

DOI: 10.13376/j.cbbs/2017133

文章编号: 1004-0374(2017)10-1000-07



裴端卿, 研究员, 中国科学院广州生物医药与健康研究院院长。国家“干细胞及转化研究”重点研发计划专家组组长, 国家干细胞临床研究专家委员会委员, 国家“863”生物医药领域专家, 国际干细胞学会 (ISSCR) 临床转化研究委员会委员, 人类基因组编辑研究委员会委员。获得国家自然科学奖二等奖、2015年度十大科技创新人物、谈家桢生命科学创新奖、国家杰出青年科学基金等荣誉。裴端卿研究员工作紧密围绕干细胞研究, 长期从事细胞命运调控、在体细胞重编程、胚胎干细胞多能性以及细胞间质上皮转化等研究方面作出了系统性和创新性贡献, 在国内率先建立了 iPS 技术, 推动了国内 iPS 研究的发展。

诱导重编程的表观遗传调控研究进展

李东伟, 陈捷凯, 裴端卿*

(中国科学院广州生物医药与健康研究院再生生物学中国科学院重点实验室, 干细胞与再生医学广东省重点实验室, 广州 510530)

摘要: 表观遗传调控是细胞命运变化与决定的重要基础之一。2006年, 日本科学家山中伸弥发现通过4个转录因子 Oct4、Sox2、Klf4 和 c-Myc 可以将已经分化的体细胞逆转回与胚胎干细胞相似的多能性状态, 获得诱导多能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPSCs)。这种诱导重编程技术不仅是干细胞技术的一大突破, 也提供了关键的体外模型用于研究细胞重编程的表观遗传机制。对该机制的深入理解将推动人类自由操纵细胞命运的进程, 从而有望治疗各种因功能细胞、组织、器官缺失退化引发的疾病。从诱导重编程的表观遗传调控方向的研究进展出发, 阐述通过诱导重编程发现的关键细胞命运转变表观调控机制, 展望未来的主要研究目标。

关键词: 诱导多能干细胞; 重编程; 表观遗传; 再生医学; 组蛋白甲基化

中图分类号: Q343; Q813 **文献标志码:** A

Progress in epigenetic regulation mechanism of induced reprogramming

LