Biology, (Arnold and Robertson) copyright (2009).

Per aquest motiu, tan sols els embrions en estadis anteriors a les vuit cèl·lules, on es comencen a diferenciar els llinatges cel·lulars que donaran lloc al TE i la ICM (Arnold and Robertson, 2009; Rossant and Tam, 2009), es consideren totipotents (Condic, 2014).

1.1.2 CÈL·LULES PLURIPOTENTS

Les cèl·lules pluripotents són aquelles que tenen la capacitat de donar lloc a tots els teixits derivats de les tres làmines embrionàries, però no tenen la capacitat d'originar els teixits extraembrionaris (Weinberger *et al.*, 2016). Tenint en compte el seu origen, podem distingir diferents tipologies de cèl·lules pluripotents (Figura 2).

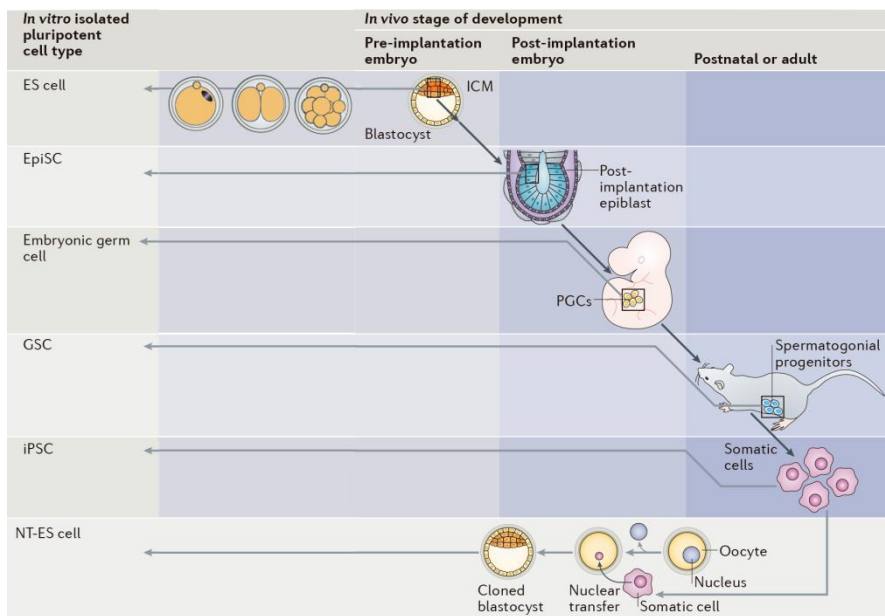


Figura 2 Esquema de les diferents tipologies de cèl·lules pluripotents segons el seu origen. Imatge adaptada amb el permís de Macmillan Publishers Ltd: *Nature Molecular Cell Biology*, Weinberger *et al.*, copyright (2016).

1.1.2.1 Cèl·lules mare embrionàries

Les cèl·lules mare embrionàries (ESCs) són aquelles SCs derivades de la ICM d'un embrió a estadi de blastocist (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981) o bé derivades d'embrions en estadis previs del desenvolupament preimplantacional (Eistetter, 1989; Tesar, 2005). Les ESCs es caracteritzen per la seva capacitat de mantenir-se indefinidament en cultiu, així com per la capacitat de reprendre el desenvolupament embrionari quan són reincorporades a un embrió (Martello and Smith, 2014) mitjançant l'agregació a embrions preimplantacionals o la injecció a un blastocist, contribuint a la formació d'organismes quimèrics. D'altra banda,

quan s'injecten directament a individus adults, les ESCs són capaces de formar teratomes.

A més, les ESCs també es caracteritzen per no compensar la dosi gènica inactivant un dels dos cromosomes X en les línies femenines (*Keohane et al., 1996*), i per compartir les característiques epigenètiques de l'epiblast de l'embrió preimplantacional (*Nichols and Smith, 2009*).

Des que es van derivar per primera vegada l'any 1981 a partir de blastocists de ratolí, s'ha aconseguit establir línies d'ESCs de moltes altres espècies com ara: primats no humans (*Thomson et al., 1995, 1996; Suemori et al., 2001*), humans (*Thomson et al., 1998; Ware et al., 2014*), rata (*Buehr et al., 2008; Li et al., 2008*), porc (*Park et al., 2013*) o peix zebra (*Ho et al., 2014*) entre d'altres.

Malgrat que les condicions de cultiu requerides per les ESCs varien segons l'espècie, inicialment en la derivació de ESCs de ratolí es van utilitzar cèl·lules nodridores (*feeder cells*) i el medi es va suplementar amb sèrums bovins i el factor inhibidor de la leucèmia (LIF) (*Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981*).

1.1.2.2 Cèl·lules mare de l'epiblast

Un altre tipus de cèl·lules pluripotents són les cèl·lules mare de l'epiblast (EpiSCs). Aquestes cèl·lules deriven de l'epiblast de l'embrió postimplantacional, i requereixen la presència de cèl·lules nodridores, factor de creixement de fibroblasts (FGF) i activina per mantenir-se en cultiu. A més a més, les EpiSCs es caracteritzen per presentar marcadors de l'epiblast com ara el FGF5, CER1, EOMES, SOX17 o T (*Brons et al., 2007; Joo et al., 2014*). Com que provenen d'un embrió més avançat en el desenvolupament que les ESCs, presenten una baixa, sinó nul·la, habilitat de contribuir a la formació d'animals quimèrics si bé que mantenen la capacitat de formar teratomes quan s'injecten a individus adults (*Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007*). És per això que es considera que les EpiSCs tenen una pluripotència *primed*, concepte que es discutirà més endavant (pàg. 17).

1.1.2.3 Cèl·lules embrionàries germinals

Les cèl·lules embrionàries germinals (EGCs) també són cèl·lules pluripotents. Durant el desenvolupament embrionari l'epiblast de l'embrió postimplantacional

dona lloc a les PGCs gràcies a un procés que implica, entre d'altres, l'eliminació de les marques epigenètiques que les cèl·lules de l'epiblast havien adquirit (*Hayashi and Surani, 2009*). Quan les PGCs es cultiven en presència de FGF i LIF donen lloc a les EGCs, que igual que les ESCs són pluripotents, tenen la capacitat de diferenciar-se a teixits de les tres làmines embrionàries i contribueixen a la formació d'animals quimèrics (*Matsui et al., 1992; Resnick et al., 1992*).

1.1.2.4 Cèl·lules mare germinals

També es poden establir línies de cèl·lules pluripotents a partir de les cèl·lules germinals del teixit testicular de ratolins acabats de néixer, o bé d'estadis fetals en el cas dels humans. Per a desenvolupar-se, aquestes SCs anomenades cèl·lules mare germinals (GSCs), requereixen la presència de LIF, FGF, factor de creixement de l'epidermis i factor neutròfic derivat de cèl·lules gials (*Shamblott et al., 1998; Kanatsu-Shinohara et al., 2004*).

A banda de les cèl·lules pluripotents establertes a partir d'embrions o teixits embrionaris i fetals, existeixen altres tipologies de cèl·lules pluripotents generades a partir de la reprogramació nuclear de cèl·lules adultes.

1.1.2.5 Cèl·lules mare embrionàries obtingudes per transferència nuclear

Es poden produir cèl·lules pluripotents a partir d'embrions obtinguts mitjançant la transferència del nucli d'una cèl·lula somàtica a un oòcit enucleat receptor, utilitzant la tècnica desenvolupada pel clonatge de mamífers (*Campbell et al., 1996; Wilmut et al., 1997; Wakayama et al., 1998*). El nucli donador inserit a l'oòcit enucleat es modifica gràcies als factors reprogramadors que conté el citoplasma de l'oòcit, recuperant l'estat de totipotència. Així doncs, dels embrions reconstruïts que reprenen el desenvolupament embrionari se'n poden derivar ESCs obtingudes per transferència nuclear (NT-ESCs), que donaran lloc a línies de cèl·lules pluripotents.

1.1.2.6 Cèl·lules mare de pluripotència induïda

Les cèl·lules mare de pluripotència induïda (iPSCs) es van aconseguir inicialment en reprogramar cèl·lules adultes (fibroblasts) mitjançant la sobreexpressió de

quatre factors de transcripció (TFs): OCT4, SOX2, KLF4 i C-MYC (OSKM). Les iPSCs tenen la capacitat de diferenciar-se a llinatges cel·lulars de les tres làmines embrionàries, formar teratomes quan s'injecten a individus adults i contribuir a la formació d'embrions quimèrics (*Takahashi and Yamanaka, 2006; Takahashi et al., 2007*). Malgrat tot, l'eficiència de reprogramació de les iPSCs és molt baixa, degut a que s'han d'assolir múltiples etapes per a completar el procés de reprogramació, que culmina silenciant els gens específics de cada teixit, metilant-ne els promotors (*Takahashi and Yamanaka, 2016*), i activant l'expressió dels gens de pluripotència endògens.

Durant els últims deu anys, s'han emprat diferents estratègies per a obtenir iPSCs i s'ha optimitzat el procés de reprogramació per tal d'evitar, sobretot, l'ús de l'oncogen *c-Myc*. D'una banda, s'han utilitzat diferents combinacions de TFs. Per exemple, s'ha aconseguit reprogramar iPSCs utilitzant únicament els TFs OCT4 i KLF4, cultivant les iPSCs en un medi en presència del còctel 2i (*Silva et al., 2008*). D'altra banda, s'han utilitzat molècules *downstream* dels TFs OSKM i modificadors epigenètics, per tal de millorar l'eficiència del procés en absència de l'oncogen *c-Myc* (*Takahashi and Yamanaka, 2016*). A més a més, s'han estudiat vies de control del cicle cel·lular i de regulació de la senescència, i s'ha descrit que la reducció o inhibició de la proteïna p53 permet reprogramar iPSCs sense la presència de C-MYC i millora l'eficiència de reprogramació de les iPSCs humanes (*Hong et al., 2009; Kawamura et al., 2009*). Estudiant les vies de senyalització implicades en el procés de reprogramació, s'ha descrit que una activació constitutiva de la via de JAK/STAT3 o la inhibició de la via de les quinases activades per mitògens (MAPK) ajuda a que es doni una reprogramació completa (*van Oosten et al., 2012*). Atès que l'ús de retrovirus pot afectar als gens propers al punt d'inserció d'OSKM (*Takahashi and Yamanaka, 2016*), s'han reprogramat iPSCs utilitzant altres estratègies no integratives com ara l'ús de vectors adenovirals (*Zhou and Freed, 2009*), el virus Sendai (*Fusaki et al., 2009*), proteïnes recombinants (*Kim et al., 2009*), DNA plasmídic (*Si-tayeb et al., 2010*) o RNA missatger (*Yakubov et al., 2010*). Malgrat totes aquestes millores, encara és difícil aconseguir una reprogramació total de les iPSCs (*Takahashi and Yamanaka, 2016*).

1.1.3 CÈL·LULES MULTIPOTENTS

Anomenem cèl·lules multipotents aquelles que poden donar lloc a determinats tipus cel·lulars del seu llinatge en funció de factors ambientals que en determinen la divisió o la diferenciació.

Les SCs adultes en són un exemple. Són cèl·lules que resideixen en els òrgans i teixits dels individus durant el seu desenvolupament post-natal i la vida adulta i proporcionen noves cèl·lules per a mantenir i reparar determinats teixits, com ara el moll de l'os o la sang (*Young and Black, 2004*).

Dins les cèl·lules multipotents també hi trobem les cèl·lules mare trofoblàstiques (TSCs), que deriven del TE del blastocist i es poden mantenir indiferenciades quan es cultiven en presència de cèl·lules nodradores, FGF4 i heparina. Les TSCs poden donar lloc a qualsevol teixit extraembrionari derivat del TE i participen en la formació dels teixits extraembrionaris d'embrions quimèrics quan són injectades al blastocist o bé s'agreguen a embrions tetraploides (*Tanaka et al., 1998*).

1.2 L'ESTAT DE PLURIPOTÈNCIA

La pluripotència la podem trobar en dos estats diferents segons les característiques de les cèl·lules i la seva capacitat de diferenciar-se. La pertinença a un dels dos estats depèn fonamentalment de l'origen embrionari i les condicions de cultiu. Aquests dos estats de pluripotència s'anomenen *naïve* i *primed*.

1.2.1 PLURIPOTÈNCIA *Naïve*

Les cèl·lules de pluripotència *naïve* es troben en un estat basal en el que es mantenen pluripotents independentment dels senyals o estímuls externs. Les cèl·lules en estat basal no estan predisposades a diferenciar-se en un llinatge específic de cèl·lules somàtiques o germinals (*Silva and Smith, 2008; Hackett and Surani, 2014*), i són capaces de contribuir a la formació d'animals quimèrics amb elevada eficiència i colonitzar la línia germinal (*Nichols and Smith, 2009*).

Les cèl·lules de l'epiblast de l'embrió preimplantacional presenten un estat basal que abandonen a mesura que progressa el desenvolupament embrionari (*Davidson et al., 2015*). Aquest estat és equivalent a l'estat de pluripotència *naïve* de les cèl·lules mare embrionàries (ESCs). En termes generals, les ESCs de ratolí

es troben en aquest estat de pluripotència *naïve*, mentre que en altres espècies podem induir l'estat basal de les SCs (ESCs o iPSCs) inhibint la senyalització de la via de les MAPK o cultivant les SCs en presència de 2i (*Silva and Smith, 2008*), condició que es detallarà més endavant (pàg. 50).

1.2.2 PLURIPOTÈNCIA *PRIMED*

Les EpiSCs que expressen alguns gens específics de llinatge atès que provenen d'un estadi del desenvolupament embrionari més avançat, com és l'epiblast de l'embrió postimplantacional (*Davidson et al., 2015*). Aquestes cèl·lules estan predisposades a diferenciar-se (*Martello and Smith, 2014*) i tenen una pluripotència que anomenem *primed*.

1.2.3 CARACTERÍSTIQUES DIFERENCIALS

Malgrat que els dos estats de pluripotència, *naïve* i *primed*, estan regulats per les mateixes vies de senyalització, el patró d'activació/inhibició d'aquestes és pràcticament oposat. Per exemple, les cèl·lules de pluripotència *naïve* requereixen una disminució del senyal de la via de les MAPK per mantenir-se pluripotents, contràriament tendeixen a diferenciar-se. En canvi, les cèl·lules de pluripotència *primed* activen la via de les MAPK a través de FGF2 per a mantenir la pluripotència (*Figura 3*).

A més a més, les cèl·lules *naïve* requereixen l'expressió dels gens *Oct4*, *Sox2*, *Nanog*, receptor β relacionat amb l'estrogen (*Esrrb*), *Klf2*, *Klf4*, *Stella*, *Tbx3*, etc., per mantenir-se pluripotents. Curiosament, la majoria dels gens esmentats codifiquen per TFs que actuen *downstream* de LIF, suggerint que la via de JAK/STAT3 té un paper central en el manteniment de la pluripotència *naïve* (*Ohtsuka et al., 2015*). Les cèl·lules *primed*, en canvi, tan sols requereixen l'expressió dels gens *Oct4*, *Sox2* i altres gens específics de llinatge com *Otx2*, *Zic2* i *Cd24* (*Martello and Smith, 2014; Weinberger et al., 2016*).

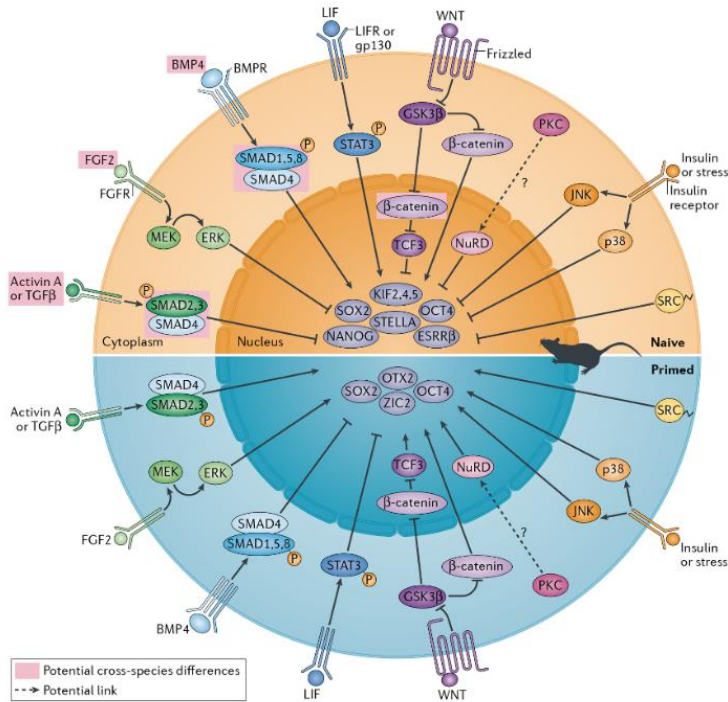


Figura 3 Esquema de les vies de senyalització que intervenen en el manteniment de la pluripotència *naïve* i *primed*. Reproduït amb el permís de Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Molecular Cell Biology, (Weinberger *et al.*), copyright (2016).

També podem distingir els dos tipus de pluripotència pel patró de metilació del DNA. Les cèl·lules de pluripotència *naïve* es caracteritzen per presentar un DNA molt poc metilat en el que s'han esborrat les marques de regulació epigenètica, equivalent al patró de metilació de les cèl·lules de l'ICM (Silva and Smith, 2008; Ficiz *et al.*, 2013; Leitch *et al.*, 2013). Es coneix que aquesta manca de marques epigenètiques es deu a una regulació decreixent de les DNA metil-transferases (DNMT) 3a i 3b, que metilen el DNA *de novo*, quan les SCs es cultiven en 2i (pàg. 50) (Leitch *et al.*, 2013). Concretament, l'inhibidor de MEK provoca un augment de la concentració de la desmetilasa d'histones JMJD2C. Aquesta proteïna, a banda d'actuar sobre les histones, també indueix una desmetilació del DNA a través de la disminució de la transcripció dels gens de les *DNMT3a* i *b* i un augment del nivell de la deoxigenasa TET1 (Sim *et al.*, 2017). A la vegada, l'inhibidor de la GSK3 provoca un augment de la proteïna PRDM14 que, mitjançant la metiltransferasa d'histones G9A, propicia la ubiquitinització de les DNMT3, conduint a la seva degradació (Sim *et al.*, 2017). A més a més, s'ha descrit que

també es dona un mal funcionament de la maquinaria de manteniment de la metilació, degut a la disminució dels nivells del senyal de doble metilació de la histona 3 (H3K9me2). Concretament, la H3K9me2 actua com a punt d'unió de la proteïna UHRF1, que a la vegada recluta la DNMT1 a la forca de replicació per a poder mantenir els nivells de metilació quan es sintetitza nou DNA (Meyenn et al., 2016). Així doncs, la disminució de les DNMT *de novo* juntament amb un mal funcionament de la maquinaria de manteniment de la metilació causa una disminució global de la metilació en el DNA de les cèl·lules de pluripotència *naïve*.

En els canvis en el patró de metilació entre les cèl·lules de pluripotència *naïve* i *primed* també hi participen els moduladors de les histones. Concretament, es coneix que la simple inhibició de la metiltransferasa de la H3K4, MLL1, es capaç de reprogramar les EpiSCs de ratolí a cèl·lules de pluripotència *naïve* (Zhang et al., 2016).

Un altre indicador que diferencia els dos estats de pluripotència és la inactivació d'una còpia del cromosoma X en les línies femenines. Les SCs de pluripotència *naïve* mantenen les dues còpies del cromosoma X actives, mentre que les SCs de pluripotència *primed* n'inactiven una còpia (Silva and Smith, 2008; Hackett and Surani, 2014).

Finalment, es pot utilitzar l'activitat enzimàtica de la fosfatasa alcalina (ALP) per a distingir les cèl·lules de pluripotència *naïve*, que presenten una activitat enzimàtica més elevada, de les cèl·lules de pluripotència *primed* (Brons et al., 2007; ten Berge et al., 2011; Zhang et al., 2016; Sim et al., 2017).

Totes aquestes diferències entre la pluripotència *naïve* i *primed* tan sols s'han pogut estudiar en ratolí, ja que les hESCs, tot i derivar de l'epiblast de l'embrió preimplantacional, presenten uns requeriments de cultiu, una morfologia de les colònies, una regulació epigenètica i un patró d'expressió de gens similar als de la pluripotència *primed* (Thomson et al., 1998; Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007). Aquesta similitud entre les hESCs i les EpiSCs de ratolí coincideix amb diferències en el patró de desenvolupament de l'epiblast entre les dues espècies que podrien estar-hi relacionades. Concretament, la majoria d'espècies (inclosa la humana) formen un epiblast d'estructura discoïdal, mentre que les rates i ratolins formen un epiblast d'estructura cilíndrica que comporta mort cel·lular per apoptosi de les cèl·lules de la part interna de l'epiblast (Nichols and Smith, 2009).

2. APLICACIONS DE LES CÈL·LULES MARE

Degut a les seves característiques, les SCs poden ser eines molt útils per a realitzar estudis de modelització de malalties, enginyeria de teixits, desenvolupament de fàrmacs i teràpia cel·lular i medicina regenerativa (*Avior et al., 2016; Weinberger et al., 2016*).

L'ús de models animals per a l'estudi de malalties ha estat de gran utilitat durant anys, però les diferències existents entre espècies fa que treballar amb cèl·lules humanes, encara que sigui en sistemes in vitro, presenti certs avantatges.

En els estudis de modelització de malalties, les SCs són portadores de l'anomalia que és objecte d'estudi. Per això, es poden utilitzar ESCs derivades d'embrions portadors de malalties monogèniques o desordres genòmics que hagin estat descartats de cicles de reproducció després de practicar-los un diagnòstic genètic preimplantacional (PGD) o un *screening* genètic preimplantacional (*Mateizel et al., 2006; Eiges et al., 2007; Biancotti et al., 2010*). Les ESCs són l'equivalent in vitro de l'embrió i són especialment útils per a estudiar malalties d'aparició primerenca i malalties que afecten l'embriogènesi arribant a ser letals. A més, si es força el seu envelliment in vitro, les ESCs també serveixen com a model d'estudi de malalties vinculades a l'envelliment, com ara les malalties neurodegeneratives.

Alternativament, es poden reprogramar cèl·lules somàtiques de pacients diagnosticats de malalties com ara el Parkinson, la malaltia de Huntington, la diabetis melitus o el síndrome de Down, entre d'altres, per tal d'obtenir línies de SCs afectades que es puguin utilitzar com a model (*Park et al., 2008*). Les iPSCs són especialment útils per a estudiar malalties d'aparició tardana ja que es poden correspondre a cèl·lules adultes o envellides. A més, l'ús de les iPSCs permet detectar anomalies secundàries desconegudes vinculades a les malalties o bé estudiar algunes malalties de base epigenètica com són les síndromes de Prader-Willi i Angelman (*Chamberlain et al., 2010; Yang et al., 2010*).

També es poden generar línies de NT-ESCs a partir d'una cèl·lula somàtica de pacients portadors d'una malaltia o bé, utilitzant mecanismes d'edició gènica, es poden modificar línies sanes de SCs per tal d'introduir-los una anomalia genètica causant d'una malaltia (*Avior et al., 2016*).

Malgrat les possibilitats que ofereixen les SCs, els estudis estan limitats pel fet que es treballa amb un únic tipus cel·lular que, a més a més, està cultivat en dues

dimensions. Per això el desenvolupament del cultiu tridimensional originant organoids ha suposat un gran avenç en el camp de l'enginyeria de teixits. Els organoids són estructures formades per diferents tipus cel·lulars que tenen la capacitat d'organitzar-se tridimensionalment segregant els diferents tipus cel·lulars que en formen part i que poden realitzar algunes de les funcions que realitzen els òrgans in vivo (Figura 4). Des de l'any 2009 s'han aconseguit diferenciar organoids intestinals, de ronyó, cerebrals i retinals, així com algunes estructures hepàtiques a partir de cèl·lules pluripotents humanes. Amb cèl·lules pluripotents de ratolí també s'han diferenciat organoids de fetge, tiroides, pàncreas, pulmó, pell, pituïtària i estructures òtiques (Lancaster and Knoblich, 2014).

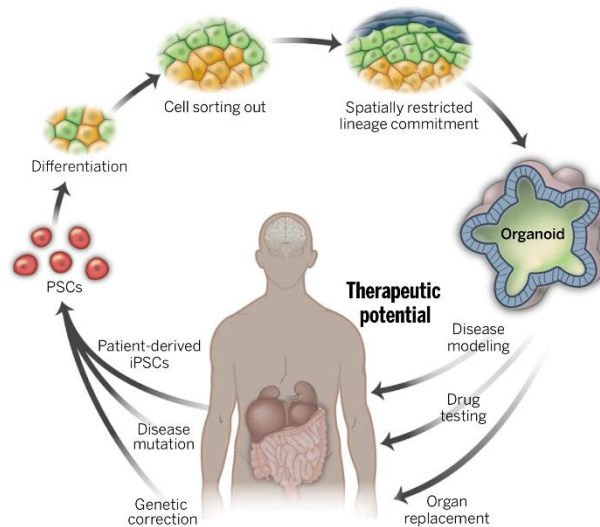


Figura 4 Esquema de la formació dels organoids i les seves possibles aplicacions. De Lancaster and Knoblich, 2014. Reproduït amb el permís de l'AAAS.

Els organoids són especialment útils per a representar models que no han pogut ser reproduïts a partir de cèl·lules pluripotents, com ara el fetge. També permeten estudiar la degeneració dels teixits, malgrat que el seu envelliment in vitro encara no està optimitzat, per la manca d'estructures vasculares (Lancaster and Knoblich, 2014).

Tots aquests models in vitro permeten avançar en el desenvolupament de fàrmacs i teràpia cel·lular ja que ajuden a conèixer l'etiologia de les malalties estudiades, descobrir i testar nous fàrmacs específics per a combatre-les o bé investigar sobre la medicina personalitzada (Avior et al., 2016).

Pel que fa a la medicina regenerativa i les aplicacions clíniques de les SCs, actualment s'estan realitzant estudis amb SCs adultes extretes de la medul·la òssia, SCs hematopoètiques i cèl·lules mare mesenquimatoses (MSCs) amb les que s'han realitzat autotrasplantaments o trasplantaments al·logènics sense presència de complicacions clíniques (*Trounson and DeWitt, 2016*). Amb tot, es coneix que les MSCs sobreviuen durant un període curt de temps un cop són trasplantades, cosa que qüestiona el mecanisme d'actuació de les MSCs i l'eficiència del tractament (*Eggenhofer et al., 2014*).

D'altra banda, l'ús de cèl·lules pluripotents s'ha començat a aplicar en estudis clínics ja que aquestes cèl·lules es poden expandir indefinidament i es poden diferenciar donant lloc a qualsevol tipus cel·lular del cos. Malgrat que s'han realitzat estudis clínics utilitzant ESCs i iPSCs, aquestes últimes tan sols s'han pogut utilitzar en un cas per a tractar la degeneració macular d'un pacient, ja que les iPSCs cultivades van presentar múltiples mutacions *de novo* abans de poder trasplantar-les a un segon pacient (*Trounson and DeWitt, 2016*). Utilitzant ESCs s'han realitzat estudis clínics en fase I i II per a tractar la pèrdua de visió deguda a la degeneració macular, el Parkinson, lesions medul·lars, diabetis tipus I i les lesions produïdes per un infart de miocardi (*Trounson and DeWitt, 2016*).

3. CÈL·LULES MARE EMBRIONÀRIES DE RATOLÍ

Ja que la present tesi doctoral es basa en la derivació i el cultiu de les mESCs, a partir d'ara ens centrarem en les característiques intrínseques i els requeriments de cultiu d'aquestes cèl·lules.

Les mESCs van ser descobertes després d'observar que les cèl·lules indiferenciades que formaven part dels teratocarcinomes, quan s'aïllaven, mantien la capacitat de donar lloc a tumors formats per múltiples tipus cel·lulars diferenciats. Aquestes cèl·lules, anomenades cèl·lules mare de carcinoma embrionari (ECCs), són semblants a les cèl·lules de la ICM de l'embrió i es mantenen pluripotents quan es cultiven en presència de cèl·lules nodridores (*Martin and Evans, 1976*). La similitud entre les ECCs i les cèl·lules de l'embrió preimplantacional és tal que quan les ECCs s'incorporen a embrions a estadi de 8 cèl·lules, participen en la formació de la ICM del blastocist i els subsegüents individus adults (*Papayioannou et al., 1975; Fujii and Martin, 1980*). Les ECCs tenen la capacitat de diferenciar-se en múltiples tipus cel·lulars donant lloc a cossos

embrioides in vitro o a teratomes in vivo. A més, les ECCs, a diferència d'altres cèl·lules tumorals, mantenen un cariotip estable (*Kleinsmith and Pierce, 1964; Martin, 1980*).

Apunt 2: Els teratocarcinomes

Els teratocarcinomes són conjunts de cèl·lules que contenen tant cèl·lules pluripotents com cèl·lules diferenciades de múltiples llinatges com ara pèls, estructures glandulars, múscul llis i cardíac, cartílag, os i teixit adipós. De manera natural, els teratocarcinomes es donen amb elevada freqüència als testicles de ratolí degut a una desorganització i diferenciació de les PGCs. Són especialment freqüents en ratolins de la soca 129S2. Artificialment, es pot induir la formació de teratocarcinomes fent un empelt intraperitoneal d'embrions preimplantacionals o de cèl·lules pluripotents (Stevens, 1970; Martin, 1980).

Aplicant els requeriments pel manteniment de les ECCs en cultiu, l'any 1981 es van establir per primera vegada línies de mESCs a partir d'embrions preimplantacionals. Aquests, es van cultivar en *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementat amb sèrums bovins sobre una monocapa de cèl·lules nodridores formada per fibroblasts de ratolí (STO) inactivats amb mitomicina-C. El creixement dels embrions sobre les cèl·lules nodridores va donar lloc a petits cúmuls de cèl·lules pluripotents que van acabar derivant en les primeres línies de mESCs. Aquestes línies es van poder mantenir pluripotents durant més de trenta passatges en cultiu, mantenint un cariotip estable, i el seu potencial de diferenciació es va testar formant cossos embrioides, quimeres (després d'injectar-les a blastocists) i teratocarcinomes (després d'injectar-les a animals adults). Malgrat tot, l'eficiència del procés de derivació va ser molt baixa (*Martin and Evans, 1976; Martin, 1981*).

Posteriorment s'ha aconseguit incrementar l'eficiència del procés modificant les condicions de cultiu, tal i com s'explicarà més endavant (pàg. 43).

3.1 MANTENIMENT DE LA PLURIPOTÈNCIA NAÏVE

L'eficiència de derivació i el manteniment de les mESCs en cultiu està estretament lligat al manteniment de la pluripotència, estat transitori que es dona de manera natural en les cèl·lules de la ICM dels embrions abans de la implantació i que està determinat per l'acció de certs TFs. El manteniment de l'expressió dels gens d'aquests TFs així com la modulació de les vies de senyalització cel·lulars

permeten allargar la pluripotència indefinidament in vitro. En aquest apartat s'explicaran amb detall quins són els principals TFs i les vies de senyalització implicades en el manteniment de la pluripotència *naïve*.

3.1.1 COMPLEX PROTEIC DE MANTENIMENT DE LA PLURIPOTÈNCIA

Es coneix que hi ha un conjunt de TFs proteics encarregats de mantenir la pluripotència. Malgrat que tots contribueixen a un mateix fi, la seva importància relativa és diferent. A continuació s'explicaran quins són els TFs que formen part del complex de manteniment de la pluripotència i la seva funció específica.

3.1.1.1 OCT4

OCT4 és una proteïna que es troba en el citoplasma de l'oòcit i posteriorment és sintetitzada pel propi embrió a partir dels primers estadis embrionaris. També es troba a la ICM dels embrions preimplantacionals, l'epiblast dels embrions postimplantacionals i les PGCs. A mesura que el desenvolupament embrionari progressa la seva expressió queda restringida a les cèl·lules pluripotents. In vitro *Oct4* s'expressa tant a les mESCs com les EpiSCs i la seva funció de TF es dona a través del domini POU d'unió al DNA. La manca d'expressió d'*Oct4* comporta el desenvolupament in vitro d'un embrió format majoritàriament per cèl·lules del TE i, in vivo, comporta la pèrdua de pluripotència de les SCs i la subsegüent diferenciació. Sorprenentment, la sobreexpressió d'OCT4 també condueix a la diferenciació cel·lular (*Schöler et al., 1990; Nichols et al., 1998; Nichols and Smith, 2009, 2012*). Per tot això, OCT4 es considera el factor de pluripotència primordial i, en conseqüència, la seva expressió està regulada de manera redundante per altres TFs que també participen en el manteniment de la pluripotència com són SOX2, NANOG, KLF4 o TBX3 (*Niwa et al., 2009*).

3.1.1.2 SOX2

SOX2 és un TF de la caixa SRY i és el principal coadjuvant d'OCT4 potenciant la transcripció de gens específics. SOX2 s'uneix al DNA per un domini HMG, diferent al d'OCT4, tot i que sovint actuen formant un complex. Conjuntament, OCT4 i SOX2 regulen l'expressió de gens relacionats amb el manteniment de la

pluripotència com ara *Fgf4*, *Utf1*, *Lefty*, *Nanog* i d'ells mateixos (Ambrosetti et al., 1997; Masui et al., 2007; Martello and Smith, 2014). A més, SOX2 s'encarrega de regular l'expressió de factors reguladors de l'expressió d'*Oct4*. Malgrat tot, SOX2 és prescindible per a regular l'expressió dels gens de pluripotència ja, que OCT4 supleix la seva funció. Però, en canvi, és essencial per a regular l'expressió dels gens reguladors d'*Oct4*. En absència de SOX2, les SCs tendeixen a diferenciar-se majoritàriament a TE (Masui et al., 2007).

3.1.1.3 NANOG

NANOG és una homeoproteïna que apareix de manera tardana durant el desenvolupament embrionari. Es localitza per primera vegada a la mòrula tardana i queda restringida a l'epiblast dels embrions preimplantacionals. La presència de NANOG és determinant per a estructurar correctament la ICM i la subsegüent formació de l'epiblast. Durant la implantació, o qualsevol procés de diferenciació cel·lular, la presència de NANOG disminueix ràpidament. In vitro, NANOG es troba a les ESCs i EGCs tant si es cultiven en presència com en absència de LIF (Chambers et al., 2003; Silva et al., 2009).

La presència de la proteïna NANOG és la que determina que les SCs es trobin en un estat de pluripotència *naïve*, ja que la sobreexpressió de *Nanog* a pre-iPSC o EpiSC permet que les cèl·lules abandonin l'estat de reprogramació incompleta o pluripotència *primed*, respectivament, i presentin els dos cromosomes X actius i siguin capaces de formar animals quimèrics després d'injectar-les a mòrules o blastocists (Silva et al., 2009).

Es coneix que les cèl·lules que expressen nivells elevats de NANOG tenen una major habilitat per a inhibir la seva diferenciació. Aquesta habilitat s'accentua quan s'activa la via de JAK/STAT3, que s'explicarà més endavant (pàg. 28), però tot i això la presència de NANOG sense cap altre TF no és suficient per a mantenir la pluripotència de les SCs (Chambers et al., 2003; Ying et al., 2003b). Tanmateix, els nivells de NANOG fluctuen de manera inherent i estocàstica en les mESCs. Quan les cèl·lules expressen nivells baixos de NANOG poden mantenir la pluripotència tot i que tenen una tendència més gran a explorar la diferenciació expressant gens específics de llinatge, és a dir, es troben en un estat transitori de pluripotència *primed* que poden revertir naturalment. Quan les SCs expressen constitutivament nivells baixos de NANOG o bé se n'inhibeix l'expressió, poden

mantenir pluripotència amb una menor eficiència, ja que disminueix l'expressió de les proteïnes secundàries de manteniment de la pluripotència com KLF4, ESRRB o ZFP42. Una altra mancança que presenten les SCs que no expressen NANOG és que no poden diferenciar-se a PGCs, cosa que concorda amb el paper determinant de NANOG per a reprogramar les cèl·lules a un estat de pluripotència *naïve* (Chambers et al., 2007; Silva et al., 2009; Abranches et al., 2014). L'efecte de la manca de NANOG és sever perquè aquest TF inhibeix la diferenciació a precursors de les tres làmines embrionàries i compensa la manca de les proteïnes secundàries del complex ESRRB, TBX3, TCL1 o DPP4, mantenint elevats els nivells d'OCT4, SOX2 i algunes de les proteïnes esmentades (Ivanova et al., 2006).

3.1.1.4 Proteïnes secundàries del complex de manteniment de la pluripotència

A banda del triplet de manteniment de la pluripotència format per OCT4, SOX2 i NANOG, trobem altres proteïnes implicades en el manteniment de la pluripotència com ara TBX3, ESRRB, KLF2 o KLF4, tot i que el seu efecte no és tant determinant (Ivanova et al., 2006; Nichols and Smith, 2012) (Figura 5).

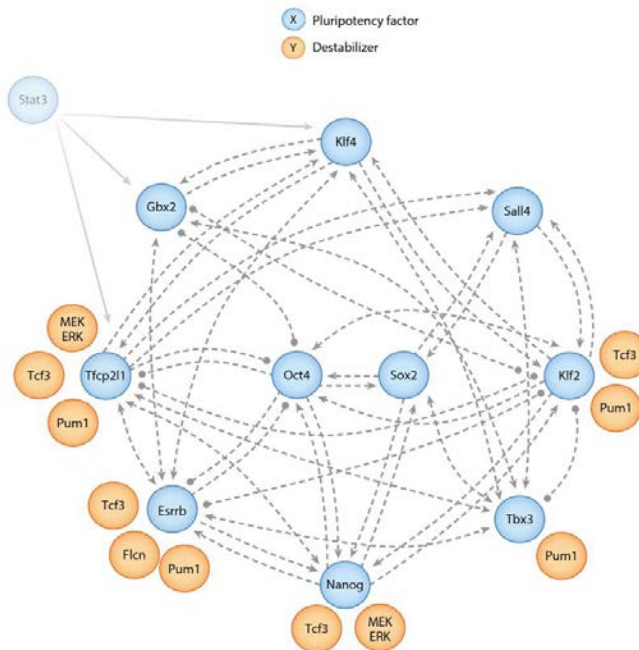


Figura 5 Esquema de les interaccions entre les proteïnes implicades en el complex de manteniment de la pluripotència i els seus moduladors (Martello and Smith, 2014).

ESRRB és una proteïna que interacciona amb OCT4 i NANOG i actua com a factor reprogramador. La seva expressió està regulada per NANOG i actua a la via de Wnt (pàg. 37) *downstream* de TCF3. La sobreexpressió d'*Esrrb* manté la pluripotència de les SCs, fins i tot en absència de NANOG, ja que regula l'expressió de més gens que aquest (Martello et al., 2012; Martello and Smith, 2014). Si manca la de senyalització de Wnt, l'efecte d'ESRRB pot ser compensat per la via de JAK/STAT3 (pàg. 28), ja que ambdues vies regulen positivament la transcripció de KLF4 i TBX3 (Niwa et al., 2009; Martello et al., 2012). La manca d'ESRRB condueix a una pronunciada diferenciació cel·lular determinada per l'augment de FGF5, característic de l'epiblast postimplantacional, i una disminució de REX1, marcador específic de pluripotència molt sensible a la diferenciació cel·lular (Martello et al., 2012).

TBX3, KLF4 i TFCP2L1 són TFs que estan regulats positivament per la presència de LIF al cultiu i la subsegüent activació de les vies *downstream* de GPI30 (Niwa et al., 2009; Martello et al., 2013), tal i com s'explicarà al següent apartat. La sobreexpressió de TBX3 estimula l'autorenovació de les SCs i activa la transcripció de NANOG. KLF4 i TFCP2L1 estan regulats positivament per STAT3 i els dos poden mantenir la pluripotència de les SCs en absència de LIF, malgrat que TFCP2L1 ho fa de manera més eficient perquè és l'últim efector de la via (Niwa et al., 2009; Martello et al., 2013).

Finalment trobem KLF2 que és un TF de la mateixa família que KLF4 però la seva regulació es dona a través de la via de les MAPK i, per tant, la seva sobreexpressió també permet mantenir la pluripotència en absència de LIF (Nichols and Smith, 2012; Yeo et al., 2014).

La majoria de les proteïnes descrites, així com el triplet de manteniment de la pluripotència, tenen mecanismes de regulació negativa per a controlar la seva expressió. D'una banda, aquesta regulació es pot donar entre les pròpies proteïnes de la xarxa però, de l'altra també, es pot donar per altres proteïnes externes implicades en les vies de senyalització com són TCF3, que controla negativament l'expressió d'*Esrrb*, *Tfcp2l1*, *Nanog*, o per les quinases reguladores del senyal extracel·lular (ERK1/2), que fan disminuir la transcripció de *Nanog*, *Klf4* i *Klf2* (Figura 5) (Yi et al., 2008; Kim et al., 2012, 2014; Martello and Smith, 2014; Yeo et al., 2014).

Atès que el manteniment de la pluripotència va molt més enllà de la regulació del triplet principal format per OCT4, SOX2 i NANOG, i que la majoria de proteïnes del complex de manteniment de la pluripotència es regulen de manera recíproca, s'han realitzat estudis de modelització matemàtica per a predir, de la manera més senzilla possible, les interaccions entre les proteïnes del complex de manteniment de la pluripotència i els seus efectes. Estudiant l'expressió dels gens del complex en diferents condicions de cultiu, classificant el patró d'expressió en alt o baix i aplicant un model de xarxa Booleana, s'ha establert un model de predicció de les relacions de regulació entre les proteïnes que s'ha confirmat experimentalment (Figura 5) (Dunn et al., 2014; Martello and Smith, 2014).

3.1.2 VIES DE SENYALITZACIÓ IMPLICADES EN EL MANTENIMENT DE LA PLURIPOTÈNCIA

Les vies de senyalització són les encarregades de regular la presència dels TFs que mantenen la pluripotència, a través de les modulacions de la seva pròpia activitat. En aquest apartat s'explicarà breument el funcionament de les principals vies implicades en el manteniment de la pluripotència.

3.1.2.1 JAK/STAT

La via de JAK/STAT ajuda a mantenir la pluripotència de les mESCs, principalment a través de la proteïna STAT3. Quan s'activa la via per la presència d'un lligand, com ara LIF, els dos receptors de membrana de baixa afinitat, LIFR i GP130, formen un complex juntament amb les quinases JAK, que quan s'autofosforilen, s'activen. Un cop actives, les quinases JAK fosforilen els dominis de tirosina de les proteïnes GP130 i LIFR, permetent que la proteïna STAT3 s'uneixi al domini citoplasmàtic del complex, on serà fosforilada i activada per les proteïnes JAK. STAT3 fosforilada forma un dímer que serà translocat al nucli per tal d'activar la transcripció dels seus gens diana, que estan estretament lligats al manteniment de la pluripotència i són *Oct4*, *Nanog*, *Sox2*, *c-Myc*, *Klf4*, *Gbx2*, *Klf5*, *Pim1*, *Pim3* o *Pramel 7* (Figura 6) (Cartwright et al., 2005; Niwa et al., 2009; van Oosten et al., 2012; Tai et al., 2014; Ohtsuka et al., 2015).

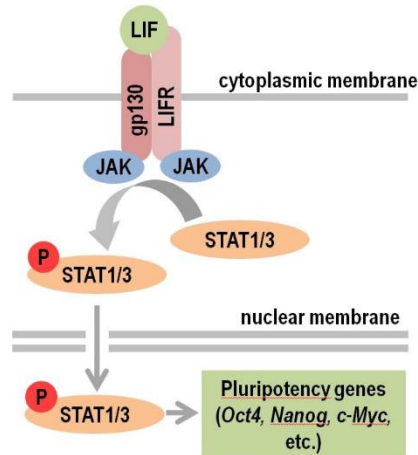


Figura 6 Esquema de la via de JAK/STAT3 activada en presència de LIF (Arabadjiev *et al.*, 2012).

Per a un correcte funcionament, la via de JAK/STAT3 compta amb un mecanisme de regulació per *feedback* negatiu a través de l'expressió del gen *Socs3* (van Oosten *et al.*, 2012; Ohtsuka *et al.*, 2015). Quan aquest mecanisme no funciona, es dona una sobreexpressió de STAT3 que pot promoure el manteniment de la pluripotència o bé, si es supera un cert llindar, pot conduir a una diferenciació cap a TE, augmentant els nivells d'expressió de TFAP2C (Tai *et al.*, 2014), o bé a una diferenciació cap a endoderm (Forrai *et al.*, 2006). A banda de modular la presència de STAT3, la manca de SOCS3 afecta de manera colateral les altres vies de senyalització que depenen del receptor GP130, provocant-ne la seva activació sostinguda (Forrai *et al.*, 2006).

El manteniment de la pluripotència per part de la via de JAK/STAT3 es regula principalment a través de la proteïna GP130 (Ohtsuka *et al.*, 2015). És important remarcar que GP130 és un receptor capaç d'activar també les vies de MAPK i Pi3K, en funció de les proteïnes intermediàries que s'hi associïn. Per a activar les diferents vies, es fosforilen diferents tirosines de GP130 a les que s'hi uneixen proteïnes intermèdies específiques de cada via. Les tirosines en els dominis YXXQ actuen com a punts d'unió de STAT3, i és només l'activació per fosforilació d'aquestes que permet mantenir la pluripotència de les SCs. Tant és així, que en transfectar la forma activa de STAT3 a ESCs, aquestes mantenen la pluripotència sense necessitat d'afegir l'activador de la via (LIF, pàg. 46) al cultiu (Matsuda *et al.*, 1999). Concretament, STAT3 actiu activa la transcripció de *Klf4* que a la

vegada promou la transcripció de *Sox2*, que permetrà mantenir els nivells d'OCT4 per mantenir la pluripotència (Figura 7) (Niwa *et al.*, 2009).

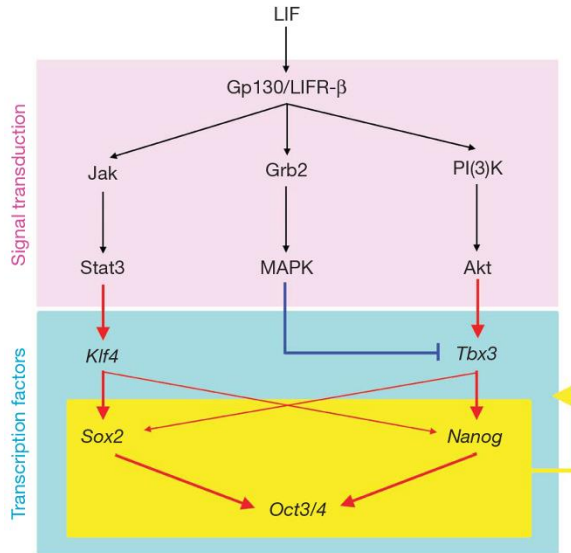


Figura 7 Esquema de la senyalització desencadenada per LIF per a mantenir la pluripotència a través del receptor GP130–LIFR. Reproduït amb el permís de Macmillan Publishers Ltd: Nature, (Niwa *et al.*), copyright (2009).

La via de JAK/STAT3 es pot activar constitutivament si les SCs es transfecten amb el transgen GY118F, que conté una mutació a la tirosina 118 de la proteïna GP130 i impedeix l'activació de les vies de MAPK i PI3K i el mecanisme de regulació negativa a través de *Socs3* (Burdon *et al.*, 1999). En presència d'aquest transgen, les cèl·lules somàtiques poden reprogramar-se a iPSCs sense la necessitat d'afegir altres moduladors al medi, i les EpiSCs adquireixen característiques similars a les de les ESCs sota les mateixes condicions (van Oosten *et al.*, 2012).

Recentment, s'ha descrit que STAT3 no regula directament la pluripotència, sinó que són les proteïnes que s'expressen *downstream* de STAT3 les que se n'encarreguen. STAT3 promou la transcripció de KLF4, PIM1, PRR13, però és TFCP2L1 l'única que pot sostenir un estat pluripotent en absència de l'activador de la via (LIF) o STAT3 (Martello *et al.*, 2013).

A banda d'activar la via de STAT3, l'activació del receptor GP130 activa la via de PI3K. Aquesta via pot ser activada per la presència de LIF, insulina o alguns components del sèrum o els substitutius del sèrum, i ajuda a mantenir la

pluripotència de les SCs mantenint nivells elevats de proteïnes KLF2, KLF4, C-MYC, TBX3, NANOG, ESRB i ZFP42 (Hassani et al., 2014b; Ohtsuka et al., 2015). L'activació de la via de PI3K té múltiples efectors *downstream*, però només ens centrarem en els que permeten mantenir la pluripotència. D'una banda, PI3K, a través de mTOR, ajuda a mantenir la capacitat d'autorenovació de les mESCs (Hassani et al., 2014b). D'altra banda, PI3K, a través d'AKT, fosforila la Serina 9 de GSK3 β i la inactiva. Un cop inactiva, la GSK3 β no pot associar-se a la proteïna FRAT i formar el complex de translocació a nucli (Bechard et al., 2012), de manera que no pot interaccionar ni amb C-MYC ni amb NANOG i no pot fosforilar-los per a inhibir la seva funció o conduir-los a la degradació (Storm et al., 2007; Bechard and Dalton, 2009) (Figura 8).

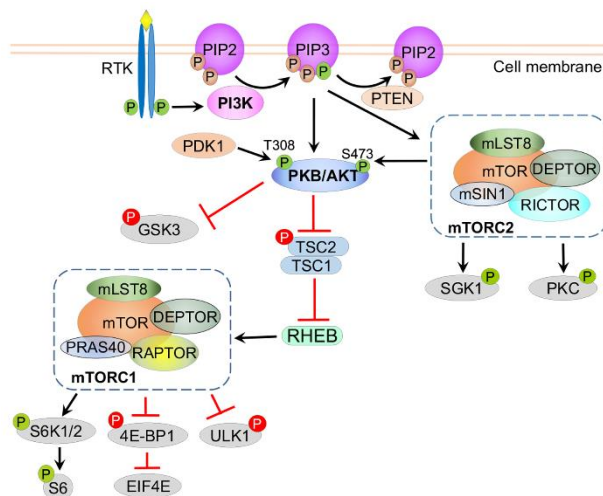


Figura 8 Esquema de la via PI3K/AKT/mTOR i els seus principals efectors *downstream* en el manteniment de la pluripotència (Yu and Cui, 2016).

A més a més, a través de la via de PI3K/Akt s'activa la síntesi de les proteïnes de la família ZSCAN4, que participen en la interacció de proteïnes a través d'un dit de zinc i estan implicades en el manteniment de la pluripotència, actuant possiblement en el punt de control a G2 en el cicle cel·lular (Storm et al., 2009, 2014).

Molt recentment s'ha descrit que l'expressió de la proteïna SINTAXINA 4, que pertany a la família de les SINTAXINES, que són proteïnes que s'enganxen a la membrana i intervien en la fusió de vesícules intracel·lulars, està implicada en la diferenciació cel·lular inhibint la via de PI3K/Akt. Quan la SINTAXINA 4 queda

exposada a la cara externa de la membrana cel·lular de les SCs aboleix l'estat basal de pluripotència de les SCs ja que inactiva la senyalització per la via de PI3K/Akt i comporta una substitució d'E-CADHERINA per P-CADHERINA i la regulació a la baixa de l'expressió dels gens *Zscan4* (Hagiwara-Chatani et al., 2017).

3.1.2.2 MAPK

La via de les MAPK és una de les vies més ben caracteritzades degut a les seves implicacions funcionals en la regulació de l'expressió gènica, el control del cicle cel·lular (fase G1), la formació dels fusos mitòtic i meiótic durant la divisió cel·lular, la reparació de teixits i la migració cel·lular (Molina and Adjei, 2006; Zhao and Adjei, 2014). A més a més, degut a la seva capacitat per estimular l'angiogènesi, la via de les MAPK ha estat molt estudiada en processos tumorals.

La via de RAS/RAF/MAPK s'activa, principalment, quan un lligand s'uneix al receptor del factor de creixement epidèrmic o al receptor del factor de creixement derivat de plaquetes. La unió entre el receptor i el lligand comporta una autofosforilació del receptor, que s'activa i interacciona amb proteïnes adaptadores com ara SHP2 i GRB2 (Figura 9). Aquestes, ajuden al complex a reclutar la proteïna RAS associada a GDP i al factor d'intercanvi del nucleòtid de guanina. Amb l'ajuda d'aquest, que transfereix un grup fosfat, la proteïna RAS passa a estar unida a GTP. Un cop activa, RAS-GTP és capaç d'interaccionar amb diferents proteïnes com ara PI3K, RHO o JNK, però de manera preferent recluta RAF a la membrana cel·lular, on serà fosforilada i activada. RAF activa a MEK1/2, que a la vegada activarà a ERK1/2 (Figura 9) (Molina and Adjei, 2006; Zhao and Adjei, 2014). Les proteïnes ERK1/2, que són les últimes efectores de la via de les MAPK, catalitzen la fosforilació de varis substrats citoplasmàtics i nuclears, regulant així respostes diverses implicades en la divisió mitòtica, l'embriogènesi, la motilitat, la mort cel·lular programada i la diferenciació cel·lular (Zhao and Adjei, 2014).

Concretament, en les mESCs FGF4 és l'estímul principal que activa la via de RAS/RAF/MAPK, que culmina amb un augment d'ERK2. L'activació de la via de les MAPK per part de FGF4 causa un augment de la diferenciació neural de les mESCs, que és inhibida en les línies amb absència de receptors per a FGF4 (Kunath et al., 2007).

Per a modular la pluripotència de les SCs, ERK1/2 fosforilen factors de manteniment de la pluripotència com ara KLF4, KLF2 o NANOG, als que un cop fosforilats s'hi uneixen proteïnes que en desestabilitzen l'estructura o bé els condueixen a la degradació per ubiquitinització. D'aquesta manera, les proteïnes ERK1/2 causen una pèrdua de la funció de les seves proteïnes diana i indueixen diferenciació de les SCs (Kim et al., 2012, 2014; Yeo et al., 2014). No és estrany, doncs, que ERK1/2 també estigui implicat en regular la transició d'ESCs a cèl·lules amb característiques més similars a les de les EpiSCs (Greber et al., 2010).

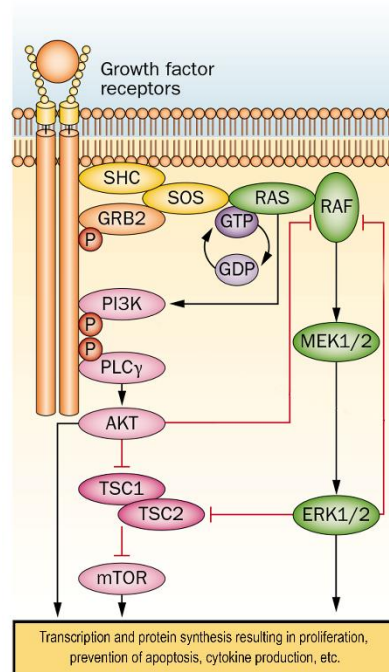


Figura 9 Esquema general de la via de Ras/Raf/MAPK i la seva interacció amb la via de PI3K. Imatge adaptada amb el permís de Macmillan Publishers Ltd: *Nature Reviews Clinical Oncology*, Zhao and Adjei, copyright (2014).

Per a regular el manteniment de la pluripotència in vitro a través de la senyalització de les MAPK, s'utilitzen inhibidors de la via que s'explicaran més endavant (pàg. 50). Malgrat que la inhibició de MEK millora l'eficiència de derivació i cultiu d'ESCs, inhibint la diferenciació que causen FGF4, GRB2 i H-RAS (Cheng et al., 1998; Kunath et al., 2007; Stavridis et al., 2007; Lu et al., 2008), trobem estudis que demostren que la manca d'ERK impedeix el manteniment de

les SCs. Quan la via de les MAPK no s'activa degut al silenciament dels gens de les proteïnes RAF, disminueix la mida i proliferació de les colònies de mESCs establertes i no es produeix desenvolupament clonal (a partir d'una única cèl·lula) (Guo *et al.*, 2013). Aquests efectes són encara més severos quan el silenciament es dona més avall en la cascada de senyalització. Concretament, les mESCs amb un silenciament d'*Erk1* experimenten un escurçament telomèric, augmenta la seva inestabilitat genòmica, se'n compromet el manteniment de la pluripotència, se'n redueix la proliferació cel·lular, s'altera la progressió del cycle cel·lular i augmenta l'apoptosi (Chen *et al.*, 2015). El fet que el fenotip de les mESCs sigui més sever quan el silenciament es dona més avall en la cascada de senyalització, concorda amb el descobriment que les quinases MEK1/2 actuen, com a mínim, sobre un nou substrat (HSF1) que regula la proteòstasi, i no només sobre ERK1/2 com es creia fins ara (Figura 10) (Tang *et al.*, 2015). Així doncs, l'efecte de MEK podria mantenir la pluripotència de les mESCs per un mecanisme independent d'ERK (Ma *et al.*, 2016).

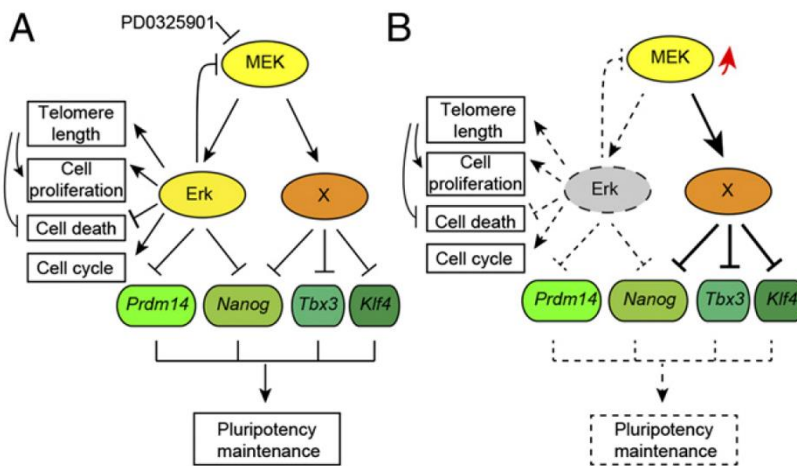


Figura 10 Esquema de la possible acció de MEK sobre el manteniment de la pluripotència a través d'ERK i altres proteïnes. A: MEK suprimeix l'expressió dels gens de manteniment de la pluripotència a través d'ERK i altres proteïnes (X). Aquest efecte pot ser revertit pels inhibidors de MEK (PD0325901). B: Quan *Erk* és silenciada, MEK tan sols pot actuar a través de la via independent d'ERK i el manteniment de la pluripotència queda comprometent, així com l'allargament telomèric, la proliferació cel·lular i la progressió del cycle cel·lular (Chen *et al.*, 2015).

El fet que ERK1/2 pugui determinar que es mantingui la pluripotència o s'iniciï la diferenciació cel·lular en les SCs, requereix una regulació de la transcripció molt específica, sobretot dels gens implicats en el control del desenvolupament. La

majoria d'aquests gens es troben en un estat d'equilibri ja que presenten marques que promouen la transcripció gènica (H3K4me3) i marques que reprimeixen la transcripció (H3K27me3). Per a activar la transcripció específica d'aquests gens és necessari que la RNA-polimerassa II tingui la Serina 5 fosforilada, i és ERK2 qui se n'encarrega (*Tee et al., 2014*). Així doncs, ERK1/2 promou el manteniment de la pluripotència i la diferenciació cel·lular utilitzant diferents estratègies.

3.1.2.3 TGF β i BMP

Els factors transformadors del creixement β (TGF β) formen una família de citocines que inclou el TGF β , les proteïnes morfogèniques de l'os (BMP), l'ACTIVINA, el NODAL i la INHIBINA, entre d'altres. La via de senyalització de TGF β /BMP està implicada en el desenvolupament embrionari i l'homeòstasi de teixits adults. Malgrat que la via es pot activar per diferents lligands, tots els receptors consten d'un heterodímer entre un receptor de tipus I i un receptor de tipus II que, un cop s'hi uneixi el lligand, fosforilarà al primer. Un cop fosforilat, el receptor de tipus I serà l'encarregat de fosforilar als efectors citoplasmàtics que s'hi uneixin, és a dir, les proteïnes SMAD. Aquestes, un cop fosforilades s'uniran a SMAD4 i formaran un complex que serà translocat al nucli per activar la transcripció específica dels gens regulats per la via (**Figura 11**). A més a més, la via compta amb dues proteïnes SMAD inhibidores 7 i 6 que afecten preferentment les cascades de TGF β i BMP, respectivament (*Ogawa et al., 2006; Guo and Wang, 2009*).

La cascada de TGF β s'activa principalment per la unió de TGF β , ACTIVINA o NODAL. El receptor de tipus I està format per les proteïnes ALK 5, 4 o 7 mentre que TGFBR2 és el receptor de tipus II i són les proteïnes SMAD 2 i 3 les que s'associen al receptor (**Figura 11**) (*Ogawa et al., 2006; Guo and Wang, 2009*). L'activació de la cascada de TGF β causa un augment de la transcripció de gens com ara *Lefty1* i *2* (*Hassani et al., 2014c*). En presència de TGF β , ACTIVINA o NODAL la via s'activa i reforça el manteniment de la pluripotència de les mESCs (*Ogawa et al., 2006*) i augmenta la viabilitat i proliferació cel·lular malgrat que no pot eliminar totalment la diferenciació de les mESCs (*Ying et al., 2003b*).

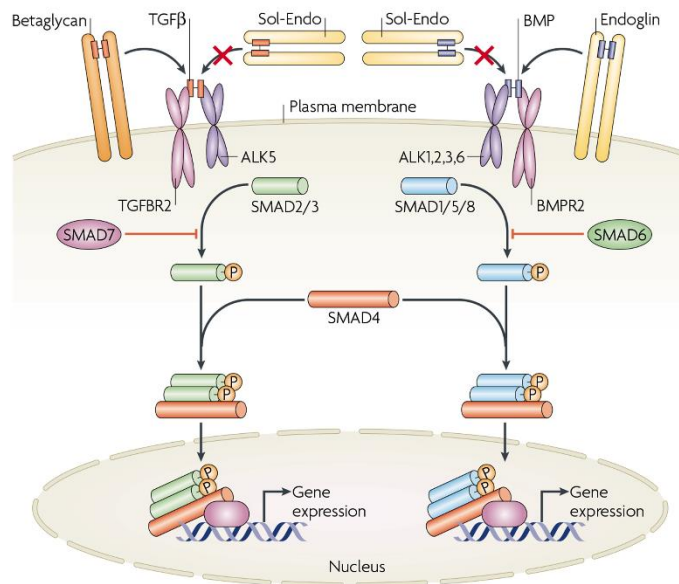


Figura 11 Esquema de la via de TGF β /BMP mostrant les dues cascades principals de senyalització, la de TGF β , que s'activa pel receptor ALK 5 i recluta les SMAD 2 i 3, i la de BMP, que s'activa pels receptors ALK 1, 2, 3, 6 i recluta les SMAD 1, 5 i 8. Reproduït amb el permís de Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Molecular Cell Biology, (Dijke and Arthur) copyright (2007).

Respecte l'activació de la cascada de TGF β en mESCs cal tenir en compte que els resultats varien en funció del medi de cultiu utilitzat (que s'explicarà més endavant, pàg. 44), ja que els treballs realitzats amb medi suplementat amb sèrum fetal boví (FCS) o substitutiu del sèrum *KnockOut* (KSR) suggereixen que TGF β millora el manteniment de la pluripotència (Ogawa *et al.*, 2006), mentre que els treballs realitzats amb medi suplementat amb N2B27 indiquen que la inhibició de la via promou la pluripotència (Hassani *et al.*, 2012, 2014a, 2014c; Tsei *et al.*, 2013).

Quan s'activa la cascada de les BMP, el receptor de tipus I està format per les proteïnes ALK 1, 2, 3 o 6, BMPR2 és el receptor de tipus II i es recluten les proteïnes SMAD 1, 5 i 8 (Figura 11). Un cop al nucli, el complex de SMAD activa la transcripció dels factors inhibidors de la diferenciació (*Id* 1, 2 i 3 (Ying *et al.*, 2003b). ID1 actua endarrerint la pèrdua d'E-CADHERINA, típica de la diferenciació neural. A més a més, a les cèl·lules de la mesoderma aquesta pèrdua suprimeix l'expressió de gens característics de la transició Epiteli-Mesènquima i endarrerix la pèrdua de l'expressió de proteïnes característiques de l'epiblast com OCT4,

NANOG i FGF5. Així doncs, el manteniment de l'E-CADHERINA dificulta la diferenciació de la cèl·lula (Malaguti et al., 2013).

El manteniment de la pluripotència per part de BMP depèn de la intensitat amb la que s'activa la cascada. Quan es dona una activació moderada de BMP, s'inhibeix la diferenciació neural i es manté la pluripotència, mentre que quan es dona una forta activació de la cascada, BMP bloqueja la diferenciació neural i indueix la diferenciació a precursors de mesoderma (Ying et al., 2003b; Malaguti et al., 2013).

3.1.2.4 Wnt

La via canònica de Wnt és una via altament conservada al llarg de l'evolució i està implicada en quasi tots els processos del desenvolupament embrionari. També controla l'autorenovació de múltiples teixits adults i, per això, aquesta via també està implicada en múltiples processos tumorals (Clevers, 2006). A nivell cel·lular la via canònica de Wnt es regula segons la quantitat de β -CATENINA disponible per a ser translocada al nucli i interaccionar amb diferents factors de transcripció.

Quan la via de Wnt està inactiva, la β -CATENINA lliure s'acumula al citoplasma. Per a regular-ne la concentració, existeix un complex de degradació de la β -CATENINA format per l'AXINA, que actua com a esquelet del complex, on s'hi uneix la proteïna *adenomatous polyposis coli* (APC), la quinasa CK1, la quinasa de la glicogen sintasa 3β (GSK3 β), i la pròpia β -CATENINA. D'entre les dues quinases, la GSK3 β és l'encarregada de fosforilar les serines 33 i 37 de l'extrem amino-terminal de la β -CATENINA, marca on s'hi uneix la ubiquitina lligasa BTRCP que condueix a la degradació de la β -CATENINA al proteosoma (Figura 12) (Bienz, 2005; Brembeck et al., 2006; Baron and Kneissel, 2013; Stamos and Weis, 2013). Per assegurar el correcte funcionament del complex, l'APC protegeix les aquestes serines per a que no siguin defosforilades per proteïnes com la PP2A i fa de pont estructural del complex amb la ubiquitina lligasa BTRCP (Stamos and Weis, 2013).

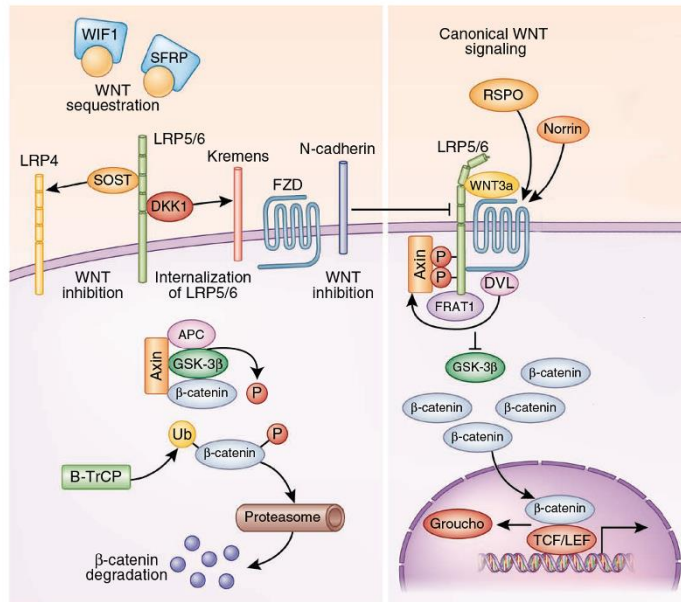


Figura 12 Esquema de la via de Wnt quan és inactiva (esquerra) i activa (dreta). Imatge adaptada amb el permís de Macmillan Publishers Ltd: *Nature Medicine*, Baron and Kneissel, copyright (2013).

Quan s'activa la via canònica de Wnt, per un lligand com per exemple WNT3A, aquest s'uneix als receptors de la lipoproteïna de baixa densitat (LRP) 5/6 i *Frizzled* (FZD), que formaran un dímer a la membrana. La formació d'aquest dímer fa que FZD recluti la proteïna *dishevelled* (DVL), que a la vegada s'encarregarà de reclutar l'AXINA. Així doncs, el complex de degradació de la β-CATENINA queda desestructurat. La β-CATENINA s'acumula al citoplasma i, amb l'ajuda de BCL9-2, es transloca al nucli on interaccionarà amb diferents factors de transcripció, el factor de les cèl·lules T (TCF) i el factor potenciador de limfòcits (LEF) per activar la transcripció dels gens diana (Figura 12) (Brembeck et al., 2004, 2006; Bienz, 2005; Baron and Kneissel, 2013).

Es coneix que existeixen quatre TCF/LEF diferents que regulen l'expressió de gens específics. En funció dels dominis d'interacció i altres mecanismes que s'explicaran més endavant, la via de Wnt pot induir la diferenciació de les mESCs a cèl·lules dels tres llinatges embrionaris (Gadue et al., 2006; Lindsley et al., 2006; Jackson et al., 2010) o bé pot estar implicada en el manteniment de la pluripotència. En aquest segon escenari, és important la interacció de la β-CATENINA i el TCF1, que promou el manteniment de la pluripotència impedit la transcripció de gens que promouen la diferenciació (Chatterjee et al., 2015), i

sobretot la interacció entre la β -CATENINA amb el TCF3 (Wray et al., 2011), pel seu domini N-terminal (Van de Wetering et al., 1997). El TCF3 és un repressor que es troba associat al promotor de múltiples gens que promouen el manteniment de la pluripotència, com ara *Oct4*, *Sox2*, *Nanog* o *Klf2* (Pereira et al., 2006; Cole et al., 2008; Tam et al., 2008; Wray et al., 2011). Per a dur a terme la seva acció repressora, TCF3 actua conjuntament amb altres proteïnes com Groucho/TLE o la proteïna d'unió al domini C-terminal (Tam et al., 2008). En absència de β -CATENINA, el TCF3 queda ancorat al promotor d'aquests gens, però quan es dona la interacció entre les dues proteïnes, la β -CATENINA aboleix la funció repressora del TCF3 permetent la transcripció dels gens reprimits i endarrerint el procés de diferenciació cel·lular (Pereira et al., 2006; Wray et al., 2011).

A més a més, la retirada de TCF3 també permet la transcripció de múltiples gens reguladors de la via com són *Fz1*, *Lrp*, els propis *Tcf/Lef* i *Axina2* o *Conductina* (Clevers, 2006; Cole et al., 2008). Curiosament, TCF3 també regula la transcripció d'alguns gens implicats en processos de diferenciació, per això la regulació de la transcripció de gens que afavoreixen el manteniment de la pluripotència o la diferenciació cel·lular necessiten altres mecanismes de regulació complementaris. Recentment s'ha descrit que les variables que modulen la transcripció dels gens diana de la via de Wnt en diferents teixits o diferents moments de la vida de l'individu són: la presència de diferents TCF, les diferents variants de TCFs degudes a *splicing* alternatiu, la metilació dels promotors dels gens regulats per la via, les modificacions en les histones, la cooperació amb altres TFs específics de teixit, el reclutament i unió de la β -CATENINA a OCT4 o NANOG independent de TCF (Tam et al., 2008), el reclutament de la β -CATENINA facilitat per alguns RNA no codificants llargs o la intensitat de senyal de Wnt (Masuda and Ishitani, 2016).

3.1.2.5 Unions Adherents

L'E-CADHERINA és una proteïna estructural que forma homodímers dependents de calci que resulten en unions entre diferents cèl·lules. En aquestes unions, les molècules d'E-CADHERINA s'uneixen per la regió determinada pels aminoàcids HAV propers a l'extrem N-terminal i formen una estructura en forma de X (Steinberg and McNutt, 1999). Pel domini citoplasmàtic, les molècules d'E-CADHERINA estan en contacte amb el citoesquelet, concretament amb les

proteïnes α i β CATENINA (Ozawa *et al.*, 1989). Aquesta unió es regula per la fosforilació de dues tirosines de la β -CATENINA, la Y654 i sobretot la Y142, que quan estan fosforilades fan que es dissociï el complex proteic de manera que la β -CATENINA queda lliure al citoplasma i pot ser degradada o bé translocada al nucli per a participar en la via de Wnt (Figura 13) (Piedra *et al.*, 2003; Brembeck *et al.*, 2006; Kam and Quaranta, 2009).

La presència d'E-CADHERINA comporta el manteniment de la pluripotència de les mESCs, mentre que la pèrdua d'expressió o la manca d'E-CADHERINA està associada al procés de diferenciació cel·lular a epiblast, ectoderma o mesoderma (Redmer *et al.*, 2011; Bedzhov *et al.*, 2013; Malaguti *et al.*, 2013). Tanmateix, crida l'atenció que tant les SCs que presenten baixos nivells d'E-CADHERINA, com les SCs que presenten la proteïna truncada en el domini SRR de l'extrem N-terminal tenen problemes per a diferenciar-se correctament. Per tant, són necessaris nivells elevats de la molècula intacta per a ser considerades vertaderes mESCs (Redmer *et al.*, 2011; Bedzhov *et al.*, 2013; Piatti *et al.*, 2015).

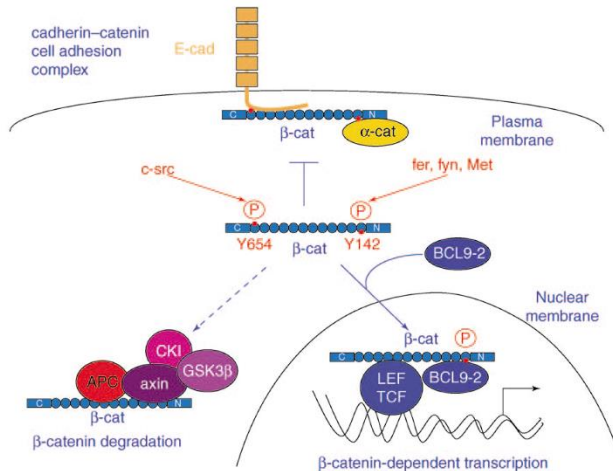


Figura 13 Esquema de la interacció entre les molècules d'E-CADHERINA de la membrana cel·lular i les molècules de β -CATENINA i la seva regulació. Reproduït de *Current opinion in genetics & development*, volum 16, Brembeck i col·laboradors, *Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of β -catenin*, pàg 51–59, copyright (2006), amb permís d'Elsevier.

Malgrat que l'E-CADHERINA no participa directament en cap via de senyalització, interacciona amb algunes de les vies que s'han explicat anteriorment per a mantenir la pluripotència. D'una banda, es coneix que l'E-CADHERINA activa la via de STAT3 i manté nivells elevats de TBX3, KLF4 i NANOG (Hawkins *et al.*, 2012;

Bedzhov et al., 2013). D'altra banda, l'E-CADHERINA regula l'activitat transcripcional de Wnt, ja que recluta la β -CATENINA a la membrana plasmàtica, on forma un complex de manteniment de la pluripotència juntament amb E-CADHERINA, OCT4 i en menor mesura NANOG (*Faunes et al., 2013*). La formació d'aquest complex fa que les cèl·lules pluripotents presentin molt poca activitat transcripcional de la via de Wnt. La desestructuració d'aquest complex comporta la disminució d'E-CADHERINA i OCT4 associades a la membrana i l'augment de β -CATENINA activa disponible al citoplasma, que pot conduir a la diferenciació de les SCs (*Faunes et al., 2013*).

En cultiu, la presència d'E-CADHERINA adherida a la superfície de la placa permet mantenir les SCs pluripotents sense necessitat d'haver de formar estructures colonials (*Nagaoka et al., 2006*), i facilita la derivació de línies de mESCs a partir de blastòmers aïllats a estadi de 8 cèl·lules (*González et al., 2011*).

Finalment, l'E-CADHERINA també és determinant per a que es doni una correcta reprogramació cel·lular a iPSCs (*Bedzhov et al., 2013*), fins al punt que l'E-CADHERINA pot substituir *Oct4* en el còctel de factors reprogramadors OSKM sense que es donin diferències en l'eficiència del procés i les característiques de les iPSC resultants (*Redmer et al., 2011*).

3.2 VARIABLES QUE INFLUEIXEN EN LA DERIVACIÓ I CULTIU DE LÍNIES DE LES CÈL·LULES MARE EMBRIONÀRIES DE RATOLÍ

En els apartats anteriors s'han descrit mecanismes de manteniment de la pluripotència *naïve*. Ara bé, la derivació i cultiu in vitro de les mESCs comporta un seguit de condicions que poden interferir en aquest manteniment. A continuació es detallaran les principals variables estudiades en aquesta tesi doctoral, així com els seus efectes.

3.2.1 FONS GENÈTIC DE LA SOCA DONADORA D'EMBRIONS

El fons genètic de la soca donadora d'embrions determina l'habilitat que tindran els propis embrions per a establir línies de mESCs. Tenint en compte aquesta habilitat, les soques es poden classificar en permissives, essent aquelles que donaran lloc a línies de mESCs amb elevada freqüència, i no permissives o

refractàries, essent aquelles que no donaran lloc a línies de mESCs o bé ho faran amb una eficiència significativament inferior.

Degut a la seva permissivitat, tradicionalment les mESCs s'han establert a partir d'embrions amb fons genètic 129S2. Malgrat tot, per entendre la naturalesa de les SCs pot ser desitjable establir línies de mESCs a partir d'embrions amb un fons genètic diferent, ja sigui endogàmic o híbrid. Per això múltiples estudis han provat d'establir línies de mESCs a partir d'embrions de les soques BALB, BXSb, MRL, C57BL, 129S2, CBA, DBA, CH3 i FVB cultivats en DMEM suplementat amb FCS i en presència de LIF (*Kawase et al., 1994; Brook and Gardner, 1997; Auerbach et al., 2000; Schoonjans et al., 2003*). Malgrat els múltiples estudis realitzats i l'aparent concordança de les condicions de cultiu, no hi ha acord en la permissivitat de les soques, més enllà que la 129S2 és una soca permissiva (amb eficiències de derivació que poden arribar al 100%).

Pel que fa a la resta de fons genètics s'ha vist que la seva major o menor habilitat per a establir línies de mESC està condicionada per les condicions de cultiu (*Batlle-Morera et al., 2008; Davies and Fairchild, 2012*). És per això que el treball de Ohtsuka i Niwa, on es descriu que la permissivitat dels diferents fons genètics depèn de l'activació de les vies de JAK/STAT i MAPK en resposta al LIF (molècula que es detallarà més endavant, pàg. 46), és especialment interessant (*Ohtsuka and Niwa, 2015*). Estudiant l'expressió i activació de les proteïnes SOCS3 i STAT3 de la via de JAK/STAT i de les proteïnes EGR1 i ERK1/2 de la via de les MAPK, els autors determinen l'activitat de les dues vies just després d'afegir LIF al medi de cultiu i al cap de 24 hores. D'aquesta manera determinen que les mESCs establertes a partir d'embrions de soques permissives tenen una habilitat superior d'activar la via de JAK/STAT en presència de LIF i que, malgrat que s'activa lleugerament la via de les MAPK, JAK/STAT en regula negativament l'activitat resultant en una inactivació de la via (**Figura 14**). Les ESCs derivades d'embrions de soques no permissives, en canvi, tenen una habilitat limitada d'activar la via de JAK/STAT en presència de LIF i a la vegada sobre-activen la via de les MAPK (**Figura 14**). En aquest escenari, les cèl·lules estan sotmeses a una situació que afavoreix la diferenciació cel·lular, cosa que explica l'incapacitat dels embrions de soques refractàries de mantenir la pluripotència i facilitar l'establiment de línies de mESCs en les condicions estàndard de cultiu (FCS + LIF) (*Ohtsuka and Niwa, 2015*).

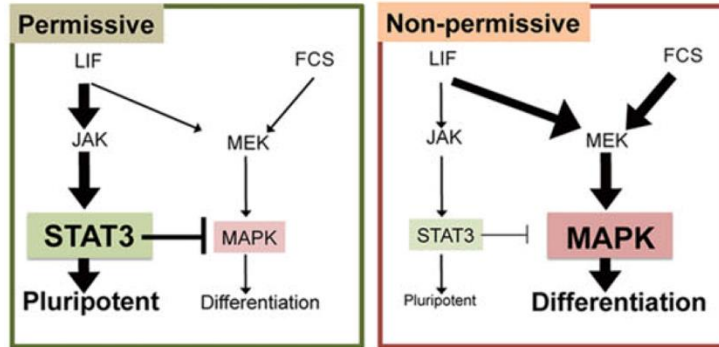


Figura 14 Esquema de l'activació de les vies de senyalització JAK/STAT i MAPK en presència de LIF en les mESCs derivades de soques permissives i no permissives (Ohtsuka and Niwa, 2015).

Així doncs, tenint en compte la seva resposta al LIF tan sols les soques 129S2 i C57BL es consideren permissives per a la derivació de mESCs, mentre que les soques CBA, FVB i NOD es consideren refractàries per a aquest procés i la soca BALB es considera una soca de naturalesa intermèdia (Ohtsuka and Niwa, 2015).

3.2.2 CONDICIONS DE CULTIU

D'entre totes les condicions que intervenen en el manteniment de la pluripotència in vitro, ens centrarem en el tipus de superfícies de cultiu, els suplementes que s'afegeixen al medi i els moduladors de les vies de senyalització.

3.2.2.1 Superfícies per al cultiu de les mESCs

Tradicionalment, les mESCs s'han cocultivat en presència de cèl·lules nodridores, que les ajuden a mantenir la pluripotència. En els seus estudis cultivant ECCs, Martin i Evans van observar que les ECCs només mantien la pluripotència quan es cultivaven en presència de cèl·lules nodridores. A més, van observar que en absència d'aquestes, les ECCs formaven estructures esfèriques amb cèl·lules diferenciades a la perifèria, que ben aviat van identificar com a cossos embrioides. En aquest primer estudi les cèl·lules nodridores es van obtenir a partir de fibroblasts de ratolí de la línia STO inactivats amb mitomicina C (Martin and Evans, 1976). La inactivació de les cèl·lules nodridores es pot aconseguir mitjançant la

mitomicina C, que és un antibiòtic antitumoral que inhibeix la divisió cel·lular, malgrat que les cèl·lules segueixen vives, o bé exposant les cèl·lules a raigs γ .

A banda de les cèl·lules STO, existeixen altres tipus de fibroblasts que es poden inactivar per a donar lloc a cèl·lules nodridores. Els més utilitzats són els fibroblasts embrionaris de ratolí (MEFs) o els fibroblasts de prepuci humà (HFFs). La funció principal de les cèl·lules nodridores és secretar al medi la citocina LIF (pàg. 46), que és essencial per al manteniment de la pluripotència (*Martello and Smith, 2014*), i proteïnes que activen la via canònica de Wnt (*ten Berge et al., 2011*). Malgrat que els tres tipus cel·lulars són capaços de mantenir les mESCs pluripotents (*Lee, 2013*), les MEFs són més efectives que les STOs, ja que permeten que les mESCs expressin nivells més elevats de proteïnes de pluripotència com són SOX2 i NANOG (*Park et al., 2015*). D'altra banda, les HFFs presenten dos grans avantatges respecte les MEFs i les STOs. Primerament, són cèl·lules més duradores en cultiu (fins a dues setmanes), la qual cosa evita realitzar subcultius innecessaris i, d'altra banda, sintetitzen elevats nivells d'interleucina 6 que, igual que el LIF, activa la via de JAK/STAT que ajuda a mantenir la pluripotència (*Ma et al., 2012*).

Com a alternativa a l'ús de les cèl·lules nodridores, les mESCs es poden cultivar sobre superfícies cobertes de gelatina en un medi ric en LIF o el còctel de moduladors de les vies de senyalització anomenat 2i (pàg. 50) (*Smith, 1991; Ying et al., 2008*). Tot i això, l'ús de cèl·lules nodridores en presència de LIF i 2i millora l'eficiència de derivació, promou l'adhesió de les colònies a la superfície i ajuda a mantenir un cariotip estable (*Czechanski et al., 2014*). Així doncs, l'ús de cèl·lules nodridores és beneficiós però dispensable quan es treballa amb línies de mESCs establertes o bé es deriven noves línies de mESCs a partir d'embrions sencers. Tanmateix, per a derivar mESCs a partir de blastòmers aïllats la presència de cèl·lules nodridores és essencial (*Boroviak et al., 2014; Hassani et al., 2014c*).

3.2.2.2 Suplements del medi

Tal i com s'ha apuntat en apartats anteriors, el cultiu de mESCs requereix de suplements del medi adequats per a mantenir la pluripotència. Existeixen diferents suplements que permeten derivar i cultivar mESCs, tot i que no tots són igual d'eficients. Malgrat que en aquest apartat ens centrarem en els avantatges i inconvenients que comporta l'ús dels diferents suplements del medi, sovint aquests no són suficients per a permetre la derivació i cultiu de línies de mESCs.

Per això, es requereix a més l'addició de moduladors de les vies de senyalització, que s'explicaran en el següent apartat.

Els primers estudis de derivació de mESCs utilitzaven un 10% dels sèrums bovins FCS i de vedell nouat per a suplementar el DMEM (*Evans and Kaufman, 1981*), tot i que la majoria d'estudis posteriors utilitzaren només FCS. Malgrat que el sèrum és una excel·lent mescla de nutrients que promou la propagació cel·lular, no sempre facilita el manteniment de la pluripotència, ja que pot contenir factors que indueixin la diferenciació de les mESCs. És per això que és essencial utilitzar només aquells lots testats pel cultiu de SCs (*Lee, 2013*).

Per a evitar l'ús de sèrums i els subsegüents inconvenients, el medi de cultiu de les mESCs es pot suplementar amb complexos proteics lliures de sèrum. D'una banda, es pot utilitzar el KSR, un substitutiu del sèrum amb una formulació més definida però desconeguda, especialment dissenyat per a cultivar SCs i iPSCs. El medi suplementat amb KSR permet aconseguir unes eficiències de derivació i manteniment de mESCs superiors a les obtingudes en medi suplementat amb FCS (*Ward et al., 2002; Cheng et al., 2004; Davies and Fairchild, 2012*), essent properes al 50% quan s'utilitzen embrions de fons genètics no permissius (*Bryja et al., 2006*).

Recentment, González i col·laboradors han descrit que les línies de mESCs cultivades en medi suplementat amb KSR presenten nivells d'expressió més elevats de gens relacionats amb la meiosi, amb el patró de determinació anteroposterior i amb la progressió del cicle cel·lular, mentre que presenten una disminució de l'expressió dels gens relacionats amb les unions cel·lulars, l'adhesió amb la matriu extracel·lular, la migració i diferenciació i la senyalització dels FGFs, respecte les SCs cultivades en presència de FCS. Aquest patró d'expressió és similar al dels embrions a l'estadi de dues cèl·lules i al dels teixits extraembrionaris, suggerint que les mESCs cultivades en medi suplementat amb KSR es troben en un estat de pluripotència *naïve* proper a la totipotència (*Gonzalez et al., 2016*). Aquest patró contrasta amb l'estat de pluripotència *primed* en el que es troben les mESCs cultivades en presència de FCS (*Meyenn et al., 2016*).

Tanmateix, està descrit que el medi suplementat amb KSR també pot donar eficiències de derivació diferents en funció del lot de KSR que s'utilitzi per a

suplementar el medi (Cheng et al., 2004; Chaudhry et al., 2008). Així doncs, cal aplicar les mateixes mesures de precaució quan es treballa amb el KSR que amb el FCS, validant cada lot de suplement abans d'utilitzar-lo per a cultivar mESC.

Com a segona alternativa al sèrum, també es pot utilitzar el complex proteic N2B27, que dona lloc a un medi lliure de sèrum. Tanmateix, aquest medi induïx la diferenciació neural de les cèl·lules que s'hi cultiven (Ying and Smith, 2003), a no ser que les cèl·lules expressin constitutivament nivells elevats de Nanog (Ying et al., 2003b). De tota manera, quan el suplement N2B27 es combina amb el còctel d'inhibidors 2i les eficiències de derivació augmenten significativament amb independència de la resta de condicions de cultiu (Ying et al., 2008). L'ús presenta dos avantatges respecte els altres suplementes. D'una banda, no existeix variabilitat entre diferents lots de N2B27 i d'altra banda, com que es tracta d'un suplement de composició coneguda, es pot determinar quin efecte causa en les vies de senyalització cel·lular.

3.2.2.3 Moduladors de les vies de senyalització

Independentment del medi de cultiu, els moduladors de les vies de senyalització permeten activar i/o inhibir diferents vies de senyalització de les descrites anteriorment, que ajuden a mantenir la pluripotència de les mESCs in vitro. A continuació detallarem els moduladors més utilitzats en el cultiu de mESCs.

FACTOR INHIBIDOR DE LA LEUCÈMIA

Les citocines són molècules de naturalesa proteica que, majoritàriament, realitzen funcions de comunicació cel·lular del sistema immunològic. Tanmateix, el cultiu de mESCs en medi condicionat per hepatòcits de rata Buffalo, promou la pluripotència de les SCs gràcies a la secreció del polipèptid inhibidor de l'activitat diferenciadora (DIA) (Smith and Hooper, 1987), suggerint que les citocines també realitzen altres funcions. Gràcies a l'estudi del DIA es va descobrir que aquesta molècula presentava una forta homologia amb el LIF en ratolins i la interleucina de les cèl·lules DA en humans (Smith et al., 1988). El LIF és una citocina que realitza múltiples funcions al sistema hematopoètic, com ara induir la diferenciació de les SCs hematopoètiques a macròfags de tipus I (Williams et al., 1988). Però després d'observar que les ECCs i les mESCs presenten receptors pel LIF a la seva membrana es va descobrir que també participa en el manteniment

de la pluripotència inhibint la diferenciació cel·lular (*Smith et al., 1988; Williams et al., 1988*). De fet, ara sabem que LIF és el principal activador de la via de JAK/STAT3 i que promou el manteniment de la pluripotència *naïve* (*Matsuda et al., 1999; Ohtsuka et al., 2015*). El seu efecte és tal que permet derivar i mantenir línies de mESCs en absència de cèl·lules nodridores (*Nichols et al., 1990*). Tot i que només manté de manera eficient la pluripotència de mESCs derivades d'embrions provinents de soques permissives (*Kawase et al., 1994; Brook and Gardner, 1997; Batlle-Morera et al., 2008*) ja que, com s'ha explicat anteriorment, només aquests embrions presenten una major activació de la via de JAK/STAT3 i inhibeixen eficientment la via de les MAPK en resposta al LIF (*Ohtsuka and Niwa, 2015*) (Figura 14).

HORMONA ADRENOCORTICÒTROPA

La hormona proteica adrenocorticotropa (ACTH) està implicada en la producció d'una resposta a l'estrès biològic. Sorprenentment, l'addició al medi dels 24 primers aminoàcids de la seva seqüència proteica ajuda a mantenir la pluripotència de les mESCs cultivades en medi suplementat amb KSR. Aquesta millora és dosi-depenent, amb un màxim a 10 μ M. Malgrat que no es coneix per quina via de senyalització promou la pluripotència, se sap que en SCs l'ACTH no actua a través de la seva via habitual de cAMP-PKA (*Ogawa et al., 2004*).

L'addició d'ACTH al cultiu de mESCs promou el desenvolupament clonal, ajuda a mantenir la pluripotència de les mESCs en cultiu i promou la formació dels *outgrowths*, és a dir, el primer conjunt de cèl·lules del procés de derivació de les SCs (*Ogawa et al., 2004; Wakayama et al., 2007; Lee et al., 2012*).

PROTEÏNES MORFOGÈNIQUES DE L'OS

Les proteïnes BMP4 i BMP2 són lligands del receptor de BMP i poden activar la transcripció dels factors *Id* mitjançant SMAD. A la pràctica, l'addició de BMP4 i, en menor mesura, BMP2 a cultius en presència de LIF permet mantenir la pluripotència de les SCs, millorar l'eficiència de derivació, la viabilitat cel·lular i la proliferació de les línies cultivades. Aquest efecte s'observa fins i tot en medi suplementat amb N2B27 i en absència de cèl·lules nodridores, malgrat que ho fa amb una eficiència molt baixa, propera al 5% (*Ying et al., 2003b*). En absència de LIF, la presència de BMP4 disminueix la diferenciació neuronal de les cèl·lules

bloquejant l'augment de SOX1, i indueix la diferenciació a altres llinatges cel·lulars (Ying et al., 2003a, 2003b; Malaguti et al., 2013).

MODULADORS DE WNT

Existeixen múltiples moduladors de la via de Wnt que afecten específicament diferents proteïnes de la via. Atès que Wnt regula la transcripció de gens implicats en processos contraris com són la diferenciació cel·lular i el manteniment de la pluripotència, en l'estudi de les SCs s'han usat tant inhibidors com activadors de la via per tal d'intentar aclarir quin és l'estat de la via en aquestes cèl·lules.

Existeixen múltiples molècules petites que modulen l'activitat de la via en diferents punts, des d'impedir la producció de les proteïnes WNT que activaran la via fins a inhibir la interacció de la β -CATENINA i el TCF/LEF (Lee et al., 2011), però en aquesta tesi doctoral ens centrarem en els moduladors del funcionament del complex de degradació de la β -CATENINA.

D'entre els activadors de la via de Wnt utilitzats en estudis amb SCs, destaquen els inhibidors de l'acció de la proteïna GSK3 β . La inhibició d'aquesta causa un efecte mediat, majoritàriament, per la β -CATENINA a la via canònica de Wnt (Wray et al., 2011), tot i que està demostrat que també afecta altres vies com la de PI3K (Storm et al., 2007; Bechard and Dalton, 2009; ten Berge et al., 2011) o altres processos cel·lulars com la síntesi del glicògen, l'estabilitat dels microtúbuls, el control del cicle cel·lular i la resposta a la insulina (Frame et al., 2001; Stamos and Weis, 2013).

Es coneix que una activació parcial de la via de Wnt ajuda a mantenir l'autorenovació de les ESCs, promou el manteniment de la pluripotència *naïve* i disminueix la diferenciació (Wray et al., 2011). Per aconseguir-ho s'han utilitzat bàsicament les molècules BIO i CHIR99021 o Chiron (d'ara en endavant CHIR). Ambdues s'encarreguen d'inhibir l'acció del complex de degradació de la β -CATENINA, de manera que n'augmenta la quantitat que es troba a la membrana associada amb l'E-CADHERINA reforçant les unions adherents (Sineva and Pospelov, 2010). D'altra banda, també augmenta la quantitat de β -CATENINA fosforilada que es localitza al citoplasma disponible per a ser translocada al nucli i activar la transcripció d'alguns gens tant associats amb el manteniment de la pluripotència, com *Klf2* i *Axina2*, com associats amb la diferenciació cel·lular com *Snail*, *Vimentina* i *N-cadherina* (Sineva and Pospelov, 2010; Wray et al., 2011). Les

diferències principals entre les dues molècules inhibidores són que CHIR gairebé no presenta reactivitat creuada amb altres quinases, mentre que BIO reacciona inespecíficament (Ying *et al.*, 2008; Wray *et al.*, 2011). A més a més, BIO fa que disminueixi la proliferació de les poblacions de SCs i que augmenti l'acumulació de cèl·lules que queden retingudes a G1 (Sineva and Pospelov, 2010).

D'entre els inhibidors de la via de Wnt destaquen els estabilitzadors de l'AXINA, que condueixen a una degradació de la β -CATENINA citoplasmàtica, impedit que aquesta pugui ser translocada al nucli. Dues de les molècules més utilitzades són XAV939 i IWR-1-endo (d'ara en endavant IWR). XAV939 és un inhibidor de les tanquirases 1 i 2, que són proteïnes que s'associen a l'AXINA i condueixen a la seva degradació en el proteosoma. Així doncs, XAV939 estabilitza l'AXINA de manera indirecta i aconsegueix inhibir la transcripció dels gens regulats per la via canònica de Wnt a través de la β -CATENINA (Huang *et al.*, 2009). A diferència de XAV939, IWR és una molècula sintètica que inhibeix la resposta de Wnt estabilitzant l'AXINA, però ho fa de manera reversible. Per tant, quan es retira la molècula inhibidora del cultiu es reactiva la via de Wnt i la transcripció dels gens de la via (Chen *et al.*, 2009). Degut a la elevada similitud entre les molècules d'AXINA 1 i 2, IWR actua estabilitzant les dues molècules (Chen *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2013).

Tots aquests moduladors de la via de Wnt es combinen amb freqüència amb inhibidors d'altres vies per millorar l'eficiència de derivació i cultiu de les mESCs, tal i com veurem més endavant. Tot i això, crida l'atenció la combinació entre CHIR i XAV939 o CHIR i IWR, que condueixen a una inhibició i activació de la via de Wnt a la vegada. Aquests tractaments, realitzats per Kim i col·laboradors, permeten derivar i mantenir SCs amb característiques d'EpiSCs a partir d'epiblasts post-implantacionals de ratolí donant lloc a línies de SCs que presenten inactivació del cromosoma X i expressen *Fgf5*, característiques d'EpiSCs, i alhora presenten un patró d'expressió gènica intermedi entre les mESCs i les EpiSCs (Kim *et al.*, 2013). Aquests resultats coincideixen amb els de ten Berge i col·laboradors, que descriuen que la via de Wnt és l'encarregada d'inhibir la diferenciació a epiblast, i que és l'activació d'aquesta via la que permet mantenir la pluripotència *naïve* (ten Berge *et al.*, 2011). Kim i col·laboradors determinen que el manteniment de les EpiSCs recau en l'AXINA2, proteïna que es sintetitza quan s'activa la via de Wnt com a mecanisme de regulació de la via, i que és estabilitzada per IWR. L'AXINA2 interacciona amb la β -CATENINA al citoplasma i

impedeix que aquesta sigui translocada a nucli i interaccioni amb TCF3 cosa que, com descriuen en el mateix article, si es donés, conduiria a la diferenciació de les EpiSCs (Kim et al., 2013).

INHIBIDORS DE LES MAPK

L'acció de la via de les MAPK es pot modular a través de varis inhibidors. Per a l'estudi del manteniment de la pluripotència, s'han utilitzat bàsicament inhibidors de les quinases MEK1/2 encarregades de fosforilar ERK, com són PD184253, PD98095 o PD0325901 (Burdon et al., 1999; Lu et al., 2008; Ying et al., 2008). Tot i que els inhibidors de MEK milloren el manteniment de la pluripotència, inhibint els senyals que condueixen a la diferenciació a TE o epiblast, el cultiu de mESCs en presència d'aquests causa mort cel·lular per apoptosi, indicant que la inhibició única de la via de les MAPK és insuficient per a mantenir la viabilitat de les mESCs (Ying et al., 2008). Tot i això, els inhibidors de les MAPK mantenen la viabilitat de les mESCs quan es combinen amb altres molècules inhibidores, tal i com s'explicarà al següent apartat. Malgrat que les tres molècules funcionen inhibint la mateixa quinasa, PD0325901 (d'ara en endavant PD) és la més eficient.

CÒCTEL 2i

L'any 2008 Ying i col·laboradors van descriure que la combinació de l'inhibidor de MEK PD184352, l'inhibidor del receptor de FGF SU5402 i CHIR permetia la derivació i cultiu de línies de mESCs en absència de LIF i cèl·lules nodridores en medi lliure de sèrum a partir d'embrions tant de fons genètics permissius (129S2) com refractaris (CBA). Aquesta combinació va ser anomenada 3i (3 inhibidors). A banda de mantenir el cultiu de mESCs, aquests inhibidors permetien que la velocitat de divisió de les mESCs fos el doble que en condicions estàndard. En aquest mateix treball, els investigadors van anar un pas més enllà i van determinar que la pluripotència es mantenia amb les mateixes característiques quan les cèl·lules es cultiven en presència de només PD i CHIR, combinació que van anomenar 2i (Ying et al., 2008). Més tard, Yeo i col·laboradors van aconseguir mantenir mESCs pluripotents cultivant-les en presència dels TFs ESRRB i KLF2. Ja que ESRRB actua *downstream* de la via de Wnt quan és activa i que KLF2 només es manté en absència de la senyalització de MAPK, aquests resultats van confirmar la importància de l'activació de la via Wnt i la repressió de la via de les MAPK per al manteniment de la pluripotència (Martello et al., 2012; Yeo et al., 2014).

S'ha demostrat que la presència de 2i al cultiu promou l'estat de pluripotència *naïve* independentment dels suplementos del medi de cultiu utilitzats. A més, augmenta l'eficiència de derivació de mESCs independentment del fons genètic dels embrions, equiparant els resultats de derivació amb els obtinguts amb embrions de la soca 129S2 (*Ying et al. 2008; Czechanski et al. 2014; Ohtsuka & Niwa 2015*). A nivell d'expressió gènica, la presència de 2i promou l'expressió dels gens relacionats amb el metabolisme lipídic i del glutatió i dels gens relacionats amb el desenvolupament cel·lular. A més, causa la disminució de l'expressió de gens de proteïnes de la matriu extracel·lular, gens implicats en la via de les MAPK, la diferenciació i la migració cel·lular (*Gonzalez et al., 2016*).

Malgrat que el cultiu únicament amb 2i és suficient per a mantenir la pluripotència *naïve* fins i tot en altres espècies de rosegadors (*Buehr et al., 2008; Li et al., 2008*), l'addició de LIF al cultiu amb 2i promou l'autorenovació (*Wray et al., 2010*) i millora l'eficiència de derivació a partir d'una cèl·lula única (*Boroviak et al., 2014*).

L'addició de 2i al medi de cultiu també presenta alguns inconvenients. Primerament, les mESCs cultivades en 2i durant varis passatges assumeixen la senyalització determinada pels inhibidors com a pròpia i presenten certes dificultats per a diferenciar-se posteriorment a teixits especialitzats (*Gonzalez et al. 2016*). A més a més, després d'una llarga exposició a 2i les mESCs poden presentar inestabilitat cromosòmica (*Buehr et al., 2008; Hassani et al., 2014c*).

CÒCTEL R2I

R2i és una combinació de moduladors formada per l'inhibidor de la via de les MAPK PD i l'inhibidor de la via de TGF- β SB431542 (*Hassani et al., 2012*). SB431542 és un inhibidor del receptor de tipus I de l'ACTIVINA ALK5 que també inhibeix l'acció d'ALK4 i 7 degut a la seva homologia. Tot i aquesta inespecificitat, SB431542 no inhibeix els receptors de la via de les BMP (*Inman et al., 2002; Ogawa et al., 2006*) (Figura 11).

L'addició de R2i al medi de cultiu permet mantenir la pluripotència durant la derivació i el manteniment de les mESCs provinents d'embrions sencers i de blastòmers aïllats d'embrions a estadi de vuit cèl·lules de soques no permissives amb les eficiències més elevades que s'han descrit fins al moment (100% i 50% d'eficiència, respectivament) (*Hassani et al., 2012, 2014a*). Malgrat que no es

coneix exactament com es dona l'efecte de R2i, aquest tractament provoca un augment de la transcripció d'*Oct4*, *Nanog* i els factors *Id 1* i *2* i provoca una activació de la via de les BMP (*Hassani et al., 2012, 2014c*). A més a més, el tractament amb R2i permet mantenir la pluripotència en cultius de llarga durada, no afecta el potencial de diferenciació de les mESCs i manté l'estabilitat del cariotip després de més de 20 passatges de cultiu (*Hassani et al., 2014c*).

Tot i els resultats prometedors d'aquest tractament, el seu ús no és tant extens com el tractament amb el còctel 2i i ha quedat restringit, fins al moment, a un únic grup de recerca.

3.2.2.4 Origen de les cèl·lules mare embrionàries de ratolí

Finalment, el manteniment de la pluripotència també varia segons si s'estableixen línies de mESCs a partir d'embrions sencers, generalment a l'estadi de blastocist, o bé de blastòmers aïllats a diferents estadis del desenvolupament preimplantacional.

CÈL·LULES MARE EMBRIONÀRIES DE RATOLÍ DERIVADES DE L'EMBRIÓ SENCER

En el primer article on es va descriure l'obtenció de SCs de ratolí, Evans i Kaufman ja apuntaven que les mESCs s'establien de les cèl·lules de l'epiblast de l'embrió preimplantacional, ja que aquestes, a diferència de les cèl·lules de la ICM, tenien un patró d'expressió gènica similar al de les ECCs. Concretament, en el seu treball forçaven l'entrada dels embrions en diapausa per tal d'induir la formació de l'epiblast (*Evans and Kaufman, 1981*) (Figura 15).

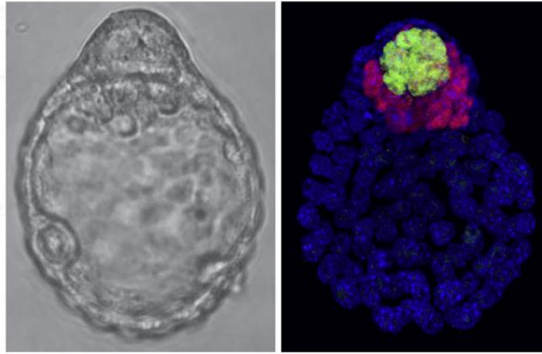


Figura 15 Embrions de ratolí a estadi de diapausa. A la imatge de l'esquerra s'observa l'epiblast prominent d'un embrió en diapausa. A la dreta s'observa un embrió en diapausa on les cèl·lules de la ICM expressen Oct4 (vermell) i les cèl·lules que donaran lloc a l'epiblast expressen Nanog (verd). Imatge de la dreta reproduïda de Nichols and Smith, 2012, copyright Cold Spring Harbor Laboratory Press. Imatge de la dreta reproduïda de *Cell Stem Cell*, volum 4, Nichols and Smith, *Naive and primed pluripotent states*, pàg 487-492, copyright (2009), amb permís d'Elsevier.

Apunt 3: la diapausa

La diapausa es una suspensió temporal del desenvolupament embrionari per tal de desajustar el temps entre l'aparellament i el part de manera que aquest últim es doni en el moment més adequat. La diapausa es dona de manera natural en més de 130 espècies de mamífers, tot i que no s'ha pogut demostrar que es doni en humans (Ptak et al., 2013; Fenelon et al., 2014). La diapausa també es pot induir artificialment retirant la disponibilitat d'estrògens dels embrions a l'estadi de mòrula. Els embrions en diapausa presenten un epiblast prominent, que es pot separar del TE i endoderma primitiu (PE) per tal d'augmentar l'eficiència de derivació de línies de mESC. Es coneix que en els embrions de soques permissives en estadi de diapausa, les cèl·lules de l'epiblast es divideixen més de pressa, mentre que en els embrions de soques refractàries la diapausa indueix un augment de les cèl·lules del PE (Kawase et al., 1994; Brook and Gardner, 1997; Batlle-Morera et al., 2008).

Durant anys, múltiples grups de recerca han establert línies de mESCs a partir de les cèl·lules de l'epiblast preimplantacional, donant suport a la idea que aquesta estructura embrionària és la font i l'equivalent in vivo de les mESCs (Kawase et al., 1994; Brook and Gardner, 1997; Batlle-Morera et al., 2008; Nichols and Smith, 2009; Czechanski et al., 2014).

En aquesta mateixa línia, Boroviak i col·laboradors van descriure que el patró d'expressió gènica de cèl·lules aïllades de diferents línies de mESCs cultivades en 2i, condició que afavoreix la pluripotència *naïve*, és similar al de les cèl·lules de l'epiblast de l'embrió preimplantacional. Ells mateixos van voler derivar línies de mESCs a partir de blastòmers aïllats d'embrions a estadi de 8 cèl·lules i mòrula i a partir de cèl·lules aïllades de la ICM i l'epiblast preimplantacional en presència de 2i i LIF, i tant sols van aconseguir establir línies de mESCs a partir de cèl·lules de la ICM i l'epiblast preimplantacional. L'eficiència de derivació va ser màxima a partir de cèl·lules aïllades de l'epiblast (més del 50%), confirmant que és la millor font de cèl·lules de pluripotència *naïve* (Boroviak et al., 2014).

Malgrat aquestes observacions, s'ha aconseguit derivar amb èxit línies de mESCs a partir d'embrions en estadis anteriors del desenvolupament preimplantacional. Concretament, s'han establert línies de mESCs a partir d'embrions a l'estadi de zigot, dues, quatre i vuit cèl·lules, mòrules i blastocists primerencs (Eistetter, 1989; Tesar, 2005; González et al., 2010; Lee et al., 2012).

La derivació de línies de mESCs a partir d'embrions en diferents estadis del desenvolupament preimplantacional no altera les característiques de les mESCs resultants, suggerint que un cop sembrat, l'embrió podria progressar fins a un estadi del desenvolupament (suposadament l'epiblast de l'embrió preimplantacional) des del qual donaria lloc a les mESCs (Nichols and Smith, 2012; Boroviak et al., 2014).

CÈL·LULES MARE EMBRIONÀRIES DE RATOLÍ DERIVADES DE BLASTÒMERS AÏLLATS

A banda de descriure que les línies de mESCs es podien establir d'embrions previs a l'estadi de blastocist, Eistetter va descriure que era possible derivar SCs a partir de blastòmers aïllats d'una mòrula disgregada. D'aquesta manera va plantejar la possibilitat de no dependre d'un embrió sencer per a començar el procés de derivació (Eistetter, 1989). La utilització d'una part de l'embrió per a començar un procés de derivació de mESCs, en no condicionar la viabilitat de l'embrió afectat, permet conservar els embrions i establir línies de mESCs simultàniament. D'altra banda, la utilització per separat de tots els blastòmers d'un embrió, si bé que implica la seva destrucció, permet minimitzar el nombre d'embrions necessaris per a dur a terme processos de derivació de mESCs i maximitzar les opcions

d'establir línies de mESCs a partir d'un embrió determinat. Totes aquestes opcions són especialment interessants quan l'objectiu és aplicar aquest procediment a l'espècie humana. Amb tot, optimitzar l'obtenció de línies de mESCs a partir de blastòmers aïllats també és un avantatge per a l'ús d'embrions valuosos d'altres espècies de mamífers.

D'altra banda, l'any 1990 es va desenvolupar el diagnòstic genètic preimplantacional (DGP). Aquesta tècnica, àmpliament aplicada actualment a les clíniques de reproducció assistida, permet biopsiar un o dos blastòmers d'un embrió a estadi de 8 cèl·lules sense condicionar la viabilitat de l'embrió (Figura 16), per tal d'analitzar el seu contingut genètic abans de la transferència (Hardy *et al.*, 1990).

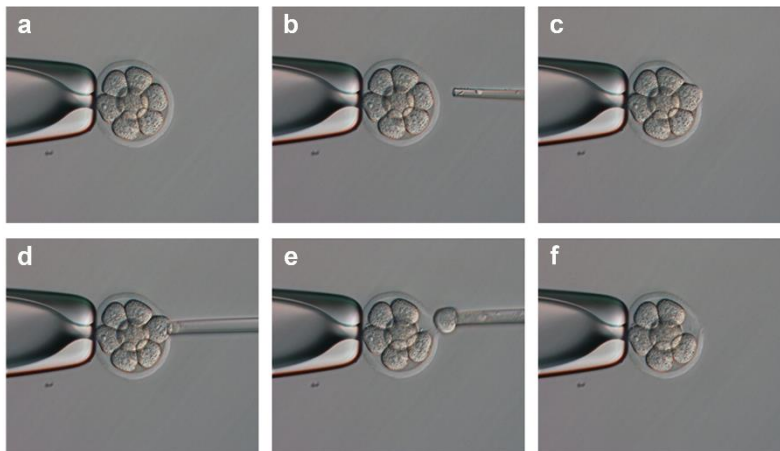


Figura 16 Imatges de la seqüència d'una biòpsia d'un embrió de ratolí a estadi de 8 cèl·lules.

Gràcies al DGP i al coneixement que els blastòmers aïllats d'embrions a 2 (1/2), 4 (1/4) i 8 (1/8) cèl·lules es poden seguir desenvolupant normalment fins a formar pseudoblastocists o estructures inicials del desenvolupament embrionari postimplantacional (Tarkowski and Wróblewska, 1967; Rossant, 1976), Delhaise i col·laboradors van establir la primera línia de mESCs a partir de blastòmers 1/8, utilitzant les condicions de cultiu estàndard descrites per Evans i Kaufman ref aquí i l'addició de LIF (Evans and Kaufman, 1981; Delhaise *et al.*, 1996). Malgrat tot, en aquest treball sembraven tots els blastòmers aïllats d'un mateix embrió en un únic pou i no es pot descartar que, un cop sembrats, varis blastòmers s'ajuntessin i comencessin junts el procés de derivació. Aquest treball es va realitzar amb

blastòmers de fons genètic permissiu provinents de la soca 129S2. L'any 2006 el grup liderat pel Dr. Lanza va aconseguir establir línies de mESCs co-cultivant els blastòmers 1/8 de la mateixa soca agregats a una colònia de mESCs ja establerta que expressava constitutivament la proteïna fluorescent verda (GFP), cosa que permetia distingir les SCs dels dos llinatges. Malgrat el co-cultiu i l'addició al medi de LIF i un inhibidor de la via de les MAPK, l'eficiència de derivació del procés es va mantenir baixa (4%) (*Chung et al., 2006*). Altres estudis han intentat millorar l'eficiència de derivació de mESCs a partir de blastòmers aïllats cultivats en condicions estàndard, utilitzant múltiples estratègies com ara iniciar el procés de derivació a partir de blastòmers aïllats d'embrions a estadis embrionaris primerencs (1/2 o 1/4). Si bé és cert que s'han aconseguit eficiències de derivació més elevades, arribant al 69% a partir de blastòmers 1/2 i al 40% a partir de blastòmers 1/4 (*Wakayama et al., 2007; Lorthongpanich et al., 2008; González et al., 2010; Lee et al., 2012*), la biòpsia de blastòmers en estadis primerencs del desenvolupament embrionari pot condicionar la viabilitat de l'embrió resultant, ja que suposa una retirada de, com a mínim, el cinquanta o el vint-i-cinc per cent del citoplasma de l'embrió a dues i quatre cèl·lules, respectivament.

Una altra alternativa per a millorar la derivació de línies de mESCs establertes a partir de blastòmers 1/8, aïllats de soques permissives, va ser substituir els sèrums bovins pel KSR i afegir al medi els primers 24 aminoàcids de la ACTH. Aquestes modificacions van permetre augmentar l'eficiència de derivació fins a un 14% (*Wakayama et al., 2007*). Partint d'aquesta base, es van afegir al cultiu molècules quimèriques formades per la regió extracel·lular de l'E-CADHERINA (aminoàcids 1-709) conjugada amb la regió constant (Fc) de la IgG humana. Les molècules d'E-CADHERINA quimèrica, presents al cultiu durant les primeres 24 hores, s'unien a les E-CADHERINES natives del blastòmer que havien quedat exposades després de la biòpsia i induïen així un patró de senyalització similar al que rep un blastòmer 1/8 quan forma part de l'embrió. Aquest tractament va permetre incrementar l'eficiència de derivació fins a un 33,6% (*González et al., 2011*). D'altra banda, es van cultivar blastòmers 1/8 en medi suplementat amb KSR afegint-hi els moduladors de les vies de senyalització 2i, obtenint una eficiència de derivació de l'11,4% (*Lee et al., 2012*).

Finalment, trobem un estudi totalment diferent en el que Hassani i col·laboradors treballen amb blastòmers aïllats d'embrions de soques refractàries, com són BALB i NMRI. En aquest cas van cultivar els blastòmers en un medi lliure de sèrum

suplementat amb el complex proteic N2B27 i els van tractar amb 2i, obtenint una eficiència de derivació al voltant del 25%. A més, quan van utilitzar el còctel R2i van obtenir eficiències encara més altes, arribant al 50% de línies establertes a partir de blastòmers 1/8 (*Hassani et al., 2014b*).

D'entre tots els estudis realitzats, queda clar que per a derivar línies de mESCs a partir de blastòmers 1/8 aïllats és essencial la presència de cèl·lules nodradores, ja que els estudis que han provat de sembrar blastòmers aïllats en superfícies cobertes de gelatina mostren que els blastòmers no progressen o bé donen lloc a cúmuls de cèl·lules vacuolades (*Boroviak et al., 2014; Hassani et al., 2014a*).

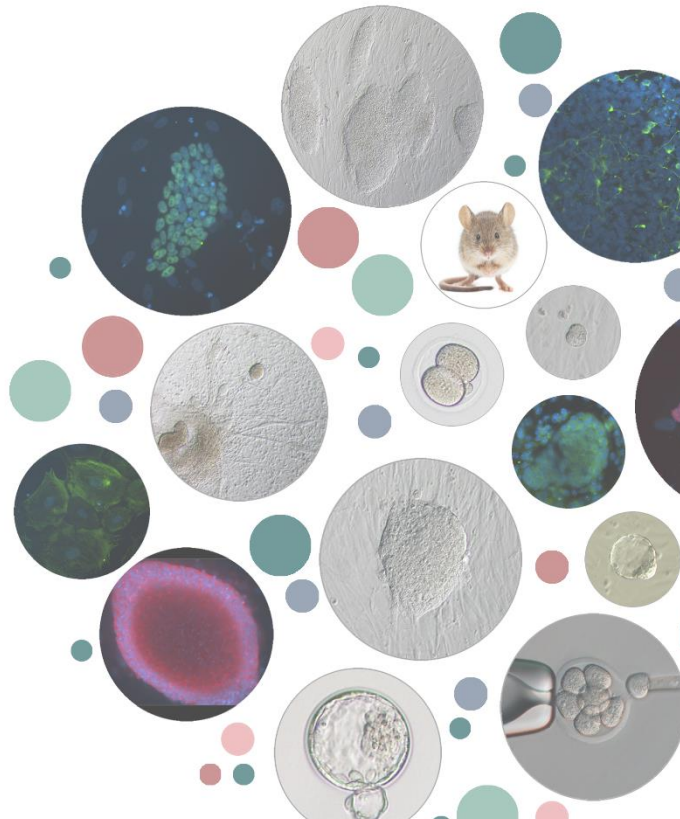
Tenint en compte tots els estudis en que es deriven SCs a partir de blastòmers aïllats d'embrions de ratolí, és molt difícil determinar quin dels tractaments aplicats és més eficient, ja que en cadascun d'ells s'utilitzen embrions de diferents fons genètics, s'utilitzen diferents suplementes del medi o bé s'afegeixen o no moduladors de les vies de senyalització. Per això no queda clar quina és la importància de cadascuna de les variables en aquest procés.

El principal objectiu d'aquesta tesi doctoral és conèixer quin és l'efecte de les vies de senyalització de Wnt i MAPK en la derivació de línies de mESCs a partir de blastòmers aïllats per tal de millorar l'eficiència d'aquest procés.

Per tal d'aconseguir aquest objectiu principal, s'han plantejat els següents objectius parcials:

1. Avaluar si les condicions de derivació i cultiu utilitzades per a línies de mESCs derivades a partir d'embrions sencers són aplicables a línies de mESCs derivades a partir de blastòmers aïllats.
2. Determinar quines són les millors condicions pel que fa al fons genètic de la soca donadora d'embrions, els suplementes del medi de cultiu i el tractament amb molècules moduladores de les vies de senyalització per a establir línies de mESCs a partir de blastòmers aïllats.
3. Optimitzar l'ús de les molècules moduladores de les vies de senyalització PD0325901, CHIR99021 i IWR-1-endo en la derivació i cultiu de línies de mESCs establertes a partir de blastòmers aïllats.
4. Estudiar quin estat d'activitat de les vies de senyalització de Wnt i MAPK és més favorable per a la derivació de línies de mESCs a partir de blastòmers aïllats.
5. Investigar quines implicacions té l'estat d'activitat de les vies de Wnt i MAPK en el tipus de pluripotència *naïve* i *primed* de les mESCs derivades a partir de blastòmers aïllats.

3. RESULTATS



3.1 Genetic background, medium supplements and signaling modulators differently affect mouse embryonic stem cells derivation from whole embryos and single blastomeres

Genetic background, medium supplements and signalling modulators differently affect mouse embryonic stem cell derivation from whole embryos and single blastomeres

Short title:

Variables affecting mouse embryonic stem cell derivation from single blastomeres

Marta Vila-Cejudo¹, Ot Massafret¹, Josep Santaló¹ and Elena Ibáñez^{1*}

¹Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain

*corresponding author

elena.ibanez@uab.cat (EI)

Abstract

Mouse Embryonic Stem Cell (mESC) derivation requires that the pluripotency of the embryos and the subsequent outgrowths is maintained under in vitro conditions. The genetic background of the embryos, the culture medium supplements and the presence of modulators of signalling pathways, such as 2i, have been reported as key factors for pluripotency maintenance. However, most mESC derivation studies have been performed with whole embryos, and little is known about the influence of these factors when mESC are derived from isolated blastomeres. Using different culture media (supplemented with KSR or N2B27), embryos from permissive and non-permissive backgrounds and the presence or absence of 2i treatment, we have analysed the effect of these variables on mESC derivation from single blastomeres isolated from eight-cell embryos. Whole embryos at the blastocyst stage were used as controls. Our results show that in control whole embryos, high mESC derivation efficiencies (>70%) were obtained only from permissive backgrounds and with the use of medium supplemented with KSR. Addition of 2i could compensate for the differences due to culture medium or genetic background, resulting in high derivation rates (75.9–96.9%) in all conditions. By contrast, only blastomeres isolated from embryos from a permissive background cultured in medium supplemented with KSR complemented with 2i were successful in the derivation of mESC lines (22.9–24.5%). Moreover, we report for the first time that B6CBAF2 embryos behave as permissive in terms of mESC derivation. Our results suggest that single blastomeres have higher requirements than whole blastocysts for pluripotency maintenance and mESC derivation. Moreover, the need for 2i suggests that the modulation of signalling pathways to recreate a commitment towards ICM could be essential to start the derivation process from a single blastomere.

Introduction

Embryonic stem cells (ESC) are pluripotent cells established from preimplantation embryos, which retain their ability to self-renew or differentiate into specific cell types (Biswas and Hutchins, 2007). Due to these properties, ESC have a unique potential for regenerative medicine, disease modelling and animal engineering (Weinberger *et al.*, 2016).

Traditionally, ESC have been derived from the inner cell mass of embryos at the blastocyst stage (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981; Thomson *et al.*, 1998) or at earlier stages of development, from zygote to morula (Eistetter, 1989; Tesar, 2005; Lee *et al.*, 2012). However, the use of whole embryos to establish ESC in humans entails some controversy due to the need for embryo destruction. To circumvent the ethical concerns, ESC can be alternatively established from single blastomeres (Delhaise *et al.*, 1996; Chung *et al.*, 2006, 2008; Klimanskaya *et al.*, 2006), taking advantage of embryo biopsy procedures routinely used in preimplantation genetic diagnosis (PGD) (Handyside *et al.*, 1990) and the knowledge that both isolated blastomeres and biopsied embryos retain their developmental potential (Chung *et al.*, 2008). Using this approach, autologous ESC lines could be produced for children born from PGD embryos. On the other hand, the separate use of all the blastomeres from an embryo to initiate the ESC derivation process, though still involving embryo destruction, could increase the probability of obtaining an ESC line from a particular embryo (González *et al.*, 2011). This, in turn, could also lead to a reduction in the number of embryos used for ESC derivation, a relevant point not only for human embryos but also for highly valuable embryos from other mammalian species.

Although ESC lines have been successfully derived from both mouse and human single blastomeres, the derivation efficiencies are typically much lower than those achieved from whole embryos (Wakayama *et al.*, 2007; Lorthongpanich *et al.*, 2008b; González *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2012; Tai *et al.*, 2013). In the mouse, where the majority of studies have been performed, derivation of ESC from single blastomeres biopsied from embryos at the 2-, 4- and 8-cell stages indicated that the derivation efficiency gradually declines with increasing embryo developmental age, due to a progressive reduction in cytoplasmic volume and/or increase in the degree of cell fate commitment (Wakayama *et al.*, 2007). Thus, in terms of derivation efficiencies, the use of blastomeres from early embryos would be recommended. However, in terms of embryo viability, the best option would be to use one single blastomere from an 8-cell embryo (1/8 blastomere). In general, though, ESC derivation efficiency from 1/8 mouse blastomeres cultured under standard conditions is low, reaching only 14% in the best of cases (Wakayama *et al.*, 2007). Therefore, derivation of ESC lines from single blastomeres must be optimized.

ESC derivation is a complex process depending on several factors, which have been extensively studied in the derivation of mouse ESC (mESC) from whole blastocysts (Czechanski *et al.*, 2014). Among them, the genetic background (strain) of the embryos, the supplements added to the culture media and the use of modifiers of signalling pathways seem to play a major role, aside from the use of feeder cells.

According to their ability to yield mESC, mouse strains can be classified into permissive strains, such as 129S2 and C57BL, which allow high efficiencies of mESC establishment, and non-permissive strains, like CBA, NOD and FVB, which are refractory to this process (Kawase *et al.*, 1994; Brook and Gardner, 1997). Despite the wide use of hybrid strains like B6D2F1 and B6CBAF1 in procedures such as somatic cell nuclear transfer (Wakayama *et al.*, 1998; Gao *et al.*, 2003; Mallol *et al.*, 2015), these strains have seldom been used for mESC derivation (Wakayama *et al.*, 2001; Costa-Borges *et al.*, 2011; Lee, 2013) and their permissiveness for mESC derivation is yet unclear. The case of the B6CBAF1 strain is particularly interesting as it is a cross between a female from a permissive strain (C57BL) and a male from a non-permissive strain (CBA). Hence, its classification in terms of permissiveness to establish mESC could shed some light on the relative importance of the two genetic backgrounds on ESC derivation.

Regarding culture media supplements, the addition of serum or a serum substitute is required to efficiently support mESC derivation. Foetal Calf Serum (FCS) contains growth factors that support self-renewal (Kawase *et al.*, 1994; Lee, 2013). However, it may also contain potential differentiation factors and, consequently, only validated batches of FCS can be used for stem cell culture (Lee, 2013; Czechanski *et al.*, 2014). Alternatively, the derivation medium can be supplemented with KnockOut Serum Replacement (KSR), a more defined FCS-free formulation but that also presents batch-to-batch variability and needs to be tested (Cheng *et al.*, 2004; Chaudhry *et al.*, 2008). To circumvent this limitation, the protein complex N2B27 has been used as a serum substitute, though it only supports derivation and self-renewal of mESC in the presence of certain signalling modulators. Otherwise, N2B27-supplemented medium induces the differentiation of stem cells to neural precursors (Ying and Smith, 2003).

Indeed, the modulation of signalling pathways has also proved to be essential for successful mESC derivation and culture. The first modulator used was Leukaemia

Inhibitory Factor (LIF), which supports self-renewal and improves mESC maintenance (Smith *et al.*, 1988; Williams *et al.*, 1988). More recently, the cocktail of inhibitors known as 2i, comprising the glycogen synthase kinase 3 (GSK3) inhibitor CHIR99021 and the Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) kinase (MEK) inhibitor PD0325901 has allowed the derivation of mESC from various mouse strains in several culture media without the need for LIF or feeder cells (Ying *et al.*, 2008). Yet, the combination of LIF with 2i has been shown to further enhance mESC derivation rates and clonal expansion (Tamm *et al.*, 2013), and the addition of feeder cells improves derivation efficiency, promotes colony attachment and enhances karyotypic stability (Czechanski *et al.*, 2014). On the other hand, the dual inhibition of MEK by PD0325901 and of transforming growth factor β (TGF β) by SB431542, known as R2i, has also allowed the derivation of mESC from both permissive and non-permissive strains in the presence of serum and LIF with an impressive efficiency of 100% (Hassani *et al.*, 2012).

Despite the wide knowledge about the conditions to efficiently derive mESC from whole blastocysts, little is known about the impact of these conditions when mESC are established from isolated blastomeres. The majority of studies in which mESC are derived from 1/8 blastomeres use 129S2 inbred or hybrid embryos cultured in medium supplemented with FCS or KSR and in the presence of feeder cells. But, in the absence of signalling modulators other than LIF, the derivation rates are extremely low (Delhaise *et al.*, 1996). Addition of MEK inhibitor or the adrenocorticotrophic hormone (ACTH), which supports clonal propagation of mESC (Ogawa *et al.*, 2004), led to an increase in derivation efficiencies to 4–14% (Chung *et al.*, 2006; Wakayama *et al.*, 2007; González *et al.*, 2010), though these efficiencies are still much lower than those obtained from whole blastocysts. Similarly, the combination of LIF and 2i in medium supplemented with KSR resulted in derivation rates of 14% from 1/8 blastomeres from the C57BL permissive strain (Lee *et al.*, 2012). By contrast, addition of chimeric E-cadherin (González *et al.*, 2011) or the R2i cocktail (Hassani *et al.*, 2014a) to the culture medium has allowed the highest derivation efficiencies obtained so far from 1/8 blastomeres. In the first case, 129S2 \times C57BL blastomeres were cultured in medium supplemented with LIF, ACTH and chimeric E-cadherin molecules, which were observed to adhere to the blastomeres surface and caused an increase of the mESC derivation rate to 33.6% (González *et al.*, 2011). In the other study, 1/8 blastomeres from the non-permissive strains NMRI and BALB were cultured in N-medium supplemented with LIF and either 2i or R2i, and exceptionally high

derivation rates were reported, ranging from 23–25% under 2i conditions to 46–50% under R2i conditions (Hassani *et al.*, 2014a).

The scarcity of papers dealing with the derivation of mESC from 1/8 blastomeres, relative to the use of whole embryos, as well as the variation in mouse strains, media supplements and signalling modulators between studies often hinder the comparison of the results obtained. On the other hand, the general rule has been to attempt mESC derivation from single blastomeres using the same protocols developed for whole embryos. However, it is not clear whether the requirements for pluripotency maintenance and self-renewal are the same and whether the effect of the genetic background and culture conditions is similar in single blastomeres and in whole embryos. In this context, in the present study we have followed a systematic approach to analyse the impact of the genetic background, culture media supplements and signalling modulators on the derivation of mESC from 1/8 blastomeres and control blastocysts. Specifically, we used embryos from three different strains of mice (permissive hybrid 129S2 x C57BL, non-permissive inbred CBA and hybrid B6CBAF2, of unknown permissiveness), which were cultured in the most common conditions for mESC derivation from whole blastocysts, i.e. either medium containing KSR (K-medium) or a medium containing N2B27 (N-medium) and in the presence or absence of 2i.

Materials and Methods

Feeder cells culture

Human Foreskin Fibroblasts-1 (HFF-1; ATCC®SCRC-1041™) were inactivated with 10 µg/ml mitomycin C (Serva) for three hours to produce feeder cells. The medium used for HFF-1 inactivation and feeder cell culture was Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; BioWest) supplemented with 10% FCS (BioWest).

Feeder cells were cultured on 4-well plates for the derivation of mESC from whole embryos and for stem cell culture maintenance. Instead, feeder cells were cultured in 50 µl microdrops covered with mineral oil (Sigma) in a 60 mm Petri dish for the derivation of mESC from single blastomeres.

Embryo collection

Mouse care and procedures were conducted according to the protocols approved by the Ethics Committee on Animal and Human Research of the Universitat Autònoma de Barcelona and by the Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca i Alimentació of the Generalitat de Catalunya (ref. 8741).

Embryos were collected from 6–12 weeks old females from three different strains: 129S2 females mated with C57BL males (Charles River Laboratories), B6CBAF1 females mated with males from the same hybrid strain (Charles River Laboratories) and CBA females mated with males from the same strain (Harlan Laboratories). Due to their poor breeding efficiency and an unresponsive nature (Batlle-Morera *et al.*, 2008), 129S2 females were mated with C57BL males in order to improve embryo production and quality by hybrid vigour (Nagy *et al.*, 2003).

Prior to mating, females' superovulation was induced by intraperitoneal injection of 5 IU Pregnant Mare's Serum Gonadotropin (Foligon) followed by the injection of 5 IU human Chorionic Gonadotropin (hCG; Divasa-Farmavic) 48 h later.

Embryos were collected at the 2-cell stage, 48 h after the hCG injection, by flushing the oviducts with HEPES-buffered CZB medium (Chatot *et al.*, 1989). They were then cultured in equilibrated KSOMaag Evolve® medium (Zenith Biotech) supplemented with 4 mg/ml bovine serum albumin (BSA; Sigma) at 37°C and 5% CO₂ until the 8-cells or blastocyst stage.

Blastomere isolation

Blastomeres of 8-cell embryos were isolated by micromanipulation in PBS (Sigma) supplemented with 1% BSA. Using a 10 µm diameter pipette containing acidic Tyrode's solution (Nagy *et al.*, 2003), the zona pellucida was drilled and blastomeres were individually aspirated with a 20 µm diameter biopsy pipette.

In order to avoid biased results due to a possible blastomere commitment at the 8-cell stage or to embryo origin, all the blastomeres from each embryo were isolated and blastomeres from different embryos were pooled together before starting the derivation process.

Establishment of embryonic stem cell lines and culture maintenance

Mouse ESC lines were derived using either K-medium or N-medium. The K-medium consisted of DMEM supplemented with 100 μ M 2- β mercaptoethanol (Gibco), 1x non-essential amino acids (Gibco), 50 U/ml penicillin and 50 μ g/ml streptomycin (Gibco), 20% KSR (Life Technologies) and 10³ U/ml Leukemia Inhibitory Factor (LIF; Merk Millipore). The N-medium was composed of a 1:1 mixture of DMEM-F12 (Gibco) and neurobasal medium plus 100x N2 (Gibco), 50x B27 (Gibco) and 1 mM L-glutamine (Gibco), and was supplemented with 50 μ M 2- β mercaptoethanol, 1x non-essential amino acids, 10³ U/ml LIF, 50 U/ml penicillin and 50 μ g/ml streptomycin. When indicated, these media were also supplemented with the 2i inhibitor cocktail (Ying *et al.*, 2008), a combination of the MEK inhibitor PD0325901 (Axon Medchem; 1 μ M) and the GSK3 inhibitor CHIR99021 (Axon Medchem; 3 μ M).

Blastocysts were seeded on a monolayer of feeder cells in 4-well plates after removing their zona pellucida with acidic Tyrode's solution. They were cultured at 37°C and 5% CO₂ in K-medium or N-medium, with or without 2i treatment, changing the medium every 48 h. Stem cell lines were weekly subcultured and maintained for 6 passages.

Single blastomeres were seeded on a monolayer of feeder cells in 50 μ l microdrops of K- or N-medium with or without the 2i treatment. In all cases, the medium was supplemented with 0.1 mg/ml ACTH (Prospec). Blastomeres were cultured at 37°C and 5% CO₂, changing the medium every 24–48 h for 7–9 days until outgrowths were observed. At the first subculture, outgrowths were seeded on feeder cells in 4-well plates with K- or N-medium alone or in the presence of 2i. Mouse ESC lines were cultured for six passages at 37°C and 5% CO₂ changing the medium every 48 h and weekly subculturing them.

Stem cell lines characterization

Putative mESC stem cell lines were first selected according to their morphology, choosing only the lines containing colonies with defined edges.

At the seventh passage, their stemness and differentiation potential was assessed by immunofluorescence. First, mouse monoclonal anti-Oct4 (Santa Cruz, ref. Sc-5279, 1:50 dilution, antibody registry AB_628051) and rabbit polyclonal anti-

Sox2 (Merck Millipore, ref. AB5603, 1:200 dilution, antibody registry AB_2286686) antibodies were used to detect pluripotency markers. Next, putative mESC lines were subjected to *in vitro* differentiation by culturing them in DMEM supplemented with 10% FCS in feeder-free conditions for 10 days and mouse monoclonal anti-Tubulin β 3 (Tuj1; Biolegend, ref. MMS-435P, 1:500 dilution, antibody registry AB_2313773), mouse monoclonal anti- α smooth muscle actin (α SMA; Sigma, ref. A5228, 1:200 dilution, antibody registry AB_262054) and mouse monoclonal anti-alpha-fetoprotein (AFP; R&D Systems, ref. MAB1368, 1:50 dilution, antibody registry AB_357658) antibodies were used to detect ectoderm, mesoderm and endoderm differentiation markers, respectively. Due to the resistance of mESC lines cultured in presence of 2i to undergo spontaneous differentiation, 2i was removed from the culture medium a week before starting the differentiation process in order to diminish the strong pluripotency signalling and ease colonies differentiation.

Secondary antibodies were anti-mouse IgG Alexa Fluor 488 (Molecular Probes – Invitrogen, ref. A-21200, 1:500 dilution) for Oct4, Tuj1, α SMA and AFP, and anti-rabbit IgG Alexa Fluor 594 (Molecular Probes – Invitrogen, ref. A-11037, 1:500 dilution) for Sox2. All the antibodies were diluted in a PBS-based solution containing 0.2% sodium azide (Sigma), 0.1% Triton X-100 (Sigma) and 3% goat serum (BioWest).

For immunofluorescence analysis, putative mESC lines cultured on glass coverslips were fixed in 4% paraformaldehyde (Sigma) during 20 min at room temperature (RT) and washed three times with PBS for 5 min/each at RT. Samples were blocked and permeabilized with a PBS solution containing 0.2% sodium azide, 0.5% Triton X-100 and 3% goat serum for 30 min at 37°C. Primary antibodies were incubated overnight at 4°C. Then, samples were washed three times with PBS for 5 min and incubated with secondary antibodies for 2 h at RT. Samples were washed again three times with PBS for 5 min, and the nuclear material was counterstained with 10 μ g/ml Hoechst 33258 (Molecular Probes – Invitrogen) diluted in Vectashield (Vector Laboratories). Finally, samples were mounted and analysed with an epifluorescence microscope (Olympus BX61) and the Cytovision software (Applied Imaging, Inc).

Statistical analysis

In the derivation experiments from whole embryos, 30 blastocysts from each mouse strain were used for each treatment and culture condition, with at least three experimental replicates. In the derivation experiments from single blastomeres, the same criteria were applied but every group consisted of a minimum of 140 blastomeres. In both cases, the derivation efficiency was calculated as the number of mESCs lines obtained divided by the number of whole blastocysts or isolated blastomeres seeded under the different conditions described mESC. Only the mESCs lines that were positive for the two pluripotency markers assessed and that, after *in vitro* differentiation induction, were also positive for the three differentiation markers analysed, were considered as true mESC lines and were used for the calculation of derivation efficiencies.

Results were analysed with χ^2 and Fisher exact test using GraphPad Prism software. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

In this study, we generated a total of 345 lines with a stem-cell like morphology after 6 weeks of culture: 233 lines from whole blastocysts and 112 lines from single 1/8 blastomeres. All the putative mESC lines generated were positive for the pluripotency and differentiation markers (Fig 1) and were considered true mESC lines, except one line derived from a single B6CBAF1 blastomere cultured in K-medium. This line was discarded and was not considered in the statistical analyses.

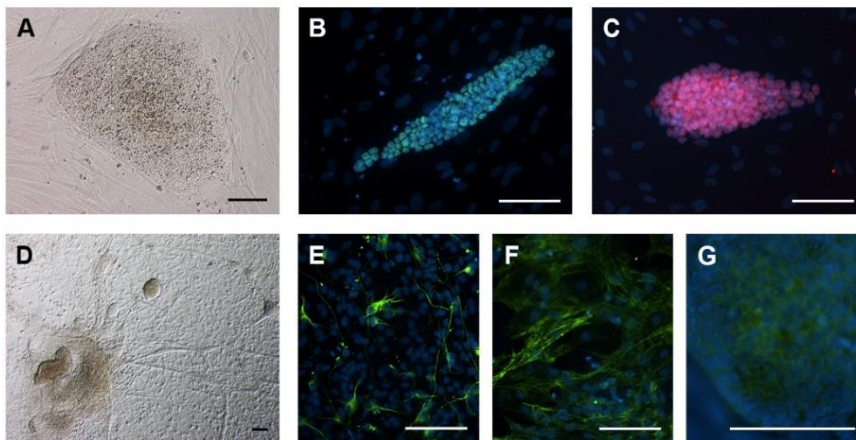


Fig 1. Immunofluorescence detection of pluripotency and differentiation markers in putative mESC lines derived from whole blastocysts. (A) Putative mESC line cultured for six passages, showing a stem cell-like morphology and defined edges. (B, C) mESC colonies expressing Oct4 (B, green) and Sox2 (C, red). (D) Morphology of a mESC line after spontaneous in vitro differentiation induction for 10 days. (E, F, G) Differentiated mESC lines expressing Tuj1 (E, green), α SMA (F, green) and AFP (G, green). In all immunofluorescence images, nuclei are counterstained with Hoechst (blue). The scale bar corresponds to 100 μ m.

Genetic background and medium supplements affect mESC derivation from whole blastocysts

The first derivation experiments culturing whole blastocysts in K-medium without 2i treatment revealed that different batches of KSR produced very different results. The first batch of KSR tested resulted in mESC derivation efficiencies of 18.2% from 129S2 x C57BL embryos and 5.9% from B6CBAF2 embryos. With the second batch of KSR derivation efficiencies were significantly higher, reaching 73.1% for 129S2 x C57BL embryos (p -value=0.0034) and 77.4% for B6CBAF2 embryos (p -value<0.0001), which are similar to previous references (González *et al.*, 2010). Given these differences, the second batch of KSR was selected to perform the subsequent experiments. Our results confirm the need to validate every batch of KSR prior to use (Cheng *et al.*, 2004; Chaudhry *et al.*, 2008).

Blastocysts from the permissive strain 129S2 x C57BL cultured in K-medium yielded 74.3% of mESC lines, similar to the 77.4% achieved from B6CBAF2 blastocysts (Table 1). Both efficiencies significantly differed (p -value=0.0262 and p -value=0.0192, respectively) from the 46.9% of mESC lines derived from non-

permissive CBA blastocysts. These results indicate that B6CBAF2 must be considered a permissive strain in terms of mESC derivation.

Table 1. Derivation efficiencies of mESC established from whole blastocysts.

Mouse strain	K-medium		N-medium	
	NT	2i	NT	2i
129S2 x C57BL	74.3% (26/35) ^a	75.9% (22/29) ^a	3.1% (1/32) ^a	82.4% (28/34) ^a
B6CBAF1	77.4% (24/31) ^a	85.3% (29/34) ^a	9.4% (3/32) ^a	96.9% (31/32) ^a
CBA	46.9% (15/32) ^b	87.1% (27/31) ^a	3.2% (1/31) ^a	83.9% (26/31) ^a

NT refers to the group with No Treatment whilst 2i indicates the treatment with 2i.

Only statistical significance between different mouse strains in the same culture conditions is represented in the table. Different superscripts indicate significant differences.

As expected, blastocysts cultured in N-medium resulted in the lowest derivation efficiencies, ranging from 3.1% for 129S2 x C57BL embryos to 9.4% for B6CBAF2 embryos, with no statistical differences among strains (Table 1). These efficiencies were significantly lower than those achieved when culturing 129S2 x C57BL (p-value<0.0001), B6CBAF2 (p-value<0.0001) and CBA (p-value<0.0001) embryos in K-medium.

Addition of 2i abolishes the effect of the genetic background and medium supplements in mESC derivation from whole blastocysts

While the addition of 2i to K-medium did not significantly alter derivation rates from 129S2 x C57BL (75.9%) and B6CBAF2 (85.3%) embryos, it produced a significant increase in the non-permissive CBA strain (87.1%) when compared with the use of K-medium alone (p-value= 0.0011). As a result, derivation rates in K-medium containing 2i were similar among the three mouse strains used (Table 1), suggesting that the use of 2i is able to compensate for the differences due to the embryos genetic background. Moreover, in the preliminary experiments performed with the first batch of KSR, which was discarded for the subsequent experiments, we observed that the addition of 2i was also able to compensate for the low derivation efficiencies obtained with this batch of KSR. This suggests that the use of 2i may allow working with any batch of KSR without the need for testing.

Regarding the morphology of the colonies, in all strains mESC lines cultured in K-medium complemented with 2i presented a uniform colony morphology with a flat shape and defined edges (Fig 2A). By contrast, mESC lines cultured in K-medium without treatment presented a mixture of flattened colonies with defined

edges (Fig 2B) and colonies with peripheral differentiation signs (Fig 2C), requiring a careful selection in every passage in order to discard differentiated cells. The addition of 2i to N-medium allowed the derivation of 82.4% of mESC lines from 129S2 x C57BL embryos, 96.9% from B6CBAF2 embryos and 83.9% from CBA embryos, with no significant differences among strains (Table 1). These results were significantly higher than those achieved when culturing embryos in N-medium without 2i treatment, irrespectively of the mouse strain used (p -value <0.0001), indicating that 2i compensates for medium deficiencies. On the other hand, derivation rates in N-medium with 2i were similar to derivation rates in K-medium with 2i for all strains, but instead of the typical flat colonies observed in K-medium (Fig 2A), mESC colonies were dome-shaped in the N-medium (Fig 2D).

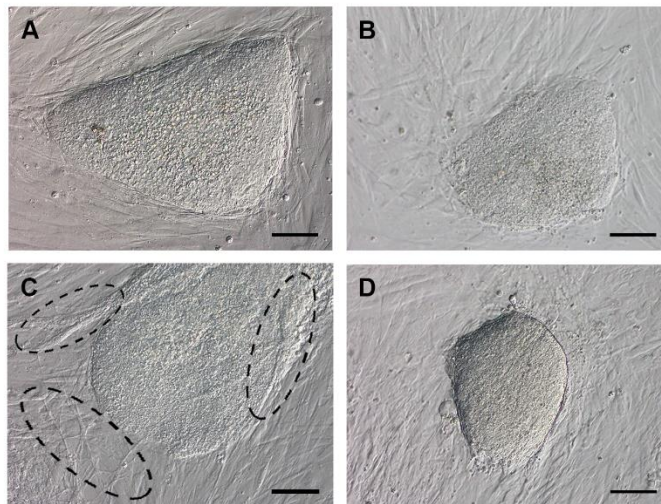


Fig 2. Morphology of mESC colonies derived from whole blastocysts. (A) mESC colony cultured in K-medium with 2i (passage 4), showing defined edges and a flat shape. (B–C) mESC colonies at passage 4 cultured in K-medium, presenting either defined edges (B) or peripheral differentiation signs, highlighted with dashed ellipses (C). (D) mESC colony at passage 6 cultured in N-medium with 2i, presenting defined edges and a dome shape. The scale bar corresponds to 100 μ m.

Derivation of mESC from single blastomeres

Single 1/8 blastomeres were seeded into culture medium microdrops containing feeder cells (Fig 3A) and their development was controlled until outgrowths were observed. Blastomeres required 24 h to undergo the first division into 2 cells (Fig 3B). On the second day of culture, blastomeres had divided into 8 to 16 cells (Fig

3C) and from the third day of culture onward they attached to the feeder cells and formed a small clump of cells (Fig 3D). The clump kept growing until forming an outgrowth on day 8, whose size and shape varied depending on the genetic background of the blastomere and the culture conditions (Fig 4A–F).

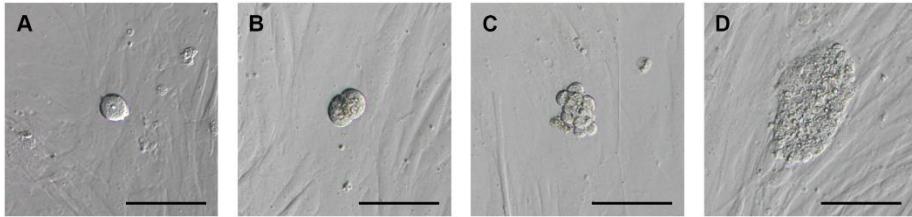


Fig 3. Division of 129Sv x C57BL single blastomeres. (A) Single blastomere seeded in K-medium. (B) Single blastomere cultured for 24 h in K-medium and divided into 2 cells. (C) Single blastomere cultured for 2 days in K-medium and divided into 8–16 cells. (D) Single blastomere cultured for 4 days in K-medium, forming a small cell clump. The scale bar indicates 100 μm .

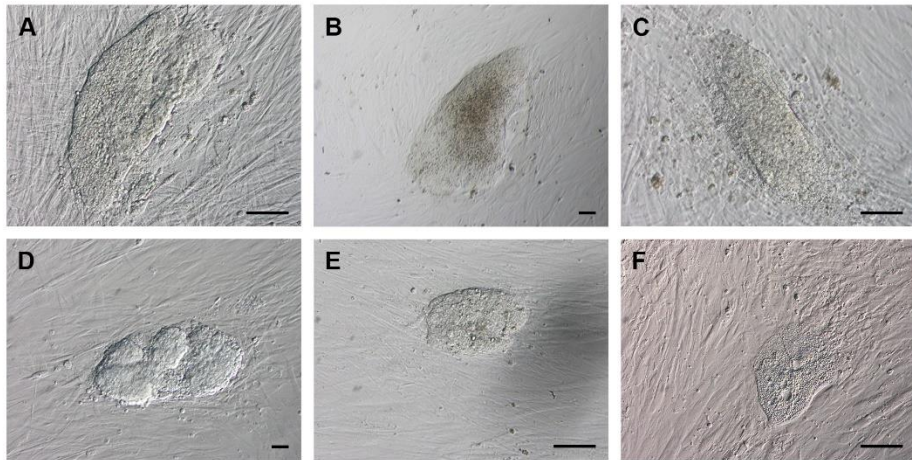


Fig 4. Outgrowth formation from single blastomeres. (A) Outgrowth from a 129S2 x C57BL blastomere cultured in K-medium. (B) Outgrowth from a 129S2 x C57BL blastomere cultured in K-medium with 2i. (C) Outgrowth from a CBA blastomere cultured in K-medium with 2i. (D) Outgrowth from a B6CBAF1 blastomere cultured in N-medium. (E) Outgrowth from a B6CBAF1 blastomere cultured in N-medium with 2i. (F) Non-progressive outgrowth from a CBA blastomere cultured in N-medium with 2i. The scale bar indicates 100 μm .

A permissive genetic background and the use of 2i are required to efficiently derive mESC from single blastomeres in K-medium

Isolated 129S2 x C57BL blastomeres cultured in K-medium without 2i treatment yielded 4.9% of mESC lines, equivalent to the 3.0% established from B6CBAF2 single blastomeres. By contrast, CBA blastomeres did not produce any mESC line (Table 2). Outgrowths from 129S2 x C57BL and B6CBAF2 blastomeres presented a flat shape and defined edges (Fig 4A).

Table 2: Derivation efficiencies of mESC established from single blastomeres from biopsied 8-cell embryos.

Mouse strain	K-medium		N-medium	
	NT	2i	NT	2i
129S2 x C57BL	4.9% (8/165) ^a	24.5% (38/155) ^a	3.6% (7/197) ^a	2.8% (5/178) ^a
B6CBAF1	3.0% (5/169) ^{a,b}	22.9% (35/153) ^a	0.7% (1/144) ^a	0.7% (1/143) ^a
CBA	0% (0/144) ^b	1.9% (3/162) ^b	1.9% (3/162) ^a	3.1% (5/162) ^a

NT refers to the group with No Treatment whilst 2i indicates the treatment with 2i.

Only statistical significance between different mouse strains cultured in the same conditions is represented in the table. Different superscripts indicate significant differences.

The addition of 2i to K-medium improved the establishment of mESC lines from 129S2 x C57BL and B6CBAF2 blastomeres, reaching similar derivation efficiencies (24.5% and 22.9%, respectively) that were significantly higher than those obtained in their counterpart blastomeres without 2i treatment (p -values < 0.0001). Again, both strains produced large flattened outgrowths with defined edges (Fig 4B). Contrarily, even though 3 mESC lines could be established from CBA blastomeres in K-medium with 2i, the derivation rate (1.9%) was not significantly different than in K-medium alone and was significantly lower than for blastomeres of the two permissive strains cultured in the same 2i conditions (p -value < 0.0001). Moreover, outgrowths produced from CBA blastomeres were smaller than outgrowths from 129S2 x C57BL and B6CBAF2 blastomeres, though with similar morphology (flat and with defined edges) (Fig 4C).

N-medium does not support mESC derivation from single blastomeres even in the presence of 2i

When blastomeres were cultured in N-medium without 2i treatment, similarly low derivation efficiencies were observed in the three strains, ranging from 0.7% to 3.6% (Table 2). These results were equivalent to those obtained in K-medium

without treatment for all strains. Outgrowths resulting from the culture of isolated blastomeres in N-medium without treatment were large and with defined edges, but often presented regions of varying thicknesses (Fig 4D). In fact, a prominent number of outgrowths initially emerged under these culture conditions (from 34.7% for B6CBAF1 blastomeres to 43.2% for 129S2 x C57BL blastomeres), but the vast majority of them tended to differentiate during the following passage resulting in a final low mESC derivation rate.

Contrarily to the results with whole blastocysts, the addition of 2i to N-medium did not compensate for the deficiencies of the culture media, and yielded very low derivation efficiencies, ranging from 0.7% to 3.1% (Table 2) and similar to those obtained in their non-treated counterparts. Consequently, derivation rates from single blastomeres cultured in the two different media supplemented with 2i were significantly different for the two permissive strains (p -value <0.0001), whilst similar for the non-permissive CBA strain.

Two types of outgrowths formed from blastomeres cultured in N-medium with 2i: flat outgrowths with defined edges (Fig 4E), which progressed and gave rise to mESC lines, and the more abundant (83.9% to 97.9%) small and extremely flattened outgrowths that presented non-defined edges and vacuolated cells (Fig 4F) and were non-progressive.

Addition of 2i after outgrowth formation is not sufficient to compensate for their massive differentiation in N-medium

To further investigate the origin of the massive differentiation at low passages of outgrowths cultured in N-medium without 2i treatment, the biggest outgrowths were split in two with the help of a scalpel before the first passage. One half was maintained in N-medium without treatment (NT group) while the other half was moved to N-medium with 2i (NT-2i group). From a total of 42 129S2 x C57BL, 35 B6CBAF2, and 10 CBA outgrowths in this new NT-2i group, only 5%, 5.7% and 0%, respectively, progressed to establish a mESC line. These derivation efficiencies were equivalent to those obtained in the NT group, suggesting that 2i addition after outgrowth formation is not sufficient to prevent the massive differentiation underwent by outgrowths from isolated blastomeres in N-medium.

Discussion

In this study, we have shown that the genetic background of the embryos, the culture medium supplements and the presence of modifiers of the activity of signalling pathways do not equally affect the derivation efficiency of mESC established from whole blastocysts and single blastomeres.

Unlike N-medium, K-medium enabled the establishment of mESC lines from whole blastocysts without requiring additional treatment. However, under these conditions, a significant variation in derivation efficiencies was manifested between 129S2 x C57BL permissive embryos and CBA non-permissive embryos. The derivation rate from B6CBAF2 blastocysts was equivalent to that obtained from 129S2 x C57BL embryos and, thus, the B6CBAF1 hybrid strain must be considered a permissive strain in terms of mESC derivation. As B6CBAF1 animals result from a cross between a female from the C57BL permissive strain and a male from the CBA non-permissive strain, this result could suggest that the permissive background is dominant over the non-permissive one. Alternatively, permissiveness to mESC derivation could be determined by the oocyte cytoplasm. However, this second hypothesis seems less probable because the derivation process takes place at the blastocyst stage, when almost all maternal inherited mRNAs are already degraded (Bachvarova and De Leon, 1980; Telford *et al.*, 1990), and after the expression of the paternal genome has already begun at the G2 phase of the 1-cell embryo (Bouniol *et al.*, 1995; Aoki *et al.*, 1997). Therefore, further experiments including exchanging the origin of the oocytes and spermatozoa between permissive and non-permissive strains would be required to elucidate which mechanism determines the permissiveness of the embryos from hybrid strains.

The differential permissiveness of mouse strains for the establishment of mESC has been recently attributed to a differential activation of intracellular signalling pathways in response to LIF in mESC with different genetic backgrounds. Specifically, permissive strains present a strong activation of the Jak-Stat3 pathway triggered by LIF, which promotes pluripotency and, in turn, causes the repression of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway, also activated by LIF, which promotes differentiation. In contrast, non-permissive strains show a weak activation of the Jak-Stat3 pathway and an hyperactivation of the MAPK pathway in response to LIF (Ohtsuka and Niwa, 2015). In this scenario,

it is not surprising that in our study the addition of 2i to the derivation medium was able to compensate for the differences due to the genetic background, as other authors have also previously reported (Ying *et al.*, 2008; Czechanski *et al.*, 2014). This effect is produced by the MEK inhibitor PD0325901, which downregulates MAPK activity irrespectively of the inherent ability of the embryo to do it. The addition of 2i also compensated for the differences due to the derivation medium used, allowing high rates of mESC derivation in the N-medium, equivalent to those obtained in the K-medium for all mouse strains.

Although the use of 2i is dispensable when culturing embryos from permissive strains, our results show that its addition simplifies mESC maintenance as it prevents colonies peripheral differentiation. Moreover, 2i is able to maintain pluripotency regardless of the genetic background of the embryos and the derivation medium used. In spite of this, we observed that the constant presence of 2i during culture hinders subsequent mESC lines spontaneous differentiation. In the same line, Gonzalez and co-workers have recently reported that ESC cultured in 2i retain the capacity to self-renew even when they are subjected to differentiation conditions, because they acquire an intrinsic signalling pattern during the long culture in presence of the small-molecule inhibitors (Gonzalez *et al.*, 2016). In view of the observations, 2i should be removed from the culture medium a week before inducing mESC differentiation.

To determine whether the requirements for mESC derivation from single 1/8 blastomeres are similar to those for mESC derivation from whole blastocysts, in terms of the variables analysed in the present study, blastomeres were next subjected to the same experimental conditions for mESC derivation, except for the additional presence of ACTH. This protein was added during the first week of culture because it supports single ESC culture (Ogawa *et al.*, 2004). Contrary to our observations in whole blastocysts, single blastomeres cultured in K-medium led to extremely low derivation efficiencies irrespectively of the mouse strain used. Therefore, despite the presence of ACTH and LIF, the K-medium was not sufficient to support mESC derivation from single blastomeres, even from the permissive strains.

Addition of 2i to K-medium significantly increased the derivation rates from 1/8 blastomeres, but only in the two permissive strains (5-fold increase for 129S2xC57BL and 7,6-fold increase for B6CBAF1). This increase might be related

to an effect of the 2i treatment on blastomere fate and their potential to yield mESC. In this sense, it has been reported that ERK, the downstream effector of the MAPK pathway, is expressed only at the apical surface of 8-cell-stage mouse embryos, and that Ras-MAPK signalling promotes trophectoderm (TE) differentiation. Inhibition of ERK by the MEK inhibitor PD98059 in 8-cell stage embryos attenuated Cdx2 expression, delayed blastocyst formation and reduced TE outgrowth from embryo explants, suggesting that Ras-MAPK signalling may have a role in the position-dependent segregation of TE and inner cell mass (ICM) at the 8-cell to morula transition (Lu *et al.*, 2008). According to these observations, the group of non-treated 1/8 blastomeres in our study could be more prone to TE formation than the group of 2i-treated ones, since the addition of 2i and the consequent inactivation of MEK and ERK could increase the number of 1/8 blastomeres diverted towards an ICM fate and potentially capable of generating an mESC line. In line with diverting blastomeres fate, it has been reported that isolated 1/8 blastomeres cultured in the presence of chimeric E-cadherin molecules yield significantly higher numbers of mESC lines than the non-treated blastomeres. The authors hypothesized that the adhesion of chimeric E-cadherin molecules to native E-cadherin molecules on the blastomere surface triggers a signalling pattern equivalent to that induced by the neighbouring blastomeres in intact 8-cell embryos (González *et al.*, 2011). Altogether, the previous and the present results seem to reinforce the idea that mimicking the signalling of the blastomeres committed to become ICM could improve the derivation of mESC lines from isolated blastomeres.

In whole blastocysts, addition of 2i improved mESC derivation rates regardless of the derivation medium used and the genetic background of the embryos. By contrast, in single blastomeres the 2i-induced improvement of the derivation efficiency was only observed when blastomeres from permissive strains were cultured in K-medium. These results indicate that the potential effect of the 2i treatment on blastomere fate described above may not be sufficient to sustain pluripotency and allow mESC derivation under N-medium culture or in a non-permissive genetic background. In particular, the results obtained with the two derivation media suggest an additive positive effect of the K-medium and the 2i treatment for mESC derivation from single blastomeres. Recently, Gonzalez and co-workers reported that mESC cultured in K-medium show an overexpression of genes related with cellular development and a repression of genes related with migration and differentiation, resulting in expression patterns similar to those of

two-cell embryos, and especially the ICM of early blastocysts. These changes were stronger in 2i conditions than in K-medium alone (Gonzalez *et al.*, 2016). Therefore, changes in gene expression induced by components of the K-medium and the 2i treatment, together with potential changes in blastomere fate induced by MEK inhibition and a suitable genetic background, might be key factors for the derivation of mESC from single blastomeres.

In contrast to our failure to efficiently obtain mESC from single blastomeres from the non-permissive CBA strain, Hassani *et al.* (Hassani *et al.*, 2014a) were able to establish around 25% of mESC lines from non-permissive BALB and NMRI 1/8 blastomeres cultured in N-medium complemented with 2i. However, they used an enriched N-medium, containing a higher concentration of N2 (2x) and 5 mg/ml BSA. Although our N-medium was highly effective, when combined with 2i treatment, for the derivation of mESC from whole blastocysts, it is tempting to speculate that single blastomeres would require an extra enriched medium to grow. On the other hand, in the same study, Hassani and co-workers report the best derivation rates obtained so far (46–50%) from single blastomeres culturing them with R2i (Hassani *et al.*, 2014a). Given these promising results, the use of an enriched N-medium and the addition of R2i could be considered for future studies.

Conclusions

Single blastomeres seem to be subjected to higher requirements than whole blastocysts in order to yield mESC lines, and only the combination of blastomeres from permissive strains (including B6CBAF2) cultured in K-medium complemented with 2i enabled a significant improvement of mESC derivation rates. Moreover, our results suggest that the modulation of signalling pathways to recreate a commitment towards ICM could be essential to efficiently derive mESC lines from single blastomeres.

Acknowledgments

We thank Jonatan Lucas for his technical assistance with feeder cell culture and the staff from *Servei Estabulari* from *Universitat Autònoma de Barcelona* for animal care.

References

1. Biswas A, Hutchins R. Embryonic stem cells. *Stem Cells Dev.* 2007;16(2):213–21.
2. Weinberger L, Ayyash M, Novershtern N, Hanna JH. Dynamic stem cell states: naive to primed pluripotency in rodents and humans. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016;17(3):155–69.
3. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature.* 1981;292:154–6.
4. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *PNAS.* 1981;78(12):7634–8.
5. Thomson JA, Itskovitz–Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998;282(5391):1145–7.
6. Eistetter HR. Pluripotent embryonal stem cell lines can be Established from disagggregated mouse moruale. *Development.* 1989;31(3):275–82.
7. Tesar PJ. Derivation of germ–line–competent embryonic stem cell lines from preblastocyst mouse embryos. *PNAS.* 2005;102(23):8239–44.
8. Lee K–H, Chuang C–K, Guo S–F, Tu C–F. Simple and efficient derivation of mouse embryonic stem cell lines using differentiation inhibitors or proliferation stimulators. *Stem Cells Dev.* 2012;21(3):373–83.
9. Delhaise F, Bralion V, Schuurbiers N, Dessy F. Establishment of an embryonic stem cell line from 8–cell stage mouse embryos. *Eur J Morphol.* 1996;34(4):237–43.
10. Klimanskaya I, Chung Y, Becker S, Lu SJ, Lanza R. Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres. *Nature.* 2006;444(7118):481–5.
11. Chung Y, Klimanskaya I, Becker S, Marh J, Lu S–J, Johnson J, et al. Embryonic and extraembryonic stem cell lines derived from single mouse blastomeres. *Nature.* 2006;439(7073):216–9.
12. Chung Y, Klimanskaya I, Becker S, Li T, Maserati M, Lu SJ, et al. Human embryonic stem cell lines generated without embryo destruction. *Cell Stem Cell.* 2008;2(2):113–7.
13. Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RML. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y–specific DNA

- amplification. *Nature*. 1990;344:768–70.
14. González S, Ibáñez E, Santaló J. Influence of E-Cadherin-mediated cell adhesion on mouse embryonic stem cells derivation from isolated blastomeres. *Stem Cell Rev Reports*. 2011;7(3):494–505.
 15. Wakayama S, Hikichi T, Suetsugu R, Sakaide Y, Bui H-T, Mizutani E, et al. Efficient establishment of mouse embryonic stem cell lines from single blastomeres and polar bodies. *Stem Cells*. 2007;25(4):986–93.
 16. Lorthongpanich C, Yang SH, Piotrowska-Nitsche K, Parnpai R, Chan AWS. Development of single mouse blastomeres into blastocysts, outgrowths and the establishment of embryonic stem cells. *Reproduction*. 2008;135(6):805–13.
 17. González S, Ibáñez E, Santaló J. Establishment of mouse embryonic stem cells from isolated blastomeres and whole embryos using three derivation methods. *J Assist Reprod Genet*. 2010;27(12):671–82.
 18. Taei A, Hassani SN, Eftekhari-Yazdi P, Rezazadeh Valojerdi M, Nokhbatolfigohahai M, Masoudi NS, et al. Enhanced generation of human embryonic stem cells from single blastomeres of fair and poor-quality cleavage embryos via inhibition of glycogen synthase kinase b and Rho-associated kinase signaling. *Hum Reprod*. 2013;28(10):2661–71.
 19. Czechanski A, Byers C, Greenstein I, Schrode N, Donahue LR, Hadjantonakis A-K, et al. Derivation and characterization of mouse embryonic stem cells from permissive and nonpermissive strains. *Nat Protoc*. 2014;9(3):559–74.
 20. Kawase E, Suemori H, Takahashi N, Okazaki K, Hashimoto K, Nakatsuji N. Strain difference in establishment of mouse embryonic stem (ES) cell lines. *Int J Dev Biol*. 1994;38(2):385–90.
 21. Brook FA, Gardner RL. The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse. *PNAS*. 1997;94(11):5709–12.
 22. Wakayama T, Perry ACF, Zuccotti M, Johnson KR, Yanagimachi R. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*. 1998;394(6691):369–74.
 23. Gao S, McGarry M, Priddle H, Ferrier T, Gasparrini B, Fletcher J, et al. Effects of donor oocytes and culture conditions on development of cloned mice embryos. *Mol Reprod Dev*. 2003;66(2):126–33.
 24. Mallol A, Santaló J, Ibáñez E. Improved development of somatic cell cloned mouse embryos by vitamin C and latrunculin A. *PLoS ONE* 10(3):

- e0120033. doi:10.1371/journal.pone.0120033
25. Wakayama T, Tabar V, Rodriguez I, Perry ACF, Studer L, Mombaerts P. Differentiation of embryonic stem cell lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer. *Science*. 2001;292(5517):740–3.
 26. Costa-Borges N, Gonzalez S, Santaló J, Ibáñez E. Effect of the enucleation procedure on the reprogramming potential and developmental capacity of mouse cloned embryos treated with valproic acid. *Reproduction*. 2011;141:789–800.
 27. Lee K-H. Conditions and techniques for mouse embryonic stem cell derivation and culture. In: Bhartiya D, editor. *Pluripotent Stem Cells*. InTech; 2013. p. 85–115.
 28. Cheng J, Dutra A, Takesono A, Garrett-Beal L, Schwartzberg PL. Improved generation of C57BL/6J mouse embryonic stem cells in a defined serum-free media. *Genesis*. 2004;39(2):100–4.
 29. Chaudhry MA, Vitalis TZ, Bowen BD, Piret JM. Basal medium composition and serum or serum replacement concentration influences on the maintenance of murine embryonic stem cells. *Cytotechnology*. 2008;58(3):173–9.
 30. Ying QL, Smith AG. Defined conditions for neural commitment and differentiation. *Methods Enzymol*. 2003;365:327–41.
 31. Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, Wong GG, Moreau J, Stahl M, et al. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature*. 1988;336(6200):688–90.
 32. Williams RL, Hilton DJ, Pease S, Willson TA, Stewart CL, Gearing DP, et al. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature*. 1988;336(6200):684–7.
 33. Ying Q-L, Wray J, Nichols J, Batlle-Morera L, Doble B, Woodgett J, et al. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature*. 2008;453(7194):519–23.
 34. Tamm C, Galitó SP, Annerén C. A comparative study of protocols for mouse embryonic stem cell culturing. *PLoS ONE*. 2013;8(12): e81156. doi:10.1371/journal.pone.0081156
 35. Hassani SN, Totonchi M, Farrokhi A, Taei A, Larijani MR, Gourabi H, et al. Simultaneous suppression of TGF- β and ERK signaling contributes to the highly efficient and reproducible generation of mouse embryonic stem cells from previously considered refractory and non-permissive strains.

- Stem Cell Rev Reports. 2012;8(2):472-81.
36. Ogawa K, Matsui H, Ohtsuka S, Niwa H. A novel mechanism for regulating clonal propagation of mouse ES cells. *Genes to Cells*. 2004;9(5):471-7.
 37. Hassani S-N, Pakzad M, Asgari B, Taei A, Baharvand H. Suppression of transforming growth factor β signaling promotes ground state pluripotency from single blastomeres. *Hum Reprod*. 2014;29(8):1739-48.
 38. Batlle-Morera L, Smith A, Nichols J. Parameters influencing derivation of embryonic stem cells from murine embryos. *Genesis*. 2008;46(12):758-67.
 39. Nagy A, Vintersten K, Behringer R. *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*, 3rd ed. New York: CSH Lab. Press. 2003.
 40. Chatot CL, Ziomek CA, Bavister BD, Lewis JL, Torres I. An improved culture medium support development of random-bred 1-cell mouse embryos in vitro. *J Reprod Fertil Ltd*. 1989;86:679-88.
 41. Bachvarova R, De Leon V. Polyadenylated RNA of mouse ova and loss of maternal RNA in early development. *Dev Biol*. 1980;74(1):1-8.
 42. Telford NA, Watson AJ, Schultz GA. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development : a comparison of several species. *Mol Reprod Dev*. 1990;26:90-100.
 43. Bouniol C, Nguyen E, Debey P. Endogenous transcription occurs at the 1-cell stage in the mouse embryo. *Exp Cell Res*. 1995;218(1):57-62.
 44. Aoki F, Worrada DM, Schultz RM. Regulation of transcriptional activity during the first and second cell cycles in the preimplantation mouse embryo. *Dev Biol*. 1997;181(2):296-307.
 45. Ohtsuka S, Niwa H. The differential activation of intracellular signaling pathways confers the permissiveness of embryonic stem cell derivation from different mouse strains. *Development*. 2015;142:431-7.
 46. Gonzalez JM, Morgani SM, Bone RA, Bonderup K, Abelchian S, Brakebusch C, et al. Embryonic stem cell culture conditions support distinct states associated with different developmental stages and potency. *Stem Cell Reports*. 2016;7(2):177-91.
 47. Lu C-W, Yabuuchi A, Chen L, Viswanathan S, Kim K, Daley GQ. Ras-MAPK signaling promotes trophectoderm formation from embryonic stem cells and mouse embryos. *Nat Genet*. 2008;40(7):921-6.

3.2 Unraveling the role of Wnt pathway in mESC derivation from isolated blastomeres from 8-cell embryos

Unraveling the role of Wnt pathway in mESC derivation from isolated blastomeres from 8-cell embryos

Marta Vila-Cejudo¹, Elena Ibáñez¹ and Josep Santaló^{1*}

¹Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain

*corresponding author

josep.santalo@uab.cat

Abstract

Mouse embryonic stem cells (mESC) derived from preimplantation embryos are critically dependent on Wnt activation and MAPK inhibition to maintain pluripotency. Moreover, the inhibition of the Wnt pathway has been reported to maintain epiblast stem cell lines derived from mouse post-implantation epiblasts, indicating that Wnt signaling have a significant role in pluripotency maintenance from both naïve and primed stem cells. Using the Wnt activator CHIR99021 (CHIR), the Wnt inhibitor IWR-1-endo (IWR) and the MEK inhibitor PD0325901 (PD), alone or combined with each other, we have analyzed the role of Wnt pathway in mESC derivation from isolated blastomeres from embryos at the 8-cell stage to determine if those lines behave as mESC derived from whole blastocysts. The transcriptional activation of Wnt-target genes has been assessed by AXIN2 levels, which have also been used to confirm the proper Wnt modulation, whereas the activity of the alkaline phosphatase enzyme and the presence of the post-implantation epiblast marker FGF5 have been assessed to determine the features of the state of pluripotency of the lines established. Our results show that, non-treated blastomeres and blastomeres treated with IWR or CHIR resulted in lower derivation efficiencies (1.4%–4.9%) than blastomeres treated with any of the combination of the inhibitors (15%–24.7%), whereas blastomeres treated with PD presented an intermediate derivation rate (10.1%). Besides, Wnt-transcriptional activity was high in mESC lines from NT, CHIR and 2i (CHIR-PD) groups, whereas IWR-treated mESC lines displayed the lowest levels. Moreover, features of naïve pluripotency were only acquired in CHIR- and 2i- treated mESC lines, whereas mESC lines derived under the IWR-CHIR and IWR-PD treatments displayed features of primed pluripotency. Surprisingly, lines derived under the NT, IWR and PD treatments showed an intermediate state between naïve and primed pluripotency. Thus, mESC lines established from 1/8 blastomeres respond differently to Wnt modulations than mESC lines derived from whole embryos. In conclusion, Wnt pathway plays a key role in pluripotency maintenance of mESC lines derived from isolated blastomeres, which, under the appropriate stimuli, can originate mESC with features of naïve or primed pluripotency.

Introduction

Traditionally, derivation and culture of mouse embryonic stem cells (mESC) has involved the use of culture medium supplemented with either Fetal Calf Serum

(FCS) (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981), Bone Morphogenetic Protein (BMP) (Ying *et al.*, 2003) or the more defined FCS-free formulation, KnockOut Serum Replacement (KSR) (Ward *et al.*, 2002; Wakayama *et al.*, 2007), in the presence of Leukemia Inhibitory Factor (LIF) (Smith *et al.*, 1988; Williams *et al.*, 1988). However, under these conditions, only embryos from a few mouse strains, known as permissive strains, could successfully produce mESC lines. Moreover, the mESC lines obtained formed heterogeneous populations due to a variable stimulation of the Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) signaling pathway (Kunath *et al.*, 2007; Silva and Smith, 2008; Ying *et al.*, 2008).

The introduction, in 2008, of the combination of the MAPK kinase (MEK) inhibitor PD0325901 (PD) and the glycogen synthase kinase 3 (GSK3) inhibitor CHIR99021 (CHIR), combination known as 2i, marked a breakthrough in the establishment of mESC lines (Ying *et al.*, 2008), allowing the derivation of mESC lines from several refractory strains. Indeed, the addition of 2i to culture medium, together with LIF, improves the derivation efficiency of mESC irrespectively of the genetic background of the embryos and the culture medium used, even when the medium is supplemented with the serum-free N2B27 protein complex (Ying *et al.*, 2008; Czechanski *et al.*, 2014).

The excellent results obtained with 2i highlight the importance of signaling pathways in mESC derivation and pluripotency maintenance. Particularly, inhibition of MAPK pathway, and activation of Wnt pathway, seem to play a key role in mESC derivation, by suppressing differentiation and by enhancing mESC viability and growth capacity (Ying *et al.*, 2008). PD inhibits the MAPK pathway by inhibiting MEK and, thus, the phosphorylation of the extracellular signal-regulated kinases (ERK). The suppression of differentiation signals exerted by PD can foster long term self-renewal when combined with LIF (Burdon *et al.*, 1999; Ying *et al.*, 2008). However, mESC cultured in the presence of PD alone undergo apoptosis, indicating that the sole inhibition of MAPK signaling pathway is insufficient to maintain mESC viability (Ying *et al.*, 2008). On the other hand, CHIR activates the Wnt signaling pathway by inhibiting the β -CATENIN destruction complex, which results in an increase in the levels of β -CATENIN and generates a cytosolic pool of this protein. β -CATENIN can then either form a membrane-associated complex together with E-CADHERIN and OCT4 (Faunes *et al.*, 2013) or move to the nucleus where it activates the transcription of Wnt target genes (ten Berge *et al.*, 2011; Wray *et al.*, 2011). Some of these target genes, such as *Oct4*

and *Nanog*, are associated with pluripotency maintenance (Pereira *et al.*, 2006; Cole *et al.*, 2008), whereas other genes, such as *Frizzelds* and *Axin2*, are pathway regulators (Clevers, 2006). Although CHIR is usually combined with PD, as in the 2i cocktail, it can also be used alone to maintain the pluripotency of mESC lines in the presence of LIF (Ogawa *et al.*, 2006; ten Berge *et al.*, 2011). Alternatively, CHIR can be combined with either XAV939 or IWR-1-endo (IWR), both preventing Wnt/ β -CATENIN signaling through the stabilization of AXIN in the β -CATENIN destruction complex. It is important to point out that the combination of CHIR with IWR has been reported to maintain primed pluripotency (Kim *et al.*, 2013). Therefore, Wnt pathway plays a key role in determining the state of pluripotency of mESC, since naïve pluripotency maintenance requires the activation of the canonical Wnt pathway whereas primed pluripotency is dependent on Wnt inactivation (Weinberger *et al.*, 2016).

Although naïve and primed states require the core pluripotency factors OCT4, SOX2, NANOG to maintain pluripotency (Silva and Smith, 2008), mESC from both states can be distinguished by the expression of specific markers, such as *Klf2*, *Klf4* and *Esrrb* for naïve pluripotency (Nichols and Smith, 2012) and *Fgf5*, *Eomes*, *Sox17*, *Cer1* and *T* for primed pluripotency (Joo *et al.*, 2014). Moreover, naïve and primed mESC lines can be distinguished by the differential activation of the LIF/Stat3, Wnt/ β -catenin and FGF/MEK pathways (Ye *et al.*, 2014), the levels of DNA methylation (Silva and Smith, 2008; Hackett *et al.*, 2013), the X-chromosome inactivation state (Mak *et al.*, 2004; Okamoto *et al.*, 2004), the morphology of the colonies (Sugimoto *et al.*, 2015), the activity of alkaline phosphatase (ALP) (ten Berge *et al.*, 2011) and by their contribution to chimera formation when injected to embryos at the blastocyst stage (Tesar *et al.*, 2007; Nichols and Smith, 2009).

Although mESC are normally derived from the epiblast of the preimplantation embryo, they can also be obtained from single blastomeres isolated from 8-cell stage embryos. The use of single isolated blastomeres is of especial interest when deriving ESC from human embryos because allows to obtain ESC lines without embryo destruction, to increase the chances of ESC derivation from a particular embryo or to minimize the number of embryos used. Regarding mESC derivation from 1/8 blastomeres, it has been reported that the presence of 2i improves the derivation efficiency (Lee *et al.*, 2012; Vila-Cejudo, *et al.* under review), though it is not clear whether the sole effect of Wnt pathway modulators or the MEK inhibitor will be the same as described in whole embryos and mESC. Interestingly,

1/8 blastomeres are single uncommitted cells which retain the ability to originate both mESC and trophoblast stem cells (Chung *et al.*, 2006; González *et al.*, 2011), whereas cells from the preimplantation epiblast are more committed and present an expression pattern equivalent to that of mESC (Boroviak *et al.*, 2014). Therefore, differences between the commitment, and consequently, the expression pattern of 1/8 blastomeres and preimplantation epiblasts could be determinant for their response to the modulators of signaling pathways.

In this scenario, this study aims to investigate the effect of Wnt modulators and the MAPK inhibitor on mESC derivation from 1/8 blastomeres and to explore the pluripotency (naïve or primed) of mESC lines derived and maintained under different treatments.

Materials and Methods

Embryo collection and culture

Mouse care and procedures were conducted according to the protocols approved by the Ethics Committee on Animal and Human Research of the Universitat Autònoma de Barcelona and by the Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca i Alimentació of the Generalitat de Catalunya (ref. 8741).

Prior to embryo collection, 129S2 female mice were superovulated by intraperitoneal injection of 5 IU of Pregnant Mare's Serum Gonadotropin (Foligon) and 5 IU of human Chorionic Gonadotropin (hCG; Divasa-Farmavic) 48 h apart. On the day of hCG injection, females were mated with C57BL males. This mating design was selected to increase the number of embryos produced and improve their quality due to the hybrid vigor (Nagy *et al.*, 2003). Females were euthanized 48 h later to recover their oviducts, which were flushed with Heppes-buffered KSOM (Biggers *et al.*, 2000) to collect the embryos at the 2-cell stage. Then, the embryos were cultured in KSOMaag medium (Zenith-Biotech) supplemented with 4 mg/ml bovine serum albumin (BSA; Sigma) and covered with mineral oil (Sigma) at 37°C and 5% CO₂ until they reach the 8-cell stage.

Embryo biopsy by micromanipulation

The zona pellucida of the 8-cell embryos was drilled using a 10 μm pipette containing acidic Tyrode's solution, and all the 1/8 blastomeres were individually aspirated with a 20 μm pipette containing PBS-1% BSA.

To avoid a bias due to embryo origin or a possible blastomere commitment, 1/8 blastomeres biopsied from different embryos were pooled and randomly distributed among the different experimental groups.

Stem cells derivation and culture

Immediately after the biopsy, 1/8 blastomeres were cultured in 50 μl microdrops of derivation medium containing mitomycin C-inactivated Human Foreskin Fibroblasts (HFF) and covered with mineral oil. The derivation medium consisted of DMEM (BioWest) medium supplemented with 20% KnockOut Serum Replacement (KSR; Life technologies), 100 μM 2- β mercaptoethanol (Gibco), 1x non-essential amino acids (Gibco), and 50 U/ml penicillin and 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin (Gibco). As a control for the influence of the derivation medium in the fibroblast growth factor 5 (FGF5) analysis, a few 1/8 blastomeres were cultured in a 1:1 mixture of DMEM-F12 (Gibco) and neurobasal (Gibco) supplemented with 100x N2 (Gibco) and 50x B27 (Gibco), 1mM L-glutamine (Gibco), 50 μM 2- β mercaptoethanol, 1x non-essential amino acids and 50 U/ml penicillin and 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin. Both types of derivation media were additionally supplemented with 10^3 U/ml Leukemia Inhibitory Factor (LIF; Merk Millipore) and 0.1 mg/ml adrenocorticotrophic hormone (ACTH; Prospec).

When indicated, the following small-molecule inhibitors were added, alone or combined, to the derivation medium: CHIR99021 (CHIR; Axon Medchem) at 3 μM , IWR-1-endo (IWR; Stem Cell Technologies) at 2.5 μM or PD0325901 (PD; Axon Medchem) at 1 μM . Specifically, a total of six different groups were performed according to the treatment: CHIR alone, IWR alone, PD alone IWR and CHIR, IWR and PD, and CHIR and PD (also known as 2i). In addition, a control group without treatment (NT) was included. All treatments were applied with the medium supplemented with KSR, whereas only 2i and IWR-CHIR treatments were performed using the medium supplemented with N2B27.

Blastomere development was controlled every other day, when medium was changed, until the eighth day, when outgrowths were observed. After the first passage, outgrowths were cultured in 4-well plates without ACTH. Putative mESC lines were subcultured once a week and maintained in culture for at least 6 weeks.

Stem cell characterization by immunofluorescence

After the sixth passage, putative mESC lines that presented colonies with a stem cell-like morphology were assessed for pluripotency using immunofluorescence analysis. The differentiation potential of the putative mESC lines was also assessed by immunofluorescence after inducing their spontaneous differentiation by culturing the cells for 10 days in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) without feeder cells.

In this analysis, putative mESC lines were fixed in 4% paraformaldehyde (Sigma) for 20 min at room temperature (RT). After three washes with PBS, samples were blocked and permeabilized in a PBS-based solution containing 0.2% sodium azide (Sigma), 0.5% Triton X-100 (Sigma) and 3% goat serum (BioWest) for 30 min at RT. Primary antibodies were incubated overnight at 4°C and washed three times in PBS for 5 min the day after. Secondary antibodies were incubated for 2 h at RT and washed three times in PBS for 5 min. All the antibodies were diluted in a PBS-based solution containing 0.2% sodium azide, 0.1% Triton X-100 and 3% goat serum. Finally, the nuclear material was counterstained with 10 µg/ml Hoescht 33258 (Molecular Probes –Invitrogen) diluted in Vectashield (Vector Laboratories). Samples were analyzed with an epifluorescence microscope (Olympus BX61) and the Cytovision software (Applied Imaging, Inc).

Primary antibodies used for pluripotency analysis were OCT4 (Santa Cruz, ref. Sc-5279, 1:50 dilution) and SOX2 (Merck Millipore, ref. AB5603, 1:200 dilution). The ectoderm marker Tubulin β 3 (TUJ1; Biolegend, ref. MMS-435P, 1:500 dilution), the mesoderm marker α smooth muscle actin (α SMA; Sigma, ref. A5228, 1:200 dilution) and the endoderm marker alpha-fetoprotein (AFP; R&D Systems, ref. MAB1368, 1:50 dilution) were assessed in the differentiated stem cell lines. Secondary antibodies were anti-mouse IgG Alexa Fluor 488 (Molecular Probes – Invitrogen, ref. A-21200, 1:500 dilution) for OCT4, TUJ1, α SMA and AFP, and anti-

rabbit IgG Alexa Fluor 594 (Molecular Probes – Invitrogen, ref. A-11037, 1:500 dilution) for SOX2.

Detection and quantification of AXIN2 and FGF5

Pluripotent mESC lines were fixed and processed for immunofluorescence, as described above, to identify the transcriptional activity induced by the Wnt pathway activation in the pluripotent mESC lines using the AXIN2 marker. The same fixation and immunofluorescence protocol was also applied to identify epiblast-like stem cells using the FGF5 marker. As a control, post-implantation epiblast from egg cylinders obtained following the *in vitro* culture protocol described by Bedzhov and coworkers (Bedzhov and Zernicka-Goetz, 2014) were used.

In these analysis, primary antibodies used were AXIN2 (Abcam; ab109301; 1:100 dilution) and FGF5 (Abcam; ab88118; 1:200 dilution), and anti-rabbit IgG Alexa Fluor 594 (Molecular Probes – Invitrogen, ref. A-11037, 1:500 dilution) was used as secondary antibody.

To quantify either AXIN2 or FGF5, the fluorescence intensity of the markers was assessed after simultaneously immunostaining mESC lines from each group and capturing the corresponding images under the same conditions. Then, using ImageJ software, an outline was drawn around each mESC colony to measure its area, mean fluorescence, integrated density and background. The corrected total cell fluorescence (CTCF) was calculated for each colony: $CTCF = \text{integrated density} - (\text{area of the colony} \times \text{mean fluorescence of the background readings})$ (McCloy *et al.*, 2014).

Quantification of Alkaline Phosphatase activity

To investigate the state of pluripotency of the mESC lines, Alkaline Phosphatase (ALP) activity was analyzed. After freezing the samples at -80°C , pellets of mESC colonies and feeder cells were lysed using ice-cold RIPA buffer supplemented with protease and phosphatase inhibitors for 10 min. Then, samples were vortexed for 10 s and sonicated at 25% amplitude for 15 s, followed by centrifugation at 12000 rcf for 2 min at 4°C . The supernatant was recovered to evaluate ALP activity by quantifying p-nitrophenol produced by the hydrolysis of p-nitrophenyl phosphate (pNPP). To do so, the supernatant was mixed at 1:1 ratio with 1-step pNPP (ThermoScientific). The mixture was incubated for 30 min at RT protected from

light, and the absorbance was measured at 405 nm using a VICTOR3 multilabel plate reader (Perkin Elmer). To normalize ALP activity, total protein content was assessed with the Pierce BCA Protein Assay kit (ThermoScientific) according to the manufacturer's protocol.

Statistical analysis

For the derivation experiments, a minimum of 140 blastomeres were seeded for each treatment. The number of outgrowths formed after 8 days of culture, of non-progressive outgrowths after the second passage, and of confirmed mESC was calculated. Results were analyzed with χ^2 and Fisher exact test.

For AXIN2 and FGF5 quantification analysis, a minimum of 8 (AXIN2) or 9 (FGF5) colonies were analyzed for each treatment. CTCF values were first analyzed with the Shapiro–Wilk test to check for the normality of the samples. Then, CTCF values from all groups were compared using the Kruskal–Wallis test followed by Dunn's post-hoc test in the case of AXIN2 quantification and one-way ANOVA followed with Tukey's post-hoc test in the case of FGF5 quantification. Alternatively, CTCF values of FGF5 from colonies derived in a medium containing N2B27 were analyzed with a Mann Whitney test.

Finally, three different protein extracts were used for each treatment for the quantification of ALP activity. After the results of the Shapiro–Wilk normality test, data were analyzed using the Kruskal–Wallis test followed by Dunn's post-hoc test.

All statistical tests were performed using GraphPad Prism software considering $P < 0.05$ as statistically significant.

Results

mESC derivation in the presence of signaling modulators

In this study, a total of 127 putative mESC lines were established. The pluripotency and differentiation potential of all the 127 mESC lines was confirmed by immunofluorescence analysis (Figure 1).

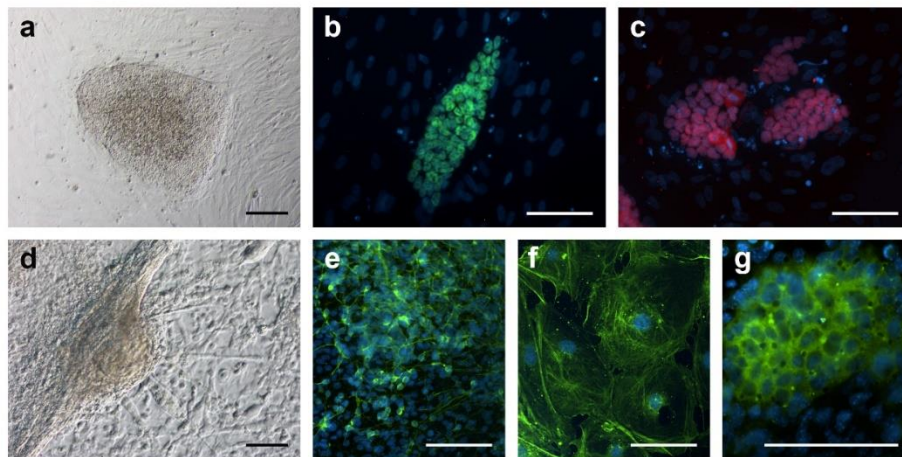


Figure 1: Immunofluorescence detection of pluripotency and differentiation markers in putative mESC lines derived from 1/8 blastomeres. (a) Colony of a putative mESC line cultured for 6 passages, showing stem cell-like morphology and defined edges. (b,c) mESC colonies expressing the pluripotency markers OCT4 (green, b) and SOX2 (red, c). (d) Morphology of a differentiated mESC colony after 10 days of inducing its spontaneous differentiation. (e,f,g) Differentiated mESC colonies expressing TUJ1 (green, e), α SMA (green, f) and AFP (green, g). In all the immunofluorescence images, nuclear material is counterstained with Hoechst (blue). All the scale bars represent 100 μ m.

CHIR treatment alone produced the highest number of outgrowths after 8 days of culture (50.3%) of all groups of cultured 1/8 blastomeres (Table 1). However, most of these outgrowths (93.5%) degenerated during the second passage, resulting in a low mESC derivation efficiency (3.3%) that was similar to that obtained when blastomeres were non-treated (4.9%) or were treated with IWR alone (1.4%). In these last two groups, most of the outgrowths obtained (79.1% and 89.5%, respectively) also degenerated during the second passage. When blastomeres were cultured in the presence of PD alone, the number of outgrowths at 8 days of culture was lower (15.2%) than when blastomeres were treated with CHIR. However, because the majority of the outgrowths survived and progressed after the second passage, the final mESC derivation rate was significantly higher (10.1%). This derivation rate was also higher than for IWR-treated and non-treated blastomeres.

Table 1: Outgrowth formation and derivation efficiencies of mESC lines established from single 1/8 blastomeres treated with different small-molecule modulators.

Treatment group	n	Outgrowths formation (%)	Non-progressive outgrowths (%)	mESC lines (%)
NT	185	43 (23.2%) ^{a, d}	34 (79.1%) ^a	9 (4.9%) ^{a, b}
IWR	139	19 (13.7%) ^b	17 (89.5%) ^{a, b}	2 (1.4%) ^a
CHIR	153	77 (50.3%) ^c	72 (93.5%) ^b	5 (3.3%) ^a
PD	138	21 (15.2%) ^{a, b}	7 (33.3%) ^c	14 (10.1%) ^{b, c}
IWR-CHIR	140	32 (22.9%) ^{a, b, d}	11 (34.4%) ^c	21 (15.0%) ^{c, d}
IWR-PD	157	38 (24.2%) ^{a, d}	7 (18.4%) ^c	31 (19.7%) ^{d, e}
2i	182	56 (30.7%) ^d	11 (19.6%) ^c	45 (24.7%) ^e

^{a-e}Different superscripts indicate statistically significant differences among treatment groups for each parameter analyzed: outgrowth formation, non-progressive outgrowths and derivation efficiencies.

When the inhibitors were combined, the percentage of non-progressive outgrowths was low (18.4%–34.4%), and the resulting efficiencies of mESC derivation were clearly higher than those of the NT, IWR and CHIR groups, irrespectively of the combination of inhibitors used (Table 1). Despite being similar in terms of the percentage of non-progressive outgrowths, combined treatments with IWR-PD and 2i also produced higher derivation rates than PD alone. Surprisingly, the efficiency obtained with the 2i treatment (24.7%) was only equivalent to the derivation efficiency obtained with the double inhibition exerted by IWR combined with PD (19.7%), despite being opposite treatments in terms of Wnt modulation.

Regarding colony morphology (Figure 2), most mESC colonies from the NT, IWR, PD, IWR-CHIR and IWR-PD groups presented defined edges and flat shape, although some colonies showed peripheral differentiation signs. By contrast, colonies from the CHIR and 2i treatment groups always presented defined edges and a regular flat shape without any apparent sign of peripheral differentiation.

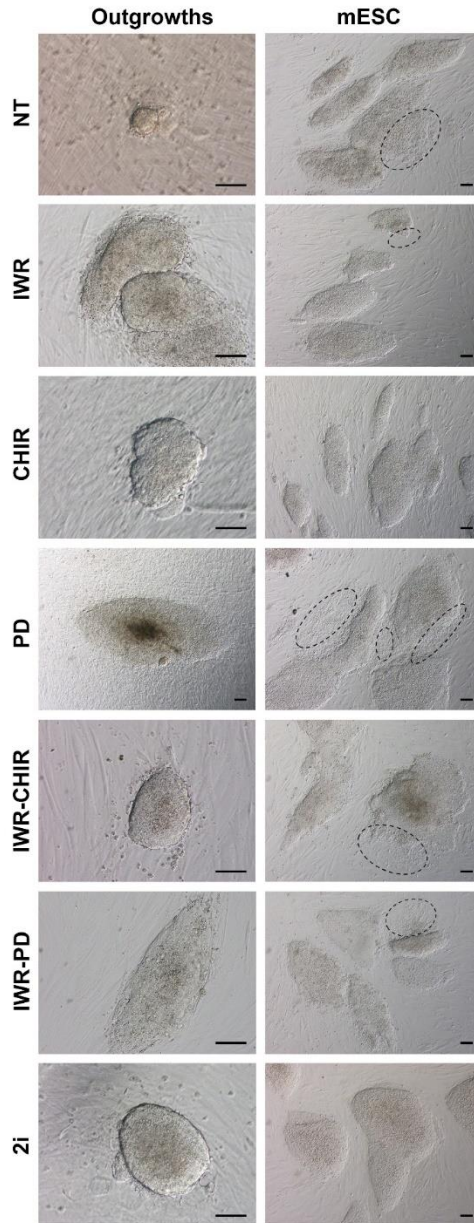


Figure 2: Morphology of outgrowths and putative mESC lines derived from 1/8 blastomeres under different treatments. (Outgrowth column) Outgrowths obtained from 1/8 blastomeres after 8 days of culture. Outgrowths obtained from the NT, IWR, CHIR, IWR-CHIR and 2i treatments showed a dome shape, whereas outgrowths obtained from PD and IWR-PD treatments displayed a flat shape. (mESC column) Lines of mESC derived from 1/8 blastomeres at the sixth passage. Colonies from all treatments presented a flat-shape. All colonies from CHIR and 2i treatments displayed defined edges, whereas a few colonies in the NT, IWR, PD, IWR-CHIR and IWR-PD groups presented peripheral differentiation signs, highlighted with dashed ellipses. All the scale bars represent 100 μm .

Transcriptional activity induced by Wnt pathway assessed by AXIN2 levels

Immunofluorescence analysis revealed that all the lines were positive for AXIN2, although the intensity of the signal varied between treatments (Figure 3A and B). Specifically, 2i derived lines displayed the highest levels of AXIN2 signal (Figure 3B), which were equivalent to those of the NT and CHIR-treated lines. As expected, the lowest levels of AXIN2 signal were detected in the IWR group, whereas lines obtained in the PD, IWR-CHIR and IWR-PD groups presented intermediate levels.

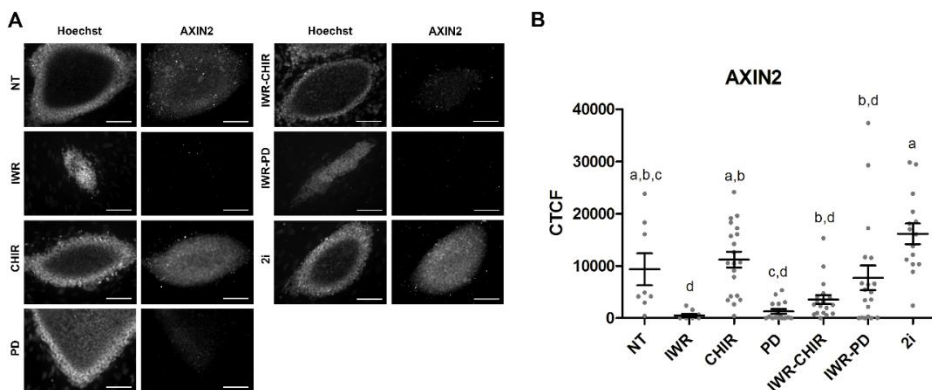


Figure 3: Detection and quantification of AXIN2 in mESC lines derived from 1/8 blastomeres under different treatments. (Panel A) Epifluorescence raw images representing colonies morphology, with the nuclear material counterstained with Hoechst and AXIN2 expression. (Panel B) Mean levels \pm SEM of the corrected total cell fluorescence (CTCF) for AXIN2 in mESC lines produced by the different treatments. a-d Different superscripts indicate statistically significant differences between treatments.

Effect of different signaling modulators on ALP activity

The results from the ALP activity test (Figure 4) revealed that mESC lines derived under different treatments presented significant differences in ALP activity. Surprisingly, ALP activity in all the groups, except for 2i, was equivalent to that of feeder cells (HFF), used as a negative control. The highest levels of ALP activity were detected in the 2i treatment group, which were higher than in any other group except for CHIR and PD. On the other hand, mESC lines obtained from the CHIR-treated group presented an ALP activity significantly higher than that of the lines derived from the NT, IWR and IWR-PD groups (Figure 4).

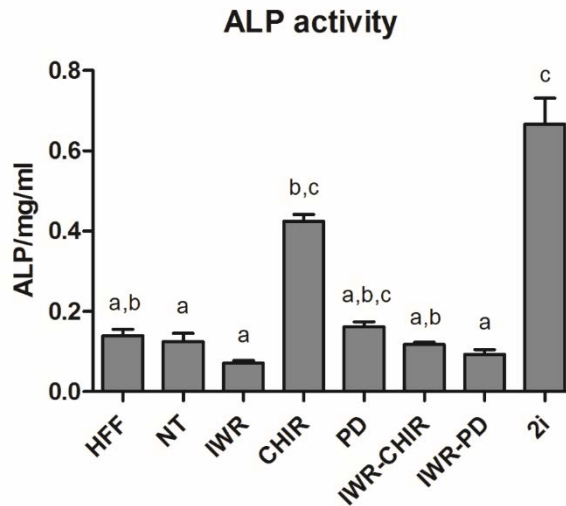


Figure 4: ALP activity in protein extracts from the mESC lines derived from 1/8 blastomeres under different treatments. Mean levels of ALP activity \pm SEM. ^{a,c}Different superscripts indicate statistically significant differences between treatments.

State of pluripotency of mESC lines assessed by FGF5 levels

According to Kim and coworkers (Kim *et al.*, 2013), mESC treated with CHIR and IWR express the post-implantation epiblast-specific marker FGF5. Therefore, to assess whether 1/8 blastomeres subjected to the same treatment generate ESC lines with an EpiSC-like phenotype, we analyzed the presence of FGF5 protein by immunofluorescence.

As expected, the presence of FGF5 protein was detected in the epiblast of *in vitro* cultured egg-cylinders used as positive control (Figure 5A) and in the mESC lines derived from 1/8 blastomeres treated with the IWR-CHIR combination (Figure 5B). However, the lines derived under the 2i naïve pluripotency-inducing treatment, used as negative control, were also positive for FGF5 (Figure 5B). By contrast, colonies from the few mESC lines derived under the 2i treatment in a medium containing the serum-free complement N2B27 (5 mESC lines from 178 blastomeres, 2.8% of efficiency) showed barely detectable levels of FGF5 signal (Figure 5C). These levels were significantly lower than FGF5 levels from mESC

cultured in a medium containing KSR and 2i. This observation suggests that the derivation medium containing KSR might induce FGF5 expression.

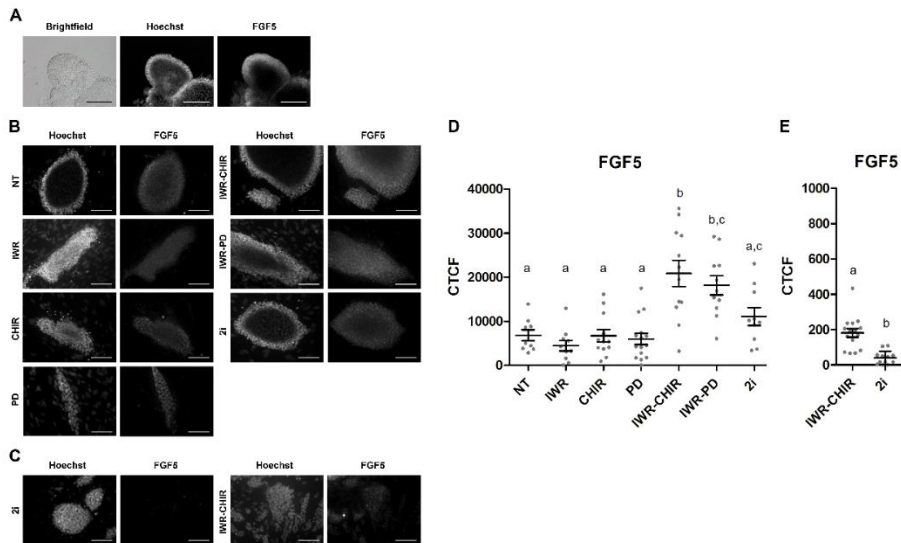


Figure 5: Detection and quantification of the ectodermal marker FGF5 in egg-cylinders and in mESC lines derived from 1/8 blastomeres under different treatments. (Panel A) Phase contrast image of an *in vitro* cultured egg-cylinder. Nuclear material from the egg-cylinders counterstained with Hoechst and epiblast cells showing FGF5 protein. (Panel B) Representative epifluorescence raw images of colonies morphology, represented by the counterstaining of the nuclear material with Hoechst (left column), and of the reticular expression of FGF5 (right column) in mESC lines derived from the different treatments in a medium containing KSR. (Panel C) Representative epifluorescence raw images of colonies morphology, represented by the counterstaining of the nuclear material with Hoechst (left column), and of the reticular expression of FGF5 (right column) in mESC lines derived from the different treatments in N2B27 containing medium. All the scale bars represent 100 μ m. (Panel D) Mean levels \pm SEM of corrected total cell fluorescence (CTCF) for FGF5 in mESC lines produced by the different treatments in medium containing KSR. (Panel E) Mean levels \pm SEM of corrected total cell fluorescence (CTCF) for FGF5 in mESC lines produced by the different treatments in medium containing N2B27. ^{a-d}Different superscripts indicate statistically significant differences between treatments.

To confirm this assumption, the presence of FGF5 signal was assessed in all the mESC lines derived in the medium supplemented with KSR. Results showed that mESC lines from all treatments indeed presented FGF5, even though its intensity varied between lines depending on the treatment used during the derivation process (Figure 5B). Specifically, as the FGF5 quantification analysis showed, combined treatments with IWR-CHIR and with IWR-PD resulted in the highest FGF5 levels, whereas lines from the NT, IWR, CHIR and PD groups showed the lowest levels. Lines from the 2i treatment group presented intermediate FGF5

levels, which were significantly lower than those from IWR-CHIR treated mESC (Figure 5D).

To rule out that the high levels of FGF5 in the IWR-CHIR group were caused merely by culture in the KSR-containing medium, we introduced a new experimental group in which 1/8 blastomeres treated with the IWR-CHIR combination were cultured in a N2B27-containing medium. In this case, a total of 3 mESC lines were established from 144 blastomeres, corresponding to a derivation efficiency of 2.1%, which was lower than the 15% achieved when IWR-CHIR-treated blastomeres were cultured in KSR-containing medium. After confirming their stemness, the presence of FGF5 was assessed (Figure 5C) and quantified (Figure 5E). Mouse ESC lines cultured in a N2B27-containing medium treated with IWR-CHIR showed significantly lower levels of FGF5 than lines cultured under the same treatment in a medium containing KSR. Nevertheless, the low levels of FGF5 presented by IWR-CHIR-treated lines were significantly higher than those displayed by 2i-treated lines in medium containing N2B27 (Figure 5E).

Discussion

To investigate the influence of Wnt and MAPK pathways on mESC derivation from 1/8 blastomeres and on pluripotency maintenance, several modulators of these two signaling pathways were used alone or in combination during mESC establishment and culture.

The use of a single activator (CHIR) or inhibitor (IWR) of Wnt pathway resulted in extremely low derivation efficiencies of mESC lines from 1/8 blastomeres, similar to that of the NT group. To confirm that the inhibitors were successfully modulating Wnt pathway, we assessed the levels of the protein AXIN2 which, besides being a pathway regulator, has been postulated to be a universal Wnt target gene (Clevers, 2006) and to represent the level of the transcription induced by this pathway. Our results show that mESC lines from the IWR group presented negligible levels of AXIN2, confirming that Wnt transcriptional activity was successfully inactivated. On the contrary, CHIR-treated mESC lines displayed high levels of AXIN2, confirming the transcriptional activation of Wnt-target genes. Interestingly, mESC lines obtained from the NT group presented similarly high levels of AXIN2. This result contrasts with the negligible levels of AXIN2 reported in mESC from the J1 line, derived from the inner cell mass (ICM) of a blastocyst

and cultured in a feeder-free medium containing KSR and LIF (Wu *et al.*, 2015). It is possible that the high levels of AXIN2 observed in our NT mESC lines established from 1/8 blastomeres could be due to the Wnt proteins secreted by feeder cells (ten Berge *et al.*, 2011), which presence is essential to derive mESC from single blastomeres (Boroviak *et al.*, 2014; Hassani *et al.*, 2014). Alternatively, it could be an intrinsic feature of lines derived from isolated blastomeres. However, the low levels of AXIN2 displayed by PD treated lines seem to rule out both hypothesis. Nevertheless, a recent report states that MEK inhibition exerted by PD partly alleviates or antagonizes the expression of Wnt-target genes exerted by CHIR (Saj *et al.*, 2017) suggesting that both hypothesis might remain possible.

In addition to the differences observed in AXIN2 levels, mESC lines obtained from these three groups displayed other distinctive features. NT and IWR-treated mESC lines showed some colonies with peripheral differentiation signs, which were never observed in CHIR-treated mESC lines. This result agrees with a recent study reporting that CHIR alone is sufficient to sustain stem cell-like morphology from mESC lines derived from the ICM (Sim *et al.*, 2017). Moreover, the morphological observations were consistent with the results of ALP activity analysis, which showed that the more defined mESC morphology in CHIR-treated mESC lines was associated with high levels of activity of the enzyme. The activity of the ALP enzyme has been used, for years, as a stem cell marker to identify pluripotent stem cells (Matsui *et al.*, 1992; Burdon *et al.*, 1999). However, during the last few years, several reports have described that naïve mESC lines present a higher activity of the ALP enzyme than primed mESC lines (ten Berge *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2016; Sim *et al.*, 2017). According to these observations and the basal levels of FGF5, our results suggest that CHIR-treated mESC lines display a more naïve pluripotency state than mESC lines derived from the IWR and NT groups. Surprisingly, the two mESC lines established under the IWR treatment presented features of naïve (basal levels of FGF5) and primed (low levels of ALP activity) simultaneously. Since naïve and primed are dynamic states that can be reprogrammed under the appropriate stimulus (Hayashi *et al.*, 2008; Weinberger *et al.*, 2016), IWR-treated mESC lines derived from isolated blastomeres might be in an intermediate state between naïve and primed pluripotency. Moreover, in mESC and EpiSC lines derived from whole embryos, Wnt inhibition has been reported to induce primed pluripotency, but only when combined with molecules promoting EpiSC-like viability (ten Berge *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2013; Sugimoto

et al., 2015), suggesting that the sole use of IWR is not sufficient to induce fully primed pluripotency.

Curiously, mESC lines from the NT, CHIR and IWR groups share the highest rates of non-progressive outgrowths, due to a massive differentiation occurring during the second passage. To prevent this differentiation, which could be attributed to an autoinduction of the MAPK pathway (Kunath *et al.*, 2007), we designed a new group of treatment with the MEK inhibitor PD. Given that it has been reported that the use of PD might be sufficient to maintain the ground state in which naïve mESC lines are found (Sim *et al.*, 2017), we used the inhibitor alone. Interestingly, 1/8 blastomeres from the PD group did not produce a high percentage of outgrowths, maybe due to their poor survival at clonal density indicating a compromised cell growth and viability (Ying *et al.*, 2008). However, since they experienced significantly less differentiation during the second passage, PD-treated blastomeres resulted in slightly higher derivation efficiencies than blastomeres from the NT, IWR and CHIR groups. PD-treated mESC lines displayed low levels of AXIN2 equivalent to that from IWR-treated lines, a circumstance already discussed. Regarding their state of pluripotency, the lines showed features from naïve and primed states suggesting that they also remain in an intermediate state of pluripotency. Therefore, mESC lines established from 1/8 blastomeres under the PD treatment differ from the lines derived from ICM, which are able to maintain the naïve state (Sim *et al.*, 2017).

The combination of PD with CHIR, in the 2i cocktail, resulted in the highest derivation efficiencies confirming that, as previously reported, the dual action of these two modulators have a positive synergistic effect in mESC lines derived from both blastocysts and 1/8 blastomeres (Ying *et al.*, 2008; Vila-Cejudo *et al.*, under review). As observed with CHIR-treated lines, mESC derived from 1/8 blastomeres treated with 2i displayed high levels of AXIN2. Therefore, according to our results, the addition of CHIR, alone or combined with PD in the 2i group, does not enhance the transcriptional activation of Wnt-target genes with respect to the NT lines. Though we have not observed differences in Wnt-transcriptional activity, it is possible that Wnt activation maintains pluripotency through other transcription-independent mechanisms such as the β -CATENIN, OCT4 and E-CADHERIN complex associated to membranes (Faunes *et al.*, 2013). In this sense, when 1/8 blastomeres are cultured for the first 24 h with chimeric molecules of E-CADHERIN, which bind to the native E-CADHERINS on the surface of the

blastomeres, the derivation efficiency increases up to 33% (González *et al.*, 2011). This report suggests that the membrane-associated complex could also be involved in pluripotency maintenance from mESC lines established from isolated blastomeres.

Regarding the state of pluripotency, our results show that the presence of CHIR, alone or combined with PD, promotes features of naïve pluripotency. However, FGF5 levels, were slightly higher than expected and this prompted us to investigate the potential effect of the derivation medium used. Previous reports indicated that mESC lines cultured in medium containing FCS express basal levels of FGF5 (Brons *et al.*, 2007), probably due to some of the unknown components of the serum. Although KSR is a more defined FCS-free formulation, its composition is not available and, therefore, it is plausible that some of the components of KSR can also induce FGF5 expression. This possibility was confirmed with the addition of a new group of 2i-treated blastomeres cultured in N2B27-containing medium, which showed barely detectable levels of FGF5. Nevertheless, derivation of mESC from 1/8 blastomeres in N2B27-containing medium results in extremely low efficiencies, as shown in both the present study and in a previous one (Vila-Cejudo *et al.*, under review). Thus, when deriving mESC from single blastomeres, a compromise must be reached between promoting the full ground state of pluripotency, with the more defined medium containing N2B27, or promoting derivation efficiency, with the medium containing KSR.

Finally, to further investigate the roles of Wnt and MAPK signaling we decided to inhibit both pathways using IWR-PD. Moreover, we also exerted an antagonistic modulation of Wnt pathway using CHIR-IWR according to a previous work using this same treatment in mESC derived from post-implantation epiblasts (Kim *et al.*, 2013). Surprisingly, derivation efficiencies obtained from both treatments were moderately high. Mouse ESC lines established from both treatments displayed intermediate levels of AXIN2, which were slightly higher than levels from IWR- and PD-treated mESC lines. This increase, could be due to the stabilization of AXIN2 in the cytoplasm due to the complex formed together with β -CATENIN. This complex blocks the nuclear translocation of β -CATENIN and the subsequent Wnt-transcriptional activation to maintain primed-like pluripotency (Kim *et al.*, 2013). However, due to the relatively low levels of AXIN2 and according to the immunofluorescence images, it is not possible to conclude if it is preferentially located in the cytoplasm.

Regarding the state of pluripotency, mESC lines established under the IWR-CHIR and IWR-PD treatments displayed features of primed pluripotency. Specifically, mESC from both groups of treatment derived in the KSR-containing medium showed the highest levels of FGF5, which in the case of the IWR-CHIR group were higher than those of the 2i group both in the KSR- and the N2B27-containing media, as previously reported (Kim *et al.*, 2013). All these results seem to confirm that the combination of CHIR or PD with IWR treatment improves derivation efficiencies and pluripotency maintenance of lines derived from 1/8 blastomeres. Moreover, since the lines obtained show features of primed pluripotency, it is tempting to speculate that the effect of IWR might be dominant over the effect of CHIR and PD in determining the state of pluripotency.

In conclusion, our results show that Wnt pathway is highly involved in mESC derivation from single blastomeres. The activation of Wnt pathway, alone or combined with PD, entails the transcription of Wnt-target genes and results in mESC with features of naïve pluripotency, whereas the inhibition of Wnt combined with other signaling modulators entails a reduced expression of Wnt-target genes and mESC with features of primed pluripotency. Therefore, under suitable stimuli, blastomeres can give rise to mESC lines with features of naïve or primed pluripotency. Moreover, derivation efficiencies increase when Wnt modulators are combined with each other or with the MAPK pathway inhibitor. Finally, our results confirm that the treatments exerted by the signaling modulators do not have the same effects as described in mESC and EpiSC lines established from whole embryos, when the mESC lines are established from 1/8 blastomeres.

Acknowledgments

We thank staff from *Servei Estabulari* from *Universitat Autònoma de Barcelona* for animal care and Jonatan Lucas for their help with feeder cells culture and reagents preparation. We specially thank Dr. Anna Genescà for providing RIPA buffer and BCA reagents and Dr. Mireia Duñach for discussion and advise on Wnt signaling. We thank Sílvia Sanchez for their work in *in vitro* egg-cylinders culture.

This work has been supported by Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2014-52408-R), Generalitat de Catalunya (2014 SGR-524). MVC is beneficiary of a PIF-UAB fellowship.

References

- Bedzhov I, Zernicka-Goetz M. Self-organizing properties of mouse pluripotent cells initiate morphogenesis upon implantation. *Cell* [Internet] 2014;**156**:1032–1044. Elsevier Inc.
- Berge D ten, Kurek D, Blauwkamp T, Koole W, Maas A, Eroglu E, Siu RK, Nusse R. Embryonic stem cells require Wnt proteins to prevent differentiation to epiblast stem cells. *Nat Cell Biol* [Internet] 2011;**13**:1070–1075. Nature Publishing Group.
- Biggers JD, McGinnis LK, Raffin M. Amino acids and preimplantation development of the mouse in protein-free potassium simplex optimized medium. *Biol Reprod* 2000;**63**:281–293.
- Boroviak T, Loos R, Bertone P, Smith A, Nichols J. The ability of inner-cell-mass cells to self-renew as embryonic stem cells is acquired following epiblast specification. *Nat Cell Biol* [Internet] 2014;**16**:516–528.
- Brons IGM, Smithers LE, Trotter MWB, Rugg-Gunn P, Sun B, Chuva de Sousa Lopes SM, Howlett SK, Clarkson A, Ahrlund-Richter L, Pedersen RA, *et al.* Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* [Internet] 2007;**448**:191–195.
- Burdon T, Stracey C, Chambers I, Nichols J, Smith A. Suppression of SHP-2 and ERK signalling promotes self-renewal of mouse embryonic stem cells. *Dev Biol* 1999;**210**:30–43.
- Chung Y, Klimanskaya I, Becker S, Marh J, Lu S-J, Johnson J, Meisner L, Lanza R. Embryonic and extraembryonic stem cell lines derived from single mouse blastomeres. *Nature* 2006;**439**:216–219.
- Clevers H. Wnt/b-Catenin Signaling in Development and Disease. *Cell* 2006;**127**:469–480.
- Cole MF, Johnstone SE, Newman JJ, Kagey MH, Young RA. Tcf3 is an integral component of the core regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Genes Dev* 2008;**22**:746–755.
- Czechanski A, Byers C, Greenstein I, Schrode N, Donahue LR, Hadjantonakis A-K, Reinholdt LG. Derivation and characterization of mouse embryonic stem cells from permissive and nonpermissive strains. *Nat Protoc* 2014;**9**:559–574.
- Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981;**292**:154–156.
- Faunes F, Hayward P, Descalzo SM, Chatterjee SS, Balayo T, Trott J, Christoforou A, Ferrer-Vaquer A, Hadjantonakis A-K, Dasgupta R, *et al.* A membrane-associated β -catenin/Oct4 complex correlates with ground-state pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Development* [Internet] 2013;**140**:1171–1183.
- González S, Ibáñez E, Santaló J. Influence of E-Cadherin-mediated cell adhesion on mouse embryonic stem cells derivation from isolated blastomeres. *Stem Cell Rev Reports* 2011;**7**:494–505.
- Hackett JA, Dietmann S, Murakami K, Down TA, Leitch HG, Surani MA. Stem Cell Reports. *Stem Cell Reports* [Internet] 2013;**1**:518–531. The Authors.
- Hassani S-N, Pakzad M, Asgari B, Taei A, Baharvand H. Suppression of transforming growth factor β signaling promotes ground state pluripotency from single blastomeres. *Hum Reprod*

2014;**29**:1739–1748.

- Hayashi K, Lopes SMC de S, Tang F, Surani MA. Dynamic Equilibrium and Heterogeneity of Mouse Pluripotent Stem Cells with Distinct Functional and Epigenetic States. *Cell Stem Cell* 2008;**3**:391–401.
- Joo JY, Choi HW, Kim MJ, Zaehres H, Tapia N, Stehling M, Jung KS, Tae J, Schöler HR. Establishment of a primed pluripotent epiblast stem cell in FGF4-based conditions. *Sci Rep* [Internet] 2014;**4**:7477.
- Kim H, Wu J, Ye S, Tai CI, Zhou X, Yan H, Li P, Pera M, Ying QL. Modulation of beta-catenin function maintains mouse epiblast stem cell and human embryonic stem cell self-renewal. *Nat Commun* [Internet] 2013;**4**:2403. Nature Publishing Group.
- Kunath T, Saba-El-Leil MK, Almousaillekh M, Wray J, Meloche S, Smith A. FGF stimulation of the Erk1/2 signalling cascade triggers transition of pluripotent embryonic stem cells from self-renewal to lineage commitment. *Development* [Internet] 2007;**134**:2895–2902.
- Lee K-H, Chuang C-K, Guo S-F, Tu C-F. Simple and efficient derivation of mouse embryonic stem cell lines using differentiation inhibitors or proliferation stimulators. *Stem Cells Dev* 2012;**21**:373–383.
- Mak W, Nesterova TB, Napoles M de, Appanah R, Yamanaka S, Otte AP, Brockdorff N. Reactivation of the Paternal X Chromosome in Early Mouse Embryos. *Science (80-)* 2004;**303**:666–669.
- Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *PNAS* 1981;**78**:7634–7638.
- Matsui Y, Zsebo K, Hogan BLM. Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell* 1992;**70**:841–847.
- McCloy RA, Rogers S, Caldon CE, Lorca T, Castro A, Burgess A. Partial inhibition of Cdk1 in G2 phase overrides the SAC and decouples mitotic events. *Cell Cycle* 2014;**13**:1400–1412.
- Nagy A, Vintersten K, Behringer R. *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, 3rd ed.* Cold Spring Harb Lab Press 2003; New York.
- Nichols J, Smith A. Naive and Primed Pluripotent States. *Cell Stem Cell* [Internet] 2009;**4**:487–492. Elsevier Inc.
- Nichols J, Smith A. Pluripotency in the Embryo and in Culture. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012;**4**:1–15.
- Ogawa K, Nishinakamura R, Iwamatsu Y, Shimosato D, Niwa H. Synergistic action of Wnt and LIF in maintaining pluripotency of mouse ES cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;**343**:159–166.
- Okamoto I, Otte AP, Allis CD, Reinberg D, Heard E. Epigenetic Dynamics of Imprinted X Inactivation During Early Mouse Development. *Science (80-)* 2004;**303**:644–650.
- Pereira L, Yi F, Merrill BJ. Repression of Nanog gene transcription by Tcf3 limits embryonic stem cell self-renewal. *Mol Cell Biol* 2006;**26**:7479–7491.
- Saj A, Chatterjee SS, Zhu B, Cukuroglu E, Gocha T, Zhang X, Göke J, DasGupta R. Disrupting

interactions between b-catenin and activating TCFs reconstitutes ground state pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Stem Cells* 2017;

Silva J, Smith A. Capturing Pluripotency. *Cell* 2008;**132**:532–536.

Sim Y-J, Kim M-S, Nayfeh A, Yun Y-J, Kim S-J, Park K-T, Kim C-H, Kim K-S. 2i Maintains a Naive Ground State in ESCs through Two Distinct Epigenetic Mechanisms. *Stem Cell Reports* [Internet] 2017;**8**:1–17. ElsevierCompany.

Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, Wong GG, Moreau J, Stahl M, Rogers D. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 1988;**336**:688–690.

Sugimoto M, Kondo M, Koga Y, Shiura H, Ikeda R, Hirose M, Ogura A, Murakami A, Yoshiki A, Sousa Lopes SMC De, *et al.* A simple and robust method for establishing homogeneous mouse epiblast stem cell lines by Wnt inhibition. *Stem Cell Reports* [Internet] 2015;**4**:744–757. The Authors.

Tesar P., Chenoweth J., Brook F., Timothy J., Evans E., Mack D., Gardner R., McKay RD. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* 2007;**448**:196–199.

Wakayama S, Hikichi T, Suetsugu R, Sakaide Y, Bui H-T, Mizutani E, Wakayama T. Efficient establishment of mouse embryonic stem cell lines from single blastomeres and polar bodies. *Stem Cells* 2007;**25**:986–993.

Ward CM, Stern P, Willington M a, Flenniken AM. Efficient germline transmission of mouse embryonic stem cells grown in synthetic serum in the absence of a fibroblast feeder layer. *Lab Invest* [Internet] 2002;**82**:1765–1767.

Weinberger L, Ayyash M, Novershtern N, Hanna JH. Dynamic stem cell states: naive to primed pluripotency in rodents and humans. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2016;**17**:155–169. Nature Publishing Group.

Williams RL, Hilton DJ, Pease S, Willson TA, Stewart CL, Gearing DP, Wagner EF, Metcalf D, Nicola NA, Gough NM. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 1988;**336**:684–687.

Wu Y, Liu F, Liu Y, Liu X, Ai Z, Guo Z, Zhang Y. GSK3 inhibitors CHIR99021 and 6-bromoindirubin-3'-oxime inhibit microRNA maturation in mouse embryonic stem cells. *Sci Rep* [Internet] 2015;**5**:8666.

Ye S, Liu D, Ying Q-L. Signalling pathways in induced naïve pluripotency. *Curr Opin Genet Dev* 2014;**0**:10–15.

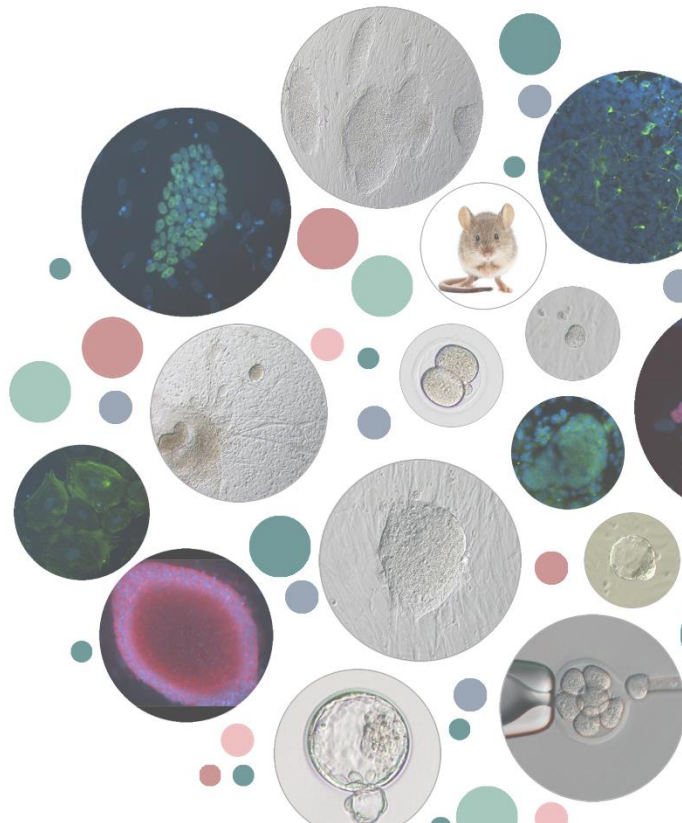
Ying Q-L, Wray J, Nichols J, Battle-Morera L, Doble B, Woodgett J, Cohen P, Smith A. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* 2008;**453**:519–523.

Ying QL, Nichols J, Chambers I, Smith A. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell* 2003;**115**:281–292.

Zhang H, Gayen S, Xiong J, Zhou B, Shanmugam AK, Karatas H, Liu L, Rao RC, Wang S, Nesvizhskii AI, *et al.* MLL1 inhibition reprograms epiblast stem cells to naïve pluripotency. *Cell Stem*

Cell 2016;**18**:481–494.

4. DISCUSSIÓ



El procés de derivació de línies de ESCs depèn d'un conjunt de factors relacionats amb el propi embrió i les condicions de cultiu a les que se sotmeten les cèl·lules. L'èxit d'aquest procés rau en el manteniment de la pluripotència, una propietat que, in vivo, té una durada molt breu malgrat que in vitro es pot mantenir indefinidament si es donen les condicions adequades. L'establiment de línies d'ESCs permet aprofundir en l'estudi del manteniment de la pluripotència, dels processos de diferenciació cel·lular que es donen durant els primers estadis embrionaris i, fins i tot, en el cas de les SCs humanes permet realitzar assaigs clínics en el camp de la medicina regenerativa. Com que els primers estudis clínics indiquen que les ESCs són més estables en cultiu que les iPSCs (*Trounson and DeWitt, 2016*), és interessant estudiar els mecanismes que intervenen en la derivació i cultiu de les ESCs per tal d'optimitzar el procés i minimitzar la utilització d'embrions.

Amb aquesta voluntat, la present tesi doctoral ha estudiat quines són les variables que modulen l'eficiència de la derivació de ESCs de ratolí. Concretament, s'ha analitzat la influència del fons genètic de la soca donadora d'embrions, els suplementes del medi de cultiu i els moduladors de les vies de senyalització de Wnt i de les MAPK en l'eficiència de derivació de línies mESC a partir de blastòmers aïllats d'embrions a l'estadi de 8 cèl·lules. Totes aquestes variables també s'han estudiat en línies control, derivades a partir d'embrions a l'estadi de blastocist. A més a més, en aquesta tesi també s'han estudiat les característiques de les línies establertes a partir de blastòmers aïllats per tal d'inferir l'activitat de la via de Wnt i l'estat de pluripotència, *naïve* o *primed* de les cèl·lules obtingudes.

El fet de treballar amb blastòmers 1/8 és avantatjós, ja que aquests presenten un patró d'expressió gènica més semblant al de les cèl·lules de l'epiblast preimplantacional, que s'han identificat com l'anàleg in vivo de les mESCs (*Boroviak et al., 2014*), que els blastòmers aïllats d'embrions en estadis més primerencs. Tanmateix, els blastòmers 1/8, a diferència de les cèl·lules de l'epiblast preimplantacional, resten lliures de senyals específiques de llinatge i es mantenen totipotents. Cosa que els permet donar lloc tant a cèl·lules amb característiques de TE, com a cèl·lules similars a les de la ICM (*Chung et al., 2006; González et al., 2011*). Aquest fet suggereix que l'èxit del procés de derivació de línies de mESCs a partir de blastòmers aïllats podria recaure en les condicions de cultiu i la senyalització cel·lular a la que se sotmeten els blastòmers.

En un primer estudi, es va determinar l'efecte del fons genètic de la soca donadora d'embrions estudiant el comportament d'embrions provinents de la soca permissiva 129S2 x C57BL, la soca no permissiva o refractària CBA i la soca híbrida B6CBAF2 no classificada en termes de permissivitat. L'estudi de la permissivitat dels embrions provinents de soques híbrides és especialment interessant ja que aquestes soques, a diferència de les soques endogàmiques, tenen la particularitat de generar un major nombre d'embrions que, a més a més, presenten un major potencial de desenvolupament a causa del vigor híbrid (*Behringer et al., 2014*). En tots els estudis realitzats els embrions i blastòmers provinents de la soca B6CBAF2 es van comportar igual que els embrions i blastòmers provinents de la soca 129S2 x C57BL, suggerint que en aquesta soca híbrida domina el fons genètic permissiu C57BL per sobre del fons refractari CBA.

Tanmateix, la importància de la permissivitat de les soques és relativa en funció del medi de cultiu en el que es sembren els embrions. Estudis previs ja van demostrar que el cultiu d'embrions del mateix fons genètic en un medi suplementat amb FCS i LIF dona eficiències de derivació significativament inferiors a les eficiències obtingudes en un medi suplementat amb el substitutiu del sèrum KSR i LIF (*Cheng et al., 2004; González et al., 2010; Davies and Fairchild, 2012*), suggerint que els factors de creixement i citocines que conté el FCS podrien induir la diferenciació cel·lular (*Ogawa et al., 2004; Bryja et al., 2006*). A més a més, les cèl·lules cultivades en presència de KSR i LIF tenen un patró d'expressió gènica similar al de les cèl·lules cultivades en 2i. Aquest patró difereix del patró que presenten les cèl·lules cultivades en FCS i LIF, que s'han descrit com a mESCs de pluripotència *primed* (*Gonzalez et al., 2016; Meyenn et al., 2016*). A la vista d'aquests resultats, en el nostre estudi tan sols vàrem utilitzar els suplementes definits i lliures de sèrum KSR i N2B27.

Els embrions provinents de soques permissives cultivats en medi suplementat amb KSR i LIF (d'ara endavant KSR/LIF), van donar eficiències de derivació superiors a les obtingudes a partir d'embrions de la soca refractària. Aquest resultat concorda amb el fet que els embrions i blastòmers provinents de soques permissives tenen la capacitat inherent d'activar la via de JAK/STAT3 en presència de LIF i a la vegada inhibir, o si més no controlar, l'activació de la via de les MAPK que desencadena el mateix lligand (*Ohtsuka and Niwa, 2015*). D'altra banda, els embrions i blastòmers provinents de soques refractàries, presenten la situació

inversa i sobreactiven la via de les MAPK que condueix a la diferenciació cel·lular (*Burdon et al., 1999; Kunath et al., 2007*).

En derivar línies de mESCs a partir de blastòmers aïllats en KSR/LIF, les eficiències de derivació van disminuir dràsticament. Els blastòmers del fons genètic 129S2 x C57BL van presentar les eficiències de derivació més elevades, mentre que a partir de blastòmers de la soca CBA no es van poder establir línies de mESCs. Tanmateix, les diferències entre els fons genètics van desaparèixer quan els embrions i blastòmers es van cultivar en medi suplementat amb N2B27 i LIF (d'ara endavant N2B27/LIF), que indueix la diferenciació neural de les mESCs a no ser que les cèl·lules expressin nivells elevats de NANOG (*Ying and Smith, 2003*). En aquestes condicions, els embrions i blastòmers van ser capaços de donar un nombre elevat d'*outgrowths*, que es van diferenciar o estancar durant els primers passatges donant eficiències de derivació extremadament baixes. Aquests resultats confirmen que el cultiu d'embrions i blastòmers en KSR/LIF dona eficiències de derivació superiors a les obtingudes en N2B27/LIF, independentment de la soca donadora d'embrions. Per això podem determinar que el KSR/LIF promou l'autorenovació i el manteniment de la pluripotència d'una manera més eficient que el medi que conté N2B27/LIF. Malgrat tot, el KSR/LIF no és capaç de contrarestar la baixa activació de la via de JAK/STAT3 ni l'activació de la via de les MAPK que es dona en les línies derivades d'embrions i blastòmers de fons genètic refractari, indicant que manca una senyalització cel·lular adient per a establir línies de mESCs amb elevada eficiència.

Cal tenir en compte que la utilització de KSR comporta certs inconvenients. D'una banda el KSR és un suplement la composició del qual no és pública i, tal com hem observat en els estudis d'aquesta tesi i s'havia descrit anteriorment, presenta variabilitat entre diferents lots (*Cheng et al., 2004; Chaudhry et al., 2008*). Aquest fet dificulta l'obtenció de resultats reproduïbles i l'aplicació del suplement en estudis clínics posteriors.

A més a més, en el segon estudi es va veure que les línies derivades en KSR/LIF a partir de blastòmers aïllats presentaven algunes colònies amb signes de diferenciació perifèrica i una baixa activitat de l'enzim ALP, relacionats amb l'estat de pluripotència *primed* (*ten Berge et al., 2011; Sim et al., 2017*). D'altra banda, aquestes línies van expressar nivells basals del marcador d'epiblast post-implantacional FGF5, tret característic de l'estat de pluripotència *naïve* (*Sim et al.,*

2017). Per tant, les línies derivades en KSR/LIF van presentar característiques d'ambdós estats de pluripotència, suggerint que es troben en un estat intermedi entre la pluripotència *naïve* i *primed*. A més a més, les línies derivades en KSR/LIF van presentar nivells elevats de la proteïna AXINA2, indicant que en aquestes cèl·lules es transcriuen els gens diana regulats per la via de Wnt, que per tant és activa. Aquest darrer resultat difereix del que s'ha descrit en línies derivades a partir d'embrions sencers cultivats en KSR/LIF en absència de cèl·lules nodridores (Wu et al., 2015), que no presenten l'activitat transcripcional de la via. Tanmateix, com que les línies de mESCs derivades de blastòmers aïllats requereixen la presència de cèl·lules nodridores per a desenvolupar-se fins a donar un *outgrowth* (Boroviak et al., 2014; Hassani et al., 2014), podria ser que els lligands de Wnt secretats per aquestes cèl·lules (ten Berge et al., 2011) fossin els responsables de l'activació de la via de Wnt i la seva activitat transcripcional.

Per a comprovar l'efecte de les vies de senyalització en la derivació de mESCs i veure si la modulació d'aquestes té algun efecte dominant sobre els paràmetres ja descrits, es va utilitzar, d'entrada, el còctel 2i en presència de LIF. S'ha descrit que en línies derivades a partir d'embrions sencers, l'activació de la via de Wnt promou la supervivència de les cèl·lules i n'inhibeix la diferenciació neural malgrat que indueix la diferenciació cap a cèl·lules no neurals (Ying et al., 2008). Wnt també s'encarrega de mantenir la pluripotència *naïve* de les mESC a través de la transcripció de gens de manteniment de la pluripotència regulats per aquesta via (Wray et al., 2011) i a través del complex de membrana que s'estableix amb OCT4, E-CADHERINA i β -CATENINA (Faunes et al., 2013). És interessant remarcar que la inhibició de la via de Wnt promou el manteniment de la pluripotència *primed* en línies de EpiSCs de ratolí i línies de mESCs diferenciades (ten Berge et al., 2011; Kim et al., 2013; Sugimoto et al., 2015), indicant que aquesta via juga un paper clau en el manteniment de la pluripotència i la determinació del seu estat. D'altra banda, la inhibició de la via de les MAPK disminueix la diferenciació de les mESCs tot i que en condiciona la viabilitat (Ying et al., 2008). Per això la majoria d'estudis utilitzen el còctel 2i que suma els efectes causats per l'activació de la via de Wnt exercida per CHIR amb la inhibició de la via de les MAPK exercida per PD.

Com ja s'havia descrit en altres treballs, l'addició de 2i al cultiu en KSR/LIF va donar lloc a eficiències de derivació elevades independentment del fons genètic dels blastocists sembrats (Lee et al., 2012). A més, aquestes eficiències van ser

comparables a les que s'havien obtingut prèviament en KSR/LIF utilitzant blastocists de soques permissives. Això suggereix que PD és suficient per a inhibir la senyalització de la via de les MAPK que s'activa en els embrions de la soca refractària CBA en presència de LIF. D'acord amb el que havien descrit altres treballs (*Ying et al., 2008; Czechanski et al., 2014*), l'addició de 2i al medi N2B27/LIF va incrementar les eficiències de derivació a partir de blastocists dels tres fons genètics estudiats donant eficiències equivalents a les obtingudes en KSR/LIF/2i. En derivar línies de mESCs a partir de blastòmers aïllats, l'addició del còctel 2i al N2B27/LIF va provocar que la majoria de blastòmers derivessin en *outgrowths* molt plans i vacuolats que no van progressar. Per això, les eficiències de derivació obtingudes en cultivar blastòmers provinents d'embrions dels tres fons genètics en N2B27/LIF/2i van ser baixes i equivalents a les obtingudes en N2B27/LIF. Aquest resultat contrasta amb els resultats d'un estudi previ en el que van aconseguir derivar línies de mESC amb les eficiències més elevades descrites fins ara a partir de blastòmers 1/8 aïllats d'embrions de soques refractàries en N2B27/2i (25%) i N2B27/PD i l'inhibidor de TGF- β SB431542 (50%) (*Hassani et al., 2014*), tot i que el nombre d'embrions utilitzats en aquest estudi va ser molt baix (3–6 embrions). Sorprenentment, en cultivar els blastòmers en KSR/LIF/2i l'eficiència de derivació de les línies establertes a partir de blastòmers aïllats d'embrions de soques permissives va augmentar significativament, mentre que els blastòmers de la soca CBA van donar baixes eficiències de derivació equivalents a les obtingudes en KSR/LIF.

Globalment, aquests resultats suggereixen que els blastòmers aïllats tenen uns requeriments de cultiu més elevats que els blastocists ja que, quan es cultiven en les condicions òptimes per a la derivació de mESCs a partir d'embrions sencers (2i/LIF i un suplement del medi), tan sols els blastòmers aïllats d'embrions amb fons genètics permissius permeten establir línies de mESCs amb eficiències moderadament elevades. Com que els blastòmers 1/8 no presenten un patró d'expressió gènica que indiqui predisposició cap a un llinatge embrionari concret (*Galán et al., 2010*), mantenen el potencial per a establir línies de TSCs i mESCs (*Chung et al., 2006; González et al., 2011*). Per això la inhibició de senyals que condueixen a la diferenciació a TE, com per exemple la inhibició d'ERK2 de la membrana apical dels blastòmers a l'estadi de 8 cèl·lules (*Lu et al., 2008*), promou la determinació a cèl·lules similars a les de la ICM capaces d'establir línies de mESCs. Fet que concorda amb l'increment de l'eficiència de derivació

observat en afegir 2i al cultiu en KSR/LIF de blastòmers provinents d'embrions de fons genètics permissius.

En el segon estudi on vam caracteritzar amb més detall les línies establertes a partir de blastòmers aïllats d'embrions 129S2 x C57BL cultivats en KSR/LIF/2i, vam observar que aquestes línies expressaven AXINA2, apuntant que la presència de 2i manté activa la transcripció dels gens de pluripotència regulats per Wnt (*Wray et al., 2011*). A més a més, el tractament amb 2i promou el manteniment de l'estat de pluripotència *naïve* (*Nichols and Smith, 2009*) i permet reprogramar línies de pluripotència incompleta, com les iPSCs, a l'estat de pluripotència *naïve* (*Silva et al., 2008*). Conseqüentment, vam observar que les colònies de mESCs cultivades en presència de 2i presentaven característiques de l'estat de pluripotència *naïve*. Amb tot, aquestes línies, igual que les línies establertes en KSR/LIF, van presentar nivells basals, però moderadament elevats, del marcador d'epiblast post-implantacional FGF5. En canvi, vam observar nivells ínfims d'aquest marcador en les línies derivades en N2B27/LIF/2i, indicant que, tal i com s'ha descrit en línies cultivades en FCS (*Brons et al., 2007*), algun dels components del KSR n'indueix l'expressió. Cal remarcar que les línies que presenten nivells basals de FGF5 derivades en medi amb KSR/LIF/2i s'estableixen molt més fàcilment que les línies derivades en N2B27/LIF/2i. Aquest fet suggereix que cal arribar a un compromís entre l'eficiència de derivació, promoguda pel medi amb KSR, i l'assoliment d'un estat de pluripotència plenament *naïve*, afavorit pel medi amb N2B27, en les línies establertes a partir de blastòmers aïllats. Per això, per acabar de determinar el potencial de les línies quasi *naïve* derivades en KSR/LIF/2i, caldria injectar les mESCs establertes a blastocists. Així podríem confirmar si, tal i com s'ha descrit en altres articles (*Wakayama et al., 2007*), aquestes mESCs mantenen la capacitat de participar en la formació d'individus quimera i colonitzar la línia germinal. Finalment, aquests resultats apunten que, a diferència del que s'ha descrit en iPSCs (*Silva et al., 2008*), el tractament amb 2i no és capaç de reprogramar les línies de mESCs derivades de blastòmers 1/8 en KSR/LIF/2i a un estat de pluripotència plenament *naïve*. Per tant, indiquen que el tractament amb 2i no és suficient per a contrarestar la senyalització induïda per factors com el KSR.

Si bé és clar que l'acció conjunta de CHIR i PD millora l'eficiència de derivació de les línies de mESC a partir de blastòmers aïllats, no es coneix quin és l'efecte que provoca l'ús individual de cadascun dels modificadors en aquestes cèl·lules. En

cultivar els blastòmers aïllats en KSR/LIF i CHIR es va obtenir un nombre elevat d'*outgrowths*, la majoria dels quals es van diferenciar durant les segon passatge. Per això, l'eficiència de derivació va ser molt baixa, equivalent a l'obtinguda en el grup de blastòmers sense tractament. Així doncs, tal i com ocorre en línies derivades a partir d'embrions sencers, l'activació de Wnt conjugada amb LIF i cèl·lules nodradores permet mantenir la pluripotència amb eficiències similars al grup sense tractament (*ten Berge et al., 2011*). Les línies obtingues a partir dels blastòmers tractats amb CHIR, van presentar activitat transcripcional de la via de Wnt, i les mateixes característiques de l'estat de pluripotència quasi *naïve* observades en blastòmers tractats amb 2i.

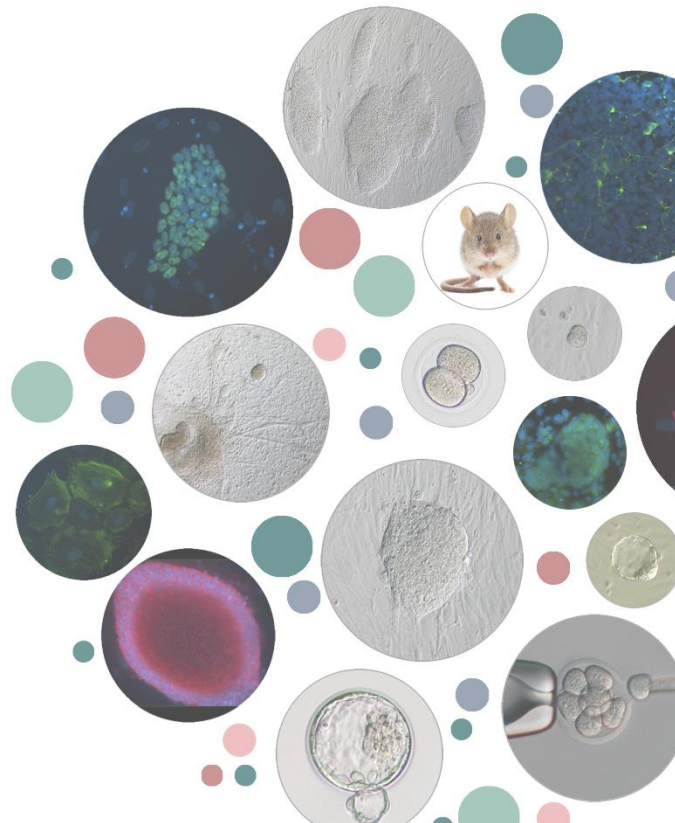
En cultivar els blastòmers en KSR/LIF i PD, en canvi, es va obtenir un nombre d'*outgrowths* moderat. Tanmateix, la majoria d'aquests es van desenvolupar donant un major nombre de línies de mESCs. Aquests resultats van confirmar que, tal com s'ha descrit en línies derivades a partir d'embrions sencers, la presència de PD al medi inhibeix l'activació de les MAPK que condueix a la diferenciació cel·lular (*Lu et al., 2008; Ying et al., 2008*). Les línies tractades amb PD van presentar nivells ínfims d'AXINA2, indicant que l'activitat transcripcional de Wnt no és activa en aquestes línies. Aquest resultat contradiu la hipòtesi que els lligands de Wnt segregats per les cèl·lules nodradores activarien la transcripció dels gens diana de Wnt. Tanmateix, un estudi recent ha determinat, en línies derivades a partir d'embrions sencers, que la presència de PD disminueix la transcripció d'aquests gens, suggerint que existeix un mecanisme d'interacció entre les dues vies (*Saj et al., 2017*). D'acord amb els nostres resultats, aquest mecanisme d'interacció també s'estaria donant en les línies de mESCs derivades a partir de blastòmers aïllats. Les línies establertes en presència de PD van presentar un estat intermedi de pluripotència indicant que, a diferència del que s'ha descrit en línies derivades a partir de blastocists sencers, les línies establertes a partir de blastòmers aïllats no són capaces de mantenir l'estat de pluripotència *naïve* (*Sim et al., 2017*). En conjunt l'estudi de l'efecte del CHIR i PD confirma que existeix un efecte additiu entre l'acció dels dos moduladors. A més a més, tal com s'ha descrit en mESCs derivades d'embrions sencers, CHIR és el responsable de promoure les característiques que condueixen a l'estat de pluripotència *naïve* (*Sim et al., 2017*), mentre que PD promou la inhibició de la diferenciació cel·lular (*Kunath et al., 2007*).

Els estudis d'aquesta tesi mostren que, d'entre totes les variables estudiades, la senyalització cel·lular és el determinant més important de l'eficiència de derivació. A més a més, en les línies derivades a partir de blastòmers aïllats, les modulacions de la senyalització cel·lular no sempre provoquen els mateixos efectes que s'han descrit en línies derivades a partir d'embrions sencers. Per això, per acabar de determinar l'efecte de la modulació de la via de Wnt vam utilitzar IWR per veure si l'absència de l'activació de Wnt confirmava la necessitat de la via en la derivació de mESCs. Dels blastòmers tractats amb IWR en vam obtenir l'eficiència de derivació més baixa. L'absència d'AXINA2 va confirmar que l'activitat transcripcional dels gens diana de Wnt s'havia inhibit correctament i, respecte l'estat de pluripotència, les línies derivades en presència de IWR van presentar, de nou, un estat intermedi. Cal remarcar que els resultats obtinguts en altres estudis realitzats amb SCs provinents d'un embrió sencer, determinen que l'acció única d'un inhibidor de Wnt no és suficient per a mantenir la pluripotència de les cèl·lules (*ten Berge et al., 2011; Kim et al., 2013; Sugimoto et al., 2015*).

Per a comprovar definitivament si l'absència de Wnt ens permetia derivar mESCs, vam combinar l'IWR amb PD. Tenint en compte estudis previs, vam decidir afegir també un grup amb la combinació de IWR i CHIR, ja que s'ha descrit que promou la derivació de EpiSC a partir d'epiblasts post-implantacionals de ratolí (*Kim et al., 2013*). Aquests dos tractaments van donar eficiències de derivació moderadament elevades. Sorprenentment, aquestes línies van presentar nivells intermedis d'AXINA2, tot i la presència de l'inhibidor de Wnt. Com que no vam poder determinar si l'AXINA2 es localitzava preferentment al citoplasma, no podem saber si, tal com s'ha descrit en línies derivades a partir d'embrions sencers, es va formar el complex citoplasmàtic de manteniment de la pluripotència *primed* compost per l'AXINA2 i la β -CATENINA, induït pel tractament amb IWR-CHIR (*Kim et al., 2013*). Les mESCs derivades en IWR-CHIR i IWR-PD van presentar les mateixes característiques que les línies derivades en presència de IWR excepte que van presentar nivells de FGF5 clarament superiors, suggerint que en aquests tractaments sí que s'havia induït l'estat de pluripotència *primed*. Malgrat que les línies derivades en IWR-CHIR i IWR-PD es comporten igual, d'acord amb els indicadors estudiats, no podem descartar que en estudis futurs més detallats es puguin trobar diferències entre els dos tractaments pel que fa a l'estat de pluripotència d'aquestes línies o la transcripció de diferents gens regulats per la via de Wnt.

L'anàlisi global dels estudis realitzats en aquesta tesi doctoral ha permès aclarir quina és la importància del fons genètic de la soca donadora d'embrions, els suplementes del medi de cultiu i la senyalització cel·lular en la derivació de línies de mESCs a partir de blastòmers aïllats a l'estadi de 8 cèl·lules. Els resultats d'aquesta tesi determinen que la correcta modulació de les vies de senyalització és essencial per a establir línies de mESCs amb èxit. En aquest sentit, l'estudi de l'activació de la transcripció dels gens diana regulats per la via de Wnt, les característiques morfològiques de les línies establertes, l'activitat de l'enzim ALP i la presència del marcador d'epiblast post-implantacional FGF5 han aclarit quin és l'efecte de les diferents modulacions de les vies de senyalització. D'acord amb els treballs d'aquesta tesi, el millor mètode per a derivar línies de mESCs a partir de blastòmers aïllats és cultivar blastòmers 1/8 provinents d'embrions amb fons genètic permissiu en medi suplementat amb KSR i 2i. D'aquesta manera s'estableixen línies amb la màxima eficiència de derivació i es manté l'estat de pluripotència *naïve* de les línies establertes. D'altra banda, també podem determinar que amb els estímuls adequats, els blastòmers poden establir línies de mESCs amb característiques d'ambdós estats de pluripotència. A més a més, els resultats d'aquesta tesi determinen que les línies de mESCs derivades a partir de blastòmers aïllats no es comporten igual que les línies establertes a partir d'embrions sencers, essent aquests últims els que donen eficiències de derivació superiors. D'acord amb els resultats obtinguts, constatem que donar una senyalització a les cèl·lules que les faci més similars a les cèl·lules de la ICM comporta un increment de l'eficiència de derivació de mESCs. Per això, i tenint en compte que el manteniment de la pluripotència dels *outgrowths* i epiblasts preimplantacionals ja es dona correctament, proposem que conduir els blastòmers cap a un fenotip similar al de les cèl·lules de la ICM i l'epiblast preimplantacional és el que, en treballs futurs, pot millorar l'eficiència de derivació de línies de mESCs a partir de blastòmers aïllats.

5. CONCLUSIONS

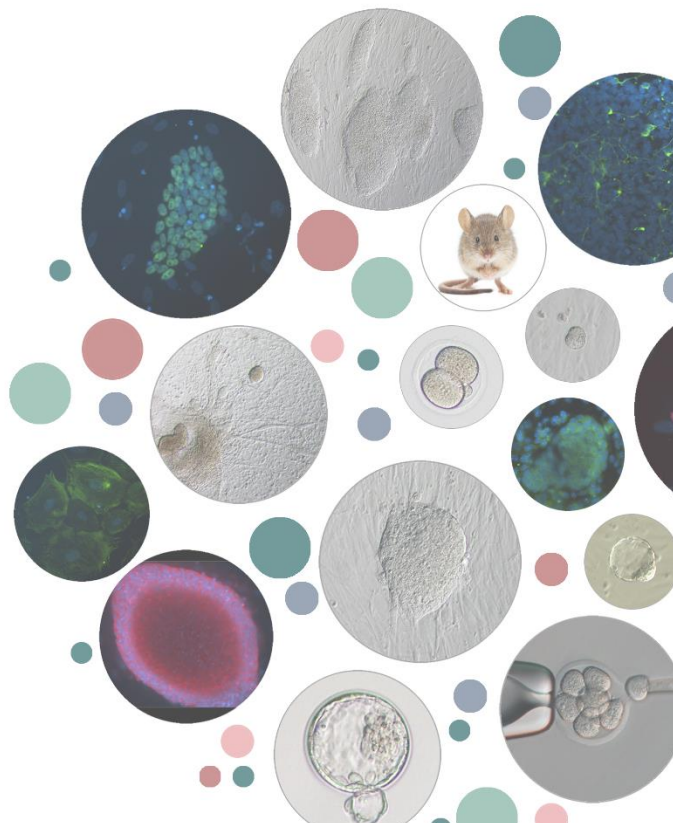


A partir dels treballs realitzats en aquesta tesi sobre les variables que influeixen en el procés de derivació de línies de mESCs a partir de blastòmers aïllats i les característiques de les línies resultants, i d'acord amb els objectius establerts, podem concloure que:

1. S'ha confirmat que els blastòmers tenen uns requeriments superiors, pel que fa a les condicions de cultiu, que els embrions sencers en l'establiment de línies de mESCs. Les condicions de cultiu utilitzades per a la derivació de línies de mESCs derivades a partir d'embrions sencers no sempre són aplicables a la derivació de línies establertes a partir de blastòmers aïllats.
2. Els embrions i blastòmers de la soca B6CBAF2 tenen un comportament permissiu pel que fa a l'establiment de línies de mESCs, equivalent a l'observat en els embrions i blastòmers de la soca 129S2 x C57BL en qualsevol de les condicions de cultiu estudiades.
3. Els blastòmers provinents d'embrions de soques refractàries no són capaços d'establir de manera eficient línies de mESCs independentment de les condicions de cultiu analitzades.
4. El cultiu dels blastòmers en absència de moduladors de les vies de senyalització dificulta l'establiment de línies de mESCs.
5. Per a derivar línies de mESCs a partir de blastòmers aïllats, l'òptim és sembrar blastòmers biopsiats d'embrions de fons genètics permissius en medi suplementat amb KSR, LIF i 2i. En aquestes condicions es poden establir línies de mESCs amb una eficiència propera al 25%.
6. Els tractaments continuats amb IWR o amb CHIR no milloren l'eficiència de derivació de línies de mESCs a partir de blastòmers aïllats respecte els no tractats, mentre que el tractament continuat amb PD en millora l'eficiència ja que inhibeix, en gran part, els processos de diferenciació. El tractament amb CHIR manté la via de Wnt activa i promou les característiques de pluripotència *naïve*, mentre que els tractaments amb IWR o PD mantenen la via de Wnt inactiva i donen línies amb característiques intermèdies entre l'estat de pluripotència *naïve* i *primed*.

7. El tractament continuat amb IWR-CHIR o IWR-PD permet derivar línies de mESCs amb eficiències moderadament elevades, comparables a les obtingudes en 2i. Les línies tractades amb IWR-CHIR i IWR-PD presenten una activació intermèdia de la via de Wnt i característiques de pluripotència *primed*.
8. El tractament continuat amb 2i permet derivar línies de mESCs a partir de blastòmers 1/8 amb la major eficiència. Les línies tractades amb 2i mantenen la via de Wnt activa i presenten característiques de pluripotència *naïve*.
9. L'activació de la via de Wnt comporta l'obtenció de línies de mESCs amb característiques de l'estat de pluripotència *naïve*, mentre que la inhibició de Wnt tan sols indueix característiques de l'estat de pluripotència *primed* quan s'acompanya d'altres modulacions de la senyalització cel·lular.

6. BIBLIOGRAFIA



A

Abranches E, Guedes AM V, Moravec M, Maamar H, Svoboda P, Raj A, Henrique D. Stochastic NANOG fluctuations allow mouse embryonic stem cells to explore pluripotency. *Development* [Internet] 2014;**141**:2770–2779.

Ambrosetti DC, Basilico C, Dailey L. Synergistic activation of the fibroblast growth factor 4 enhancer by Sox2 and Oct-3 depends on protein–protein interactions facilitated by a specific spatial arrangement of factor binding sites. *Mol Cell Biol* [Internet] 1997;**17**:6321–6329.

Aoki F, Worrall DM, Schultz RM. Regulation of transcriptional activity during the first and second cell cycles in the preimplantation mouse embryo. *Dev Biol* 1997;**181**:296–307.

Arabadjiev B, Petkova R, Momchilova A, Chakarov S, Pankov R. Of mice and men – differential mechanisms of maintaining the undifferentiated state in mESC and hESC. *Biodiscovery* [Internet] 2012;1–13 Available from: <http://www.biodiscoveryjournal.co.uk/Article/Maintaining-the-undifferentiated-state-in-esc>.

Arnold SJ, Robertson EJ. Making a commitment: cell lineage allocation and axis patterning in the early mouse embryo. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet] 2009;**10**:91–103.

Auerbach W, Dunmore J., Fairchild–Huntress V, Fang Q, Auerbach A., Huszar D, Joyner A. Short Technical Reports. *Biotechniques* 2000;**29**:1025–1032.

Avior Y, Sagi I, Benvenisty N. Pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet] 2016;**17**:170–182. Nature Publishing Group.

B

Bachvarova R, Leon V De. Polyadenylated RNA of mouse ova and loss of maternal RNA in early development. *Dev Biol* 1980;**74**:1–8.

- Baron R, Kneissel M. WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nat Med* [Internet] 2013;**19**:179-192. Nature Publishing Group.
- Batlle-Morera L, Smith A, Nichols J. Parameters influencing derivation of embryonic stem cells from murine embryos. *Genesis* 2008;**46**:758-767.
- Bechard M, Dalton S. Subcellular Localization of Glycogen Synthase Kinase 3 β Controls Embryonic Stem Cell Self-Renewal. *Mol Cell Biol* [Internet] 2009;**29**:2092-2104.
- Bechard M, Trost R, Singh a. M, Dalton S. Fratacin is a Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt-Regulated Determinant of Glycogen Synthase Kinase 3 Subcellular Localization in Pluripotent Cells. *Mol Cell Biol* 2012;**32**:288-296.
- Bedzhov I, Alotaibi H, Basilicata MF, Ahlborn K, Liszewska E, Brabletz T, Stemmler MP. Adhesion, but not a specific cadherin code, is indispensable for ES cell and induced pluripotency. *Stem Cell Res* [Internet] 2013;**11**:1250-1263. Elsevier B.V.
- Bedzhov I, Zernicka-Goetz M. Self-organizing properties of mouse pluripotent cells initiate morphogenesis upon implantation. *Cell* [Internet] 2014;**156**:1032-1044. Elsevier Inc.
- Behringer R, Gertsenstein M, Vintersten Nagy K, Nagy A. *Manipulating the Mouse Embryo a laboratory manual*. 2014; Cold Spring Harbor Lab Press: New York.
- Berge D ten, Kurek D, Blauwkamp T, Koole W, Maas A, Eroglu E, Siu RK, Nusse R. Embryonic stem cells require Wnt proteins to prevent differentiation to epiblast stem cells. *Nat Cell Biol* [Internet] 2011;**13**:1070-1075. Nature Publishing Group.
- Biancotti JC, Narwani K, Buehler N, Mandefro B, Golan-Lev T, Yanuka O, Clark A, Hill D, Benvenisty N, Lavon N. Human embryonic stem cells as models for aneuploid chromosomal syndromes. *Stem Cells* 2010;**28**:1530-1540.
- Bienz M. β -catenin: a pivot between cell adhesion and Wnt signalling. *Curr Biol* 2005;**15**:64-67.
- Biggers JD, McGinnis LK, Raffin M. Amino acids and preimplantation development

- of the mouse in protein-free potassium simplex optimized medium. *Biol Reprod* 2000;**63**:281-293.
- Biswas A, Hutchins R. Embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 2007;**16**:213-221.
- Boroviak T, Loos R, Bertone P, Smith A, Nichols J. The ability of inner-cell-mass cells to self-renew as embryonic stem cells is acquired following epiblast specification. *Nat Cell Biol* [Internet] 2014;**16**:516-528.
- Bouniol C, Nguyen E, Debey P. Endogenous transcription occurs at the 1-cell stage in the mouse embryo. *Exp Cell Res* 1995;**218**:57-62.
- Brembeck FH, Rosário M, Birchmeier W. Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of β -catenin. *Curr Opin Genet Dev* 2006;**16**:51-59.
- Brembeck FH, Schwarz-Romond T, Bakkers J, Wilhelm S, Hammerschmidt M, Birchmeier W. Essential role of BCL9-2 in the switch between β -catenin's adhesive and transcriptional functions. *Genes Dev* 2004;**18**:2225-2230.
- Brons IGM, Smithers LE, Trotter MWB, Rugg-Gunn P, Sun B, Chuva de Sousa Lopes SM, Howlett SK, Clarkson A, Ahrlund-Richter L, Pedersen RA, *et al.* Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* [Internet] 2007;**448**:191-195.
- Brook FA, Gardner RL. The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse. *PNAS* 1997;**94**:5709-5712.
- Bryja V, Bonilla S, Cajánek L, Parish CL, Schwartz CM, Luo Y, Rao MS, Arenas E. An efficient method for the derivation of mouse embryonic stem cells. *Stem Cells* 2006;**24**:844-849.
- Buehr M, Meek S, Blair K, Yang J, Ure J, Silva J, McLay R, Hall J, Ying QL, Smith A. Capture of authentic embryonic stem cells from rat blastocysts. *Cell* [Internet] 2008;**135**:1287-1298. Elsevier Ltd.
- Burdon T, Stracey C, Chambers I, Nichols J, Smith A. Suppression of SHP-2 and ERK signalling promotes self-renewal of mouse embryonic stem cells. *Dev Biol* 1999;**210**:30-43.

C

- Campbell KH, McWhir J, Ritchie WA, Wilmut I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* [Internet] 1996;**380**:64–66.
- Cartwright P, McLean C, Sheppard A, Rivett D, Jones K, Dalton S. LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development* 2005;**132**:885–896.
- Chamberlain SJ, Chen P, Ng KY, Bourgois-rocha F, Lemtiri-chlieh F, Levine ES, Lalande M. Induced pluripotent stem cell models of the genomic imprinting disorders Angelman and Prader – Willi syndromes. *Pnas* 2010;**107**:17668–17673.
- Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 2003;**113**:643–655.
- Chambers I, Silva J, Colby D, Nichols J, Nijmeijer B, Robertson M, Vrana J, Jones K, Grotewold L, Smith A. Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature* [Internet] 2007;**450**:1230–1234.
- Chatot CL, Ziomek CA, Bavister BD, Lewis JL, Torres I. An improved culture medium support development of random-bred 1-cell mouse embryos in vitro. *J Reprod Fertil Ltd* 1989;**86**:679–688.
- Chatterjee SS, Saj A, Gocha T, Murphy M, Gonsalves FC, Zhang X, Hayward P, Oksuz BA, Shen SS, Madar A, *et al.* Inhibition of β -catenin–TCF1 interaction delays differentiation of mouse embryonic stem cells. *J Cell Biol* 2015;**211**:39–51.
- Chaudhry MA, Vitalis TZ, Bowen BD, Piret JM. Basal medium composition and serum or serum replacement concentration influences on the maintenance of murine embryonic stem cells. *Cytotechnology* 2008;**58**:173–179.
- Chazaud C, Yamanaka Y, Pawson T, Rossant J. Early Lineage Segregation between Epiblast and Primitive Endoderm in Mouse Blastocysts through the Grb2–MAPK Pathway. 2006;615–624.

- Chen B, Dodge ME, Tang W, Lu J, Ma Z, Wei S, Hao W, Kilgore J, Williams NS, Michael G, *et al.* in Tissue Regeneration and Cancer. 2009;**5**:100–107.
- Chen X, Ye S, Ying Q–L. Stem cell maintenance by manipulating signaling pathways: past, current and future. *BMB Rep* [Internet] 2015;**48**:668–676.
- Cheng AM, Saxton TM, Sakai R, Kulkarni S, Mbamalu G, Vogel W, Tortorice CG, Cardiff RD, Cross JC, Muller WJ, *et al.* Mammalian Grb2 regulates multiple steps in embryonic development and malignant transformation. *Cell* 1998;**95**:793–803.
- Cheng J, Dutra A, Takesono A, Garrett–Beal L, Schwartzberg PL. Improved generation of C57BL/6J mouse embryonic stem cells in a defined serum–free media. *Genesis* 2004;**39**:100–104.
- Chung Y, Klimanskaya I, Becker S, Li T, Maserati M, Lu SJ, Zdravkovic T, Ilic D, Genbacev O, Fisher S, *et al.* Human embryonic stem cell lines generated without embryo destruction. *Cell Stem Cell* 2008;**2**:113–117.
- Chung Y, Klimanskaya I, Becker S, Marh J, Lu S–J, Johnson J, Meisner L, Lanza R. Embryonic and extraembryonic stem cell lines derived from single mouse blastomeres. *Nature* 2006;**439**:216–219.
- Clevers H. Wnt/b–Catenin Signaling in Development and Disease. *Cell* 2006;**127**:469–480.
- Cole MF, Johnstone SE, Newman JJ, Kagey MH, Young RA. Tcf3 is an integral component of the core regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Genes Dev* 2008;**22**:746–755.
- Condic ML. Totipotency: What It Is and What It Is Not. *Stem Cells Dev* 2014;**23**:796–812.
- Costa–Borges N, Gonzalez S, Santaló J, Ibáñez E. Effect of the enucleation procedure on the reprogramming potential and developmental capacity of mouse cloned embryos treated with valproic acid. *Reproduction* 2011;**141**:789–800.
- Czechanski A, Byers C, Greenstein I, Schrode N, Donahue LR, Hadjantonakis A–K, Reinholdt LG. Derivation and characterization of mouse embryonic stem cells from permissive and nonpermissive strains. *Nat Protoc* 2014;**9**:559–

574.

D

Davidson KC, Mason E a., Pera MF. The pluripotent state in mouse and human. *Development* [Internet] 2015;142:3090–3099.

Davies TJ, Fairchild PJ. Optimization of protocols for derivation of mouse embryonic stem cell lines from refractory strains, including the non obese diabetic mouse. *Stem Cells Dev* [Internet] 2012;21:1688–1700.

Delhaise F, Bralion V, Schuurbiens N, Dessy F. Establishment of an embryonic stem cell line from 8–cell stage mouse embryos. *Eur J Morphol* 1996;34:237–243.

Dunn S–J, Martello G, Yordanov B, Emmott S, Smith a G. Defining an essential transcription factor program for naïve pluripotency. *Science* [Internet] 2014;344:1156–1160.

E

Eggenhofer E, Luk F, Dahlke MH, Hoogduijn MJ. The life and fate of mesenchymal stem cells. *Front Immunol* 2014;5:1–6.

Eiges R, Urbach A, Malcov M, Frumkin T, Schwartz T, Amit A, Yaron Y, Eden A, Yanuka O, Benvenisty N, *et al.* Developmental Study of Fragile X Syndrome Using Human Embryonic Stem Cells Derived from Preimplantation Genetically Diagnosed Embryos. *Cell Stem Cell* 2007;1:568–577.

Eistetter HR. Pluripotent embryonal stem cell lines can be Established from disaggregated mouse moruale. *Development* 1989;31:275–282.

Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981;292:154–156.

F

Faunes F, Hayward P, Descalzo SM, Chatterjee SS, Balayo T, Trott J, Christoforou A, Ferrer-Vaquer A, Hadjantonakis A-K, Dasgupta R, *et al.* A membrane-associated β -catenin/Oct4 complex correlates with ground-state pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Development* [Internet] 2013;**140**:1171-1183.

Fenelon JC, Banerjee A, Murphy BD. Embryonic diapause: Development on hold. *Int J Dev Biol* 2014;**58**:163-174.

Ficz G, Hore TA, Santos F, Lee HJ, Dean W, Arand J, Krueger F, Oxley D, Paul YL, Walter J, *et al.* FGF signaling inhibition in ESCs drives rapid genome-wide demethylation to the epigenetic ground state of pluripotency. *Cell Stem Cell* 2013;**13**:351-359.

Forrai A, Boyle K, Hart AH, Hartley L, Rakar S, Willson T a, Simpson KM, Roberts AW, Alexander WS, Voss AK, *et al.* Absence of suppressor of cytokine signalling 3 reduces self-renewal and promotes differentiation in murine embryonic stem cells. *Stem Cells* 2006;**24**:604-614.

Frame S, Cohen P, Biondi RM. A common phosphate binding site explains the unique substrate specificity of GSK3 and its inactivation by phosphorylation. *Mol Cell* 2001;**7**:1321-1327.

Fujii JT, Martin GR. Incorporation of teratocarcinoma stem cells into blastocysts by aggregation with cleavage-stage embryos. *Dev Biol* 1980;**74**:239-244.

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

G

Gadue P, Huber TL, Paddison PJ, Keller GM. Wnt and TGF-beta signaling are

required for the induction of an in vitro model of primitive streak formation using embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;**103**:16806–16811.

Galán A, Montaner D, Póo ME, Valbuena D, Ruiz V, Aguilar C, Dopazo J, Simón C. Functional genomics of 5- to 8-cell stage human embryos by blastomere single-cell cDNA analysis. *PLoS One* 2010;**5**:

Gao S, McGarry M, Priddle H, Ferrier T, Gasparrini B, Fletcher J, Harkness L, Sousa P De, McWhir J, Wilmut I. Effects of donor oocytes and culture conditions on development of cloned mice embryos. *Mol Reprod Dev* 2003;**66**:126–133.

Gonzalez JM, Morgani SM, Bone RA, Bonderup K, Abelchian S, Brakebusch C, Brickman JM. Embryonic stem cell culture conditions support distinct states associated with different developmental stages and potency. *Stem Cell Reports* 2016;**7**:177–191. The Authors.

González S, Ibáñez E, Santaló J. Establishment of mouse embryonic stem cells from isolated blastomeres and whole embryos using three derivation methods. *J Assist Reprod Genet* 2010;**27**:671–682.

González S, Ibáñez E, Santaló J. Influence of E-Cadherin-mediated cell adhesion on mouse embryonic stem cells derivation from isolated blastomeres. *Stem Cell Rev Reports* 2011;**7**:494–505.

Greber B, Wu G, Bernemann C, Joo JY, Han DW, Ko K, Tapia N, Sabour D, Sternecker J, Tesar P, *et al.* Conserved and Divergent Roles of FGF Signaling in Mouse Epiblast Stem Cells and Human Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell* 2010;**6**:215–226.

Guo W, Hao B, Wang Q, Lu Y, Yue J. Requirement of B-Raf, C-Raf, and A-Raf for the growth and survival of mouse embryonic stem cells. *Exp Cell Res* [Internet] 2013;**319**:2801–2811. Elsevier.

Guo X, Wang X-F. Signaling cross-talk between TGF-beta/BMP and other pathways. *Cell Res* [Internet] 2009;**19**:71–88.

H

Hackett JA, Dietmann S, Murakami K, Down TA, Leitch HG, Surani MA. Stem Cell Reports. *Stem Cell Reports* [Internet] 2013;**1**:518–531. The Authors.

Hackett JA, Surani MA. Regulatory principles of pluripotency: From the ground state up. *Cell Stem Cell* [Internet] 2014;**15**:416–430. Elsevier Inc.

Hagiwara–Chatani N, Shirai K, Kido T, Horigome T, Yasue A, Adachi N, Hirai Y. Membrane translocation of t–SNARE protein syntaxin–4 abrogates ground–state pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Sci Rep* [Internet] 2017;**7**:39868. Nature Publishing Group.

Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RML. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y–specific DNA amplification. *Nature* 1990;**344**:768–770.

Hardy K, Martin K., Leese H., Winston RM., Handyside A. Human preimplantation development in vitro is not adversely affected by biopsy at 8–cell stage. *Hum Reprod* 1990;**5**:708–714.

Hassani S–N, Pakzad M, Asgari B, Taei A, Baharvand H. Suppression of transforming growth factor β signaling promotes ground state pluripotency from single blastomeres. *Hum Reprod* 2014a;**29**:1739–1748.

Hassani S–N, Totonchi M, Gourabi H, Schöler HR, Baharvand H. Signaling roadmap modulating naive and primed pluripotency. *Stem Cells Dev* [Internet] 2014b;**23**:193–208.

Hassani SN, Totonchi M, Farrokhi A, Taei A, Larijani MR, Gourabi H, Baharvand H. Simultaneous suppression of TGF– β and ERK signaling contributes to the highly efficient and reproducible generation of mouse embryonic stem cells from previously considered refractory and non–permissive strains. *Stem Cell Rev Reports* 2012;**8**:472–481.

Hassani SN, Totonchi M, Sharifi–Zarchi A, Mollamohammadi S, Pakzad M, Moradi S, Samadian A, Masoudi N, Mirshahvaladi S, Farrokhi A, *et al.* Inhibition of TGF β Signaling Promotes Ground State Pluripotency. *Stem Cell Rev Reports* 2014c;**10**:16–30.

Hawkins K, Mohamet L, Ritson S, Merry CLR, Ward CM. E-cadherin and, in its absence, N-cadherin promotes nanog expression in mouse embryonic stem cells via STAT3 Phosphorylation. *Stem Cells* 2012;**30**:1842–1851.

Hayashi K, Lopes SMC de S, Tang F, Surani MA. Dynamic Equilibrium and Heterogeneity of Mouse Pluripotent Stem Cells with Distinct Functional and Epigenetic States. *Cell Stem Cell* 2008;**3**:391–401.

Hayashi K, Surani MA. Self-renewing epiblast stem cells exhibit continual delimitation of germ cells with epigenetic reprogramming in vitro. *Development* [Internet] 2009;**136**:3549–3556.

Ho SY, Goh CWP, Gan JY, Lee YS, Lam MKK, Hong N, Hong Y, Chan WK, Shu-Chien AC. Derivation and long-term culture of an embryonic stem cell-like line from zebrafish blastomeres under feeder-free condition. *Zebrafish* [Internet] 2014;**11**:407–420.

Hong H, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Nakagawa M, Okita K, Yamanaka S. Suppression of Induced Pluripotent Stem Cell Generation by the p53–p21 Pathway. *Nature* 2009;**460**:1132–1135.

Huang S–M a, Mishina YM, Liu S, Cheung A, Stegmeier F, Michaud G a, Charlat O, Wiellette E, Zhang Y, Wiessner S, *et al.* Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling. *Nature* [Internet] 2009;**461**:614–620. Nature Publishing Group.

Inman GJ, As FJN, Callahan JF, Harling JD, Gaster LM, Reith AD, Laping NJ, Hill CS. SB-431542 Is a Potent and Specific Inhibitor of Transforming Growth Factor– β Superfamily Type I Activin Receptor–Like Kinase (ALK) Receptors ALK4, ALK5 and ALK7. 2002;**62**:65–74.

Ivanova N, Dobrin R, Lu R, Kotenko I, Levorse J, DeCoste C, Schafer X, Lun Y, Lemischka IR. Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference. *Nature* [Internet] 2006;**442**:533–538.

J

Jackson SA, Schiesser J, Stanley EG, Elefanty AG. Differentiating embryonic stem cells pass through “temporal windows” that mark responsiveness to exogenous and paracrine mesendoderm inducing signals. *PLoS One* 2010;**5**:.

Joo JY, Choi HW, Kim MJ, Zaehres H, Tapia N, Stehling M, Jung KS, Tae J, Schöler HR. Establishment of a primed pluripotent epiblast stem cell in FGF4-based conditions. *Sci Rep* [Internet] 2014;**4**:7477.

K

Kam Y, Quaranta V. Cadherin-bound b-catenin feeds into the Wnt pathway upon adherens junctions dissociation: Evidence for an intersection between ??-catenin pools. *PLoS One* 2009;**4**:.

Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Lee J, Yoshimoto M, Ogonuki N, Miki H, Baba S, Kato T, Kazuki Y, Toyokuni S, *et al.* Generation of Pluripotent Stem Cells from Neonatal Mouse Testis. 2004;**119**:1001–1012.

Kawamura T, Suzuki J, Wang Y V, Menendez S, Morera LB, Raya A, Wahl GM, Izpisua Belmonte JC. Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming. *Nature* [Internet] 2009;**460**:1140–1144.

Kawase E, Suemori H, Takahashi N, Okazaki K, Hashimoto K, Nakatsuji N. Strain difference in establishment of mouse embryonic stem (ES) cell lines. *Int J Dev Biol* 1994;**38**:385–390.

Keohane AM, O’neill LP, Belyaev ND, Lavender JS, Turner BM. X-Inactivation and histone H4 acetylation in embryonic stem cells. *Dev Biol* [Internet] 1996;**180**:618–630.

Kim D, Kim C, Moon J, Chung Y, Chang M, Han B, Ko S, Yang E, Cha KY, Lanza R, *et al.* Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell* 2009;**4**:472–476.

- Kim H, Wu J, Ye S, Tai CI, Zhou X, Yan H, Li P, Pera M, Ying QL. Modulation of beta-catenin function maintains mouse epiblast stem cell and human embryonic stem cell self-renewal. *Nat Commun* [Internet] 2013;**4**:2403. Nature Publishing Group.
- Kim MO, Kim S-H, Cho Y-Y, Nadas J, Jeong C-H, Yao K, Kim DJ, Yu D-H, Keum Y-S, Lee K-Y, *et al.* ERK1 and ERK2 regulate embryonic stem cell self-renewal through phosphorylation of Klf4. *Nat Struct Mol Biol* [Internet] 2012;**19**:283-290.
- Kim SH, Kim MO, Cho YY, Yao K, Kim DJ, Jeong CH, Yu DH, Bae KB, Cho EJ, Jung SK, *et al.* ERK1 phosphorylates Nanog to regulate protein stability and stem cell self-renewal. *Stem Cell Res* [Internet] 2014;**13**:1-11. The Authors.
- Kleinsmith LJ, Pierce BGJ. Multipotentiality of single embryonal carcinoma cells. *Cancer Res* 1964;**24**:1544-1551.
- Klimanskaya I, Chung Y, Becker S, Lu SJ, Lanza R. Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres. *Nature* 2006;**444**:481-485.
- Kunath T, Saba-El-Leil MK, Almousailleakh M, Wray J, Meloche S, Smith A. FGF stimulation of the Erk1/2 signalling cascade triggers transition of pluripotent embryonic stem cells from self-renewal to lineage commitment. *Development* [Internet] 2007;**134**:2895-2902.
- L**
- Lancaster M a., Knoblich J a. Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies. *Science* [Internet] 2014;**345**:1247125.
- Lee H-J, Zhang X, Zheng JJ. Inhibiting the wnt signaling pathway with small molecules. *Target Wnt Pathw Cancer* 2011;**0**:183-209.
- Lee K-H. Conditions and techniques for mouse embryonic stem cell derivation and culture. In Bhartiya D, editor. *Pluripotent Stem Cells* 2013;, p. 85-115. InTech.
- Lee K-H, Chuang C-K, Guo S-F, Tu C-F. Simple and efficient derivation of mouse embryonic stem cell lines using differentiation inhibitors or proliferation

stimulators. *Stem Cells Dev* 2012;**21**:373–383.

Leitch HG, McEwen KR, Turp A, Encheva V, Carroll T, Grabole N, Mansfield W, Nashun B, Knezovich JG, Smith A, *et al.* Naive pluripotency is associated with global DNA hypomethylation. *Nat Struct Mol Biol* [Internet] 2013;**20**:311–316. Nature Publishing Group.

Li P, Tong C, Mehrian-shai R, Jia L, Wu N, Yan Y, Maxson E, Schulze EN, Song H, Hsieh C, *et al.* Germline competent embryonic stem cells derived from rat blastocysts. *Cell* 2008;**135**:1299–1310.

Lindsley RC, Gill JG, Kyba M, Murphy TL, Murphy KM. Canonical Wnt signaling is required for development of embryonic stem cell-derived mesoderm. *Development* 2006;**133**:3787–3796.

Lorthongpanich C, Yang S-H, Piotrowska-Nitsche K, Parnpai R, Chan AWS. Chemical enhancement in embryo development and stem cell derivation from single blastomeres. *Cloning Stem Cells* 2008a;**10**:503–512.

Lorthongpanich C, Yang SH, Piotrowska-Nitsche K, Parnpai R, Chan AWS. Development of single mouse blastomeres into blastocysts, outgrowths and the establishment of embryonic stem cells. *Reproduction* 2008b;**135**:805–813.

Lu C-W, Yabuuchi A, Chen L, Viswanathan S, Kim K, Daley GQ. Ras-MAPK signaling promotes trophoblast formation from embryonic stem cells and mouse embryos. *Nat Genet* 2008;**40**:921–926.

M

Ma X, Chen H, Chen L. A dual role of Erk signaling in embryonic stem cells. *Exp Hematol* [Internet] 2016;**44**:151–156. ISEH – International Society for Experimental Hematology.

Ma Y, Gu J, Li C, Wei X, Tang F, Shi G, Jiang J, Kuang Y, Li J, Wang Z, *et al.* Human foreskin fibroblast produces interleukin-6 to support derivation and self-renewal of mouse embryonic stem cells. *Stem Cell Res Ther* 2012;**3**:.

Mak W, Nesterova TB, Napoles M de, Appanah R, Yamanaka S, Otte AP, Brockdorff

- N. Reactivation of the Paternal X Chromosome in Early Mouse Embryos. *Science* (80-) 2004;**303**:666–669.
- Malaguti M, Nistor PA, Blin G, Pegg A, Zhou X, Lowell S. Bone morphogenic protein signalling suppresses differentiation of pluripotent cells by maintaining expression of E-Cadherin. *Elife* 2013;**2013**:1–20.
- Mallol A, Santaló J, Ibáñez E. Improved development of somatic cell cloned mouse embryos by vitamin C and latrunculin A. *PLoS One* 2015;**10**:
- Martello G, Bertone P, Smith A. Identification of the missing pluripotency mediator downstream of leukaemia inhibitory factor. *EMBO J*[Internet] 2013;**32**:2561–2574. Nature Publishing Group.
- Martello G, Smith A. The nature of embryonic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* [Internet] 2014;**30**:647–675.
- Martello G, Sugimoto T, Diamanti E, Joshi A, Hannah R. Article Esrrb Is a Pivotal Target of the Gsk3 / Tcf3 Axis Regulating Embryonic Stem Cell Self-Renewal. *Cell Stem Cell* 2012;**11**:491–504.
- Martin GR. Teratocarcinomas and mammalian embryogenesis. *Science* 1980;**209**:768–776.
- Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *PNAS* 1981;**78**:7634–7638.
- Martin GR, Evans MJ. Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: formation of embryoid bodies in vitro. *PNAS* 1976;**72**:1441–1445.
- Masuda T, Ishitani T. Context-dependent regulation of the β -catenin transcriptional complex supports diverse functions of Wnt/ β -catenin signaling. *J Biochem* [Internet] 2016;**161**:mvw072.
- Masui S, Nakatake Y, Toyooka Y, Shimosato D, Yagi R, Takahashi K, Okochi H, Okuda A, Matoba R, Sharov AA, *et al*. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol* 2007;**9**:625–U26.
- Mateizel I, Temmerman N De, Ullmann U, Cauffman G, Sermon K, Velde H Van de,

- Rycke M De, Degreef E, Devroey P, Liebaers I, *et al.* Derivation of human embryonic stem cell lines from embryos obtained after IVF and after PGD for monogenic disorders. *Hum Reprod* 2006;**21**:503–511.
- Matsuda T, Nakamura T, Nakao K, Arai T, Katsuki M, Heike T, Yokota T. STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *Embo J* 1999;**18**:4261–4269.
- Matsui Y, Zsebo K, Hogan BLM. Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell* 1992;**70**:841–847.
- McCloy RA, Rogers S, Caldon CE, Lorca T, Castro A, Burgess A. Partial inhibition of Cdk1 in G2 phase overrides the SAC and decouples mitotic events. *Cell Cycle* 2014;**13**:1400–1412.
- Meyenn F Von, Iurlaro M, Habibi E, He C, Reik W, Stunnenberg HG. Impairment of DNA Methylation Maintenance Is the Main Cause of Global Demethylation in Naive Embryonic Stem Cells Article Impairment of DNA Methylation Maintenance Is the Main Cause of Global Demethylation in Naive Embryonic Stem Cells. 2016;1–14.
- Molina JR, Adjei AA. The Ras/Raf/MAPK Pathway. *J Thorac Oncol* [Internet] 2006;**1**:7. International Association for the Study of Lung Cancer.
- ## N
- Nagaoka M, Koshimizu U, Yuasa S, Hattori F, Chen H, Tanaka T, Okabe M, Fukuda K, Akaike T. E-cadherin-coated plates maintain pluripotent ES cells without colony formation. *PLoS One* 2006;**1**:1–7.
- Nagy A, Vintersten K, Behringer R. *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, 3rd ed.* Cold Spring Harb Lab Press 2003; New York.
- Nichols J, Evans EP, Smith A G. Establishment of germ-line-competent embryonic stem (ES) cells using differentiation inhibiting activity. *Development* 1990;**110**:1341–1348.
- Nichols J, Smith A. Naive and Primed Pluripotent States. *Cell Stem Cell* [Internet] 2009;**4**:487–492. Elsevier Inc.

Nichols J, Smith A. Pluripotency in the Embryo and in Culture. *Cold Spring Harb Perspectives Biol* 2012;**4**:1–15.

Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe–Nebenius D, Chambers I, Scholer H, Smith A. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 1998;**95**:379–391.

Niwa H, Ogawa K, Shimosato D, Adachi K. A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. *Nature* [Internet] 2009;**460**:118–122. Nature Publishing Group.

O

Ogawa K, Matsui H, Ohtsuka S, Niwa H. A novel mechanism for regulating clonal propagation of mouse ES cells. *Genes to Cells* 2004;**9**:471–477.

Ogawa K, Nishinakamura R, Iwamatsu Y, Shimosato D, Niwa H. Synergistic action of Wnt and LIF in maintaining pluripotency of mouse ES cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006a;**343**:159–166.

Ogawa K, Saito A, Matsui H, Suzuki H, Ohtsuka S, Shimosato D, Morishita Y, Watabe T, Niwa H, Miyazono K. Activin–Nodal signaling is involved in propagation of mouse embryonic stem cells. *J Cell Sci* 2006b;55–65.

Ohtsuka S, Nakai–Futatsugi Y, Niwa H. LIF signal in mouse embryonic stem cells. *Jak–Stat* [Internet] 2015;**4**:e1086520.

Ohtsuka S, Niwa H. The differential activation of intracellular signaling pathways confers the permissiveness of embryonic stem cell derivation from different mouse strains. *Development* 2015;**142**:431–437.

Okamoto I, Otte AP, Allis CD, Reinberg D, Heard E. Epigenetic Dynamics of Imprinted X Inactivation During Early Mouse Development. *Science* (80–) 2004;**303**:644–650.

Oosten AL van, Costa Y, Smith A, Silva JCR. JAK/STAT3 signalling is sufficient and dominant over antagonistic cues for the establishment of naive pluripotency. *Nat Commun* [Internet] 2012;**3**:817.

Ozawa M, Baribault H, Kemler R. The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *EMBO J* [Internet] 1989;**8**:1711-1717.

P

Papayioannou VE, McBurney MW, Gardner RL, Evans MJ. Fate of teratocarcinoma cells injected into early mouse embryos. *Nature* 1975;**258**:70-73.

Park I-H, Arora N, Huo H, Maherali N, Ahfeldt T, Shimamura A, Lensch MW, Cowan C, Hochedlinger K, Daley GQ. Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell* [Internet] 2008;**134**:877.

Park JK, Kim HS, Uh KJ, Choi KH, Kim HM, Lee T, Yang BC, Kim HJ, Ka HH, Kim H, *et al.* Primed Pluripotent Cell Lines Derived from Various Embryonic Origins and Somatic Cells in Pig. *PLoS One* 2013;**8**.

Park Y-G, Lee S-E, Kim E-Y, Hyun H, Shin M-Y, Son Y-J, Kim S-Y, Park S-P. Effects of Feeder Cell Types on Culture of Mouse Embryonic Stem Cell In Vitro. *Dev Reprod* [Internet] 2015;**19**:119-126.

Pereira L, Yi F, Merrill BJ. Repression of Nanog gene transcription by Tcf3 limits embryonic stem cell self-renewal. *Mol Cell Biol* 2006;**26**:7479-7491.

Piatti P, Lim CY, Nat R, Villunger A, Geley S, Shue YT, Soratroi C, Moser M, Lusser A. Embryonic stem cell differentiation requires full length Chd1. *Sci Rep* [Internet] 2015;**5**:8007.

Piedra J, Miravet S, Castaño J, Héctor G, Heisterkamp N, Herreros AG De, Castan J, Dun M. p120 Catenin-Associated Fer and Fyn Tyrosine Kinases Regulate β -Catenin Tyr-142 Phosphorylation and β -Catenin- α -Catenin Interaction p120 Catenin-Associated Fer and Fyn Tyrosine Kinases Regulate β -Catenin Tyr-142 Phosphorylation and β -Catenin- α -Ca. *Mol Cell Biol* 2003;**23**:2287-2297.

Ptak GE, Modlinski J a, Loi P. Embryonic diapause in humans: time to consider? *Reprod Biol Endocrinol* [Internet] 2013;**11**:92.

R

Redmer T, Diecke S, Grigoryan T, Quiroga-Negreira A, Birchmeier W, Besser D. E-cadherin is crucial for embryonic stem cell pluripotency and can replace OCT4 during somatic cell reprogramming. *EMBO Rep* [Internet] 2011;**12**:720–726. Nature Publishing Group.

Resnick JL, Bixler LS, Cheng L, Donovan PJ. Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature* 1992;**359**:550–551.

Rossant J. Postimplantation development of blastomeres isolated from 4- and 8-cell mouse eggs. *J Embryol Exp Morphol* [Internet] 1976;**36**:283–290.

Rossant J, Tam PPL. Blastocyst lineage formation, early embryonic asymmetries and axis patterning in the mouse. *Development* [Internet] 2009;**136**:701–713.

S

Saj A, Chatterjee SS, Zhu B, Cukuroglu E, Gocha T, Zhang X, Göke J, DasGupta R. Disrupting interactions between b-catenin and activating TCFs reconstitutes ground state pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Stem Cells* 2017;

Schöler HR, Ruppert S, Suzuki N, Chowdhury K, Gruss P. New type of POU domain in germ line-specific protein Oct4. *Nature* 1990;**344**:435–439.

Schoonjans L, Kreemers V, Danloy S, Rw. Improved generation of germline-competent embryonic stem cell lines from inbred mouse strains. *Stem Cells* [Internet] 2003;**21**:90–97.

Shablott MJ, Axelman J, Wang S, Bugg E., Littlefield J., Donovan P., Bluementhal P., Huggins G., Gearhart J. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci* 1998;**95**:13726–13731.

Si-tayeb K, Noto FK, Sepac A, Sedlic F, Bosnjak ZJ, Lough JW, Duncan SA. Generation of human induced pluripotent stem cells by simple transient

- transfection of plasmid DNA encoding reprogramming factors. *Dev Biol* 2010;**81**:
- Silva J, Barrandon O, Nichols J, Kawaguchi J, Theunissen TW, Smith A. Promotion of reprogramming to ground state pluripotency by signal inhibition. *PLoS Biol* 2008;**6**:2237–2247.
- Silva J, Nichols J, Theunissen TW, Guo G, Oosten AL van, Barrandon O, Wray J, Yamanaka S, Chambers I, Smith A. Nanog Is the Gateway to the Pluripotent Ground State. *Cell* [Internet] 2009;**138**:722–737. Elsevier Ltd.
- Silva J, Smith A. Capturing Pluripotency. *Cell* 2008;**132**:532–536.
- Sim Y-J, Kim M-S, Nayfeh A, Yun Y-J, Kim S-J, Park K-T, Kim C-H, Kim K-S. *Zi* Maintains a Naive Ground State in ESCs through Two Distinct Epigenetic Mechanisms. *Stem Cell Reports* [Internet] 2017;**8**:1–17. Elsevier Company.
- Sineva GS, Pospelov V a. Inhibition of GSK3beta enhances both adhesive and signalling activities of beta-catenin in mouse embryonic stem cells. *Biol Cell* 2010;**102**:549–560.
- Smith AG. Culture and Differentiation of Embryonic Stem Cells. *J tissue Cult methods* 1991;**13**:89–94.
- Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, Wong GG, Moreau J, Stahl M, Rogers D. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 1988;**336**:688–690.
- Smith AG, Hooper ML. Buffalo rat liver cells produce a diffusible activity which inhibits the differentiation of murine embryonal carcinoma and embryonic stem cells. *Dev Biol* 1987;**121**:1–9.
- Stamos JL, Weis WI. The b-catenin destruction complex. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013;**5**:1–16.
- Stavridis MP, Lunn JS, Collins BJ, Storey KG. A discrete period of FGF-induced Erk1/2 signalling is required for vertebrate neural specification. *Development* 2007;**134**:2889–2894.
- Steinberg MS, McNutt PM. Cadherins and their connections: Adhesion junctions have broader functions. *Curr Opin Cell Biol* 1999;**11**:554–560.

- Stevens LC. The development of transplantable teratocarcinomas from intratesticular grafts of pre- and postimplantation mouse embryos. *Dev Biol* 1970;**21**:364–382.
- Storm MP, Bone HK, Beck CG, Bourillot PY, Schreiber V, Damiano T, Nelson A, Savatier P, Welham MJ. Regulation of nanog expression by phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling in murine embryonic stem cells. *J Biol Chem* 2007;**282**:6265–6273.
- Storm MP, Kumpfmüller B, Bone HK, Buchholz M, Sanchez Ripoll Y, Chaudhuri JB, Niwa H, Tosh D, Welham MJ. Zscan4 is regulated by PI3-kinase and DNA-damaging agents and directly interacts with the transcriptional repressors LSD1 and CtBP2 in mouse embryonic stem cells. *PLoS One* 2014;**9**:
- Storm MP, Kumpfmüller B, Thompson B, Kolde R, Vilo J, Hummel O, Schulz H, Welham MJ. Characterization of the phosphoinositide 3-kinase-dependent transcriptome in murine embryonic stem cells: Identification of novel regulators of pluripotency. *Stem Cells* 2009;**27**:764–775.
- Suemori H, Tada T, Torii R, Hosoi Y, Kobayashi K, Imahie H, Kondo Y, Iritani A, Nakatsuji N. Establishment of embryonic stem cell lines from cynomolgus monkey blastocysts produced by IVF or ICSI. *Dev Dyn* 2001;**222**:273–279.
- Sugimoto M, Kondo M, Koga Y, Shiura H, Ikeda R, Hirose M, Ogura A, Murakami A, Yoshiki A, Sousa Lopes SMC De, *et al.* A simple and robust method for establishing homogeneous mouse epiblast stem cell lines by Wnt inhibition. *Stem Cell Reports* [Internet] 2015;**4**:744–757. The Authors.

T

- Taei A, Hassani SN, Eftekhari-Yazdi P, Rezazadeh Valojerdi M, Nokhbatolfoghahai M, Masoudi NS, Pakzad M, Gourabi H, Baharvand H. Enhanced generation of human embryonic stem cells from single blastomeres of fair and poor-quality cleavage embryos via inhibition of glycogen synthase kinase b and Rho-associated kinase signaling. *Hum Reprod* 2013;**28**:2661–2671.
- Tai C-I, Schulze EN, Ying Q-L. Stat3 signaling regulates embryonic stem cell fate in a dose-dependent manner. *Biol Open* [Internet] 2014;**3**:958–965.

- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* 2007;**131**:861–872.
- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. 2006;**2**:663–676.
- Takahashi K, Yamanaka S. A decade of transcription factor-mediated reprogramming to pluripotency. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet] 2016;**17**:183–193. Nature Publishing Group.
- Tam W-L, Lim CY, Han J, Zhang J, Ang Y-S, Ng H-H, Yang H, Lim B. T-cell factor 3 regulates embryonic stem cell pluripotency and self-renewal by the transcriptional control of multiple lineage pathways. *Stem Cells* [Internet] 2008;**26**:2019–2031.
- Tamm C, Galitó SP, Annerén C. A comparative study of protocols for mouse embryonic stem cell culturing. *PLoS One* 2013;**8**:
- Tanaka S, Kunath T, Hadjantonakis AK, Nagy A, Rossant J. Promotion of trophoblast stem cell proliferation by FGF4. *Science* 1998;**282**:2072–2075.
- Tang Z, Dai S, He Y, Doty RA, Shultz LD, Sampson SB, Dai C. MEK guards proteome stability and inhibits tumor-suppressive amyloidogenesis via HSF1. *Cell* [Internet] 2015;**160**:729–744. Elsevier Inc.
- Tarkowski AK, Wróblewska J. Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4- and 8-cell stage. *J Embryol Exp Morphol* 1967;**18**:155–180.
- Tee WW, Shen SS, Oksuz O, Narendra V, Reinberg D. Erk1/2 activity promotes chromatin features and RNAPII phosphorylation at developmental promoters in mouse ESCs. *Cell* [Internet] 2014;**156**:678–690. Elsevier Inc.
- Telford NA, Watson AJ, Schultz GA. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Mol Reprod Dev* 1990;**26**:90–100.
- Tesar P., Chenoweth J., Brook F., Timothy J., Evans E., Mack D., Gardner R., McKay RD. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* 2007;**448**:196–199.

Tesar PJ. Derivation of germ-line-competent embryonic stem cell lines from preblastocyst mouse embryos. *PNAS* 2005;**102**:8239-8244.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;**282**:1145-1147.

Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, Durning M, Harris CP, Becker RA, Hearn JP. Isolation of a primate embryonic stem cell line. *PNAS* [Internet] 1995;**92**:7844-7848.

Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, Durning M, Harris CP, Hearn JP. Pluripotent cell lines derived from common marmoset (*Callithrix jacchus*) blastocysts. *Biol Reprod* 1996;**55**:254-259.

Trounson A, DeWitt ND. Pluripotent stem cells progressing to the clinic. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet] 2016;**17**:194-200. Nature Publishing Group.

W

Wakayama S, Hikichi T, Suetsugu R, Sakaide Y, Bui H-T, Mizutani E, Wakayama T. Efficient establishment of mouse embryonic stem cell lines from single blastomeres and polar bodies. *Stem Cells* 2007;**25**:986-993.

Wakayama T, Perry ACF, Zuccotti M, Johnson KR, Yanagimachi R. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 1998;**394**:369-374.

Wakayama T, Tabar V, Rodriguez I, Perry ACF, Studer L, Mombaerts P. Differentiation of embryonic stem cell lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer. *Science (80-)* 2001;**292**:740-743.

Ward CM, Stern P, Willington M a, Flenniken AM. Efficient germline transmission of mouse embryonic stem cells grown in synthetic serum in the absence of a fibroblast feeder layer. *Lab Investig* [Internet] 2002;**82**:1765-1767.

Ware CB, Nelson AM, Mecham B, Hesson J, Zhou W, Jonlin EC, Jimenez-Caliani AJ, Deng X, Cavanaugh C, Cook S, *et al.* Derivation of naive human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet] 2014;**111**:4484-4489.

- Weinberger L, Ayyash M, Novershtern N, Hanna JH. Dynamic stem cell states: naive to primed pluripotency in rodents and humans. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2016;**17**:155–169. Nature Publishing Group.
- Wetering M Van de, Cavallo R, Dooijes D, Beest M Van, Es J Van, Loureiro J, Ypma A, Hursh D, Jones T, Bejsovec A, *et al.* Armadillo coactivates transcription driven by the product of the *Drosophila* segment polarity gene dTCF. *Cell* 1997;**88**:789–799.
- Williams RL, Hilton DJ, Pease S, Willson TA, Stewart CL, Gearing DP, Wagner EF, Metcalf D, Nicola NA, Gough NM. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 1988;**336**:684–687.
- Wilmut I, Schnieke A., McWhie J, Kind A., Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997;**385**:810–813.
- Wray J, Kalkan T, Gomez–Lopez S, Eckardt D, Cook A, Kemler R, Smith A. Inhibition of glycogen synthase kinase–3 alleviates Tcf3 repression of the pluripotency network and increases embryonic stem cell resistance to differentiation. *Nat Cell Biol* [Internet] 2011;**13**:838–845. Nature Publishing Group.
- Wray J, Kalkan T, Smith AG. Revolutionizing Drug Discovery with Stem Cell Technology The ground state of pluripotency. 2010;1027–1032.
- Wu Y, Liu F, Liu Y, Liu X, Ai Z, Guo Z, Zhang Y. GSK3 inhibitors CHIR99021 and 6–bromindirubin–3’–oxime inhibit microRNA maturation in mouse embryonic stem cells. *Sci Rep* [Internet] 2015;**5**:8666.

Y

- Yakubov E, Rechavi G, Rozenblatt S, Givol D. Reprogramming of human fibroblasts to pluripotent stem cells using mRNA of four transcription factors. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet] 2010;**394**:189–193. Elsevier Inc.
- Yang J, Cai J, Zhang Y, Wang X, Li W, Xu J, Li F, Guo X, Deng K, Zhong M, *et al.* Induced pluripotent stem cells can be used to model the genomic imprinting disorder Prader–Willi syndrome. *J Biol Chem* 2010;**285**:40303–40311.

- Ye S, Liu D, Ying Q-L. Signalling pathways in induced naïve pluripotency. *Curr Opin Genet Dev* 2014;**0**:10-15.
- Yeo JC, Jiang J, Tan ZY, Yim GR, Ng JH, Göke J, Kraus P, Liang H, Gonzales KAU, Chong HC, *et al.* Klf2 is an essential factor that sustains ground state pluripotency. *Cell Stem Cell* 2014;**14**:864-872.
- Yi F, Pereira L, Merrill BJ. Tcf3 functions as a steady state limiter of transcriptional programs of mouse embryonic stem cell self renewal. *Stem Cells* 2008;**26**:1951-1960.
- Ying Q-L, Stavridis M, Griffiths D, Li M, Smith A. Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. *Nat Biotechnol* [Internet] 2003a;**21**:183-186.
- Ying Q-L, Wray J, Nichols J, Batlle-Morera L, Doble B, Woodgett J, Cohen P, Smith A. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* 2008;**453**:519-523.
- Ying QL, Nichols J, Chambers I, Smith A. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell* 2003b;**115**:281-292.
- Ying QL, Smith AG. Defined conditions for neural commitment and differentiation. *Methods Enzymol* 2003;**365**:327-341.
- Young E, Black A. J. Adult stem cells. *Anat Rec* 2004;**276A**:75-102.
- Yu JSL, Cui W. Proliferation, survival and metabolism: the role of PI3K/AKT/mTOR signalling in pluripotency and cell fate determination. *Development* [Internet] 2016;**143**:3050-3060.

Z

- Zhang H, Gayen S, Xiong J, Zhou B, Shanmugam AK, Karatas H, Liu L, Rao RC, Wang S, Nesvizhskii AI, *et al.* MLL1 inhibition reprograms epiblast stem cells to naïve pluripotency. *Cell Stem Cell* 2016;**18**:481-494.
- Zhao Y, Adjei A a. The clinical development of MEK inhibitors. *Nat Publ Gr*

[Internet] 2014;**11**:385–400. Nature Publishing Group.

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

AGRAÏMENTS

Primer de tot volia agrair al Josep i l'Elena l'oportunitat que m'heu donat de realitzar la tesi al grup, no tothom pot dir que ha sigut un *embryo lover!* M'ho he passat molt bé aquests quatre anys al vostre costat i des del principi he estat molt còmoda treballant amb vosaltres. Us vull agrair la paciència infinita que heu tingut amb mi, els bons consells que m'heu anat donant, el bon humor a les reunions, el rigor i l'ordre de l'Elena (que em penso que no oblidaré mai de la vida), les vostres correccions del meu anglès catalanitzat i haver aguantat una doctorand massa tossuda.

També volia agrair al Leo i la Carme el suport, les converses al passadís i algun consell en un moment desesperat. Gràcies Carme per acceptar llegir i discutir la tesi. A la Laura li vull agrair tots els *mano a mano* que hem fet durant les vacances! I a la Nerea que m'has ajudat a fer les primeres immunos, que m'has donat consells, m'has explicat trucs de les *stems* i has acceptat llegir el resultat, moltes gràcies! A la Fanny, la Zaida, l'Esther, al Joan, l'Anna, la Montse, la Marta i la Mariona us agraeixo totes les converses que hem tingut al menjador que han fet les pauses més amenes.

Vull agrair a la Sílvia i la Maria Jesús l'alegria i la simpatia que despreneu. Sílvia, moltes gràcies per fer la paperassa més fàcil! Gràcies David pel suport i sobretot, sobretot moltes gràcies Jonatan! Has estat el meu company de tesi. Crec que amb ningú més he compartit tantes hores al laboratori. Gràcies per totes les converses que hem tingut, per compartir totes les xafarderies del món, pels consells zen i per la infinitat de plaques de *feeders* que m'has preparat. La base d'aquesta tesi és tota teva!

A les meves estimades companyes de despatx: Anna moltes gràcies per ser el nostre referent! Per l'ordre, pel rigor, per l'humor i per veure sempre el millor de cada persona. Encara que haguem coincidit poc ja veus que tinc molt a agrair-te! També et vull agrair que hagis accedit a llegir-te el meu "totxet", a mi m'ha fet molta il·lusió que ho fessis. Laie, tinc una llista tant llarga! Primer de tot gràcies per aguantar-me les neures i les manies. Crec que amb ningú he passat tant ràpid de riure a plorar. No oblidaré mai la galleda de matar, la lentilla perduda, la llibreta de frases cèlebres, el *breaking bad*, el teu caminar i la e al final de tots els noms!

Ha estat un plaer treballar amb tu i ballar la “Shaki” al lab mentre fèiem necròpsies. Mireia, o més ven dit, “pudride” gràcies per entendre’m només amb una mirada. Ja trobo a faltar això d’aixecar el cap i ja saber què ens volem dir. Ha estat un plaer tenir un mirall! Gràcies per tots els cafès, per les nostres converses sense filtres i per ensenyar-me a ser súper treballadora.

Family Biocel, què puc dir de tots vosaltres? Crec que encara no sóc conscient del bon ambient que hi ha aquí i lo bé que s’hi treballa! Laia V, moltes gràcies per fer-me costat com a ambaixadora Sabadellenca. Gràcies per totes les experiències que hem compartit dins i fora del lab, per insistir en que ens apuntéssim a swing i sobretot per ser pura bondat. Joan, gràcies per la teva alegria, pels duets de Mar i Cel, pels consells informàtics i per animar-te a ser el *leader* que fa els millors *long steps* del món! Celia, muchas gracias por tu humor y tu buen rollo, espero leer frases de “La Autora” durante mucho tiempo! Andreu i Aina, no us puc separar. Gràcies per tutoritzar-me una segona tesi en cultura Mallorquina. Qui m’havia de dir quan vaig entrar que acabaria tenint un diccionari de paraules mallorquines, que hauria fet classes de ball de bot i que xerrarria com es mallorquins de potada? Moltes gracias de bon de veres! Sou una monada! Andreu, gràcies per totes les discussions político-científiques que hem tingut, i per apassionar-te amb totes les idees esbojarrades. Div, gràcies per tantíssim! Per ser la nostra guia glamourosa, per ser amiga de tots i per ser una caixa de sorpreses (CUP)! A les “aquaries”: Mireia S, m’ha encantat compartir el dinar amb tu! Totes les xerrades, les recomanacions musicals, les històries de Menorca i sobretot gràcies per la tranquil·litat que transmetes i per saber escoltar tant i donar bons consells! Teresa, amb qui ens barallarem per l’SPOT a partir d’ara? Tret d’això, m’ho he passat molt bé fent berenars de xafarderies al vostre despatx. Lourdes, gracias por ser tan buena Catalana de adopción y compartir tu selección musical! Toni, ocre de dia i fúcsia de nit, al meu cap sempre tindràs aquests colors! Gràcies per ser tant clar i creatiu. Las personas valorables no se olvidan. Inma, gràcies pel teu contrapunt lingüístic i completar tot el vocabulari català! Jorges, echaré de menos tus gritos de “se calienta” y “shame!” No hay un madrileño en todas partes! Ot, gràcies per la paciència infinita (de debò) que has tingut amb mi! Espero que les *stems* et tractin bé i que els consells et siguin útils. A l’Anna G, Tània, Dani, Albert, Rober i tots els que hem compartit algun moment al menjador, al laboratori o la Unitat, moltes gràcies per generar tant bon ambient.

Rita i Gemma, moltes gràcies per mantenir el minigrup. Definitivament, m'alegro moltíssim que la biologia cel·lular un dia ens fes anar a parar al mateix departament. Moltes gràcies pels vostres consells sincers, per ensenyar-me a estimar la ciència (tot i que el resultat no sempre valgui la pena), gràcies per la vostra alegria, pels berenars i per compartir l'amor a la competència!

AR, Aidi, Farri i Onix! Les meves estimades trompes de farlopa, que m'estimeu encara que treballi amb ratolins i cuidi cèl·lules! Gràcies per TOTS els moments que compartim, pel vostre sentit de l'humor i per ser el millor clan que puc tenir al meu costat. Gràcies per cuidar-me quan ho he necessitat i oferir-m'ho tot. Gràcies també per preparar-me una gran banda sonora. Us estimo molt! AR, gràcies a tu i la nova gramàtica per les correccions i Ona, gràcies per combinar tant bé els colors de la portada i Aida gràcies per revisar els resums. Pere, moltes gràcies per totes les rialles que m'has regalat! Sissys, gràcies per tots els vostres missatges locos, pels debats intensos per whatsapp, per les barbacoes infinites, les cervesetes i totes les trobades que hem anat fent junts! Espero que no s'aturin, que ara tindrè temps per fer-ho tot! Jaume, m'encanta el teu optimisme i la teva manera d'encarar la vida. Al teu costat tot es veu millor! Gràcies per seguir proposant els millors plans, que no s'acabin!

A la meva família, moltes gràcies per ajudar-me a arribar fins aquí. Per animar-me, per escoltar-me, per cuidar-me, per fer-me sempre costat i estimar-me tant! A tots els meus tiets, gràcies pel vostre interès i per la il·lusió que teniu per aquest treball. Gràcies pare per estar encantat de llegir i corregir la discussió! Gràcies pare, mare i iaiona per totes les paelles, els tappers i els sopars! Yeni, gràcies per ser així! Per fer-me riure sempre tant i per estar pendent de mi! Se li estima! I a tu Toni gràcies per la teva alegria, el teu optimisme, la super paciència que has tingut, per fer-me tant costat, per ser sempre a prop, per estimar-me tant i deixar-me les millors notes. Ets mel! I ja saps, el millor està per venir.

Gràcies a tots, per fer que aquests quatre anys tant intensos hagin estat plens de bons moments que no oblidaré!

La derivació de cèl·lules mare embrionàries de ratolí (mESC) està íntimament lligada a les condicions de cultiu a les que es sotmeten els embrions. És per això, que durant els últims anys s'han realitzat múltiples modificacions de les condicions de cultiu per tal de millorar-ne l'eficiència. Malgrat tot, l'efecte d'aquestes variables pràcticament no ha estat estudiada en mESC establertes a partir de blastòmers aïllats. Per tot això, aquesta tesi doctoral pretén estudiar quin és l'efecte del fons genètic dels embrions, els suplementes del medi i els modificadors de l'activitat de les vies de senyalització en la derivació de mESC a partir de blastòmers aïllats en comparació amb la derivació de mESC a partir d'embrions sencers, així com conèixer quin és l'estat de pluripotència de les línies establertes.

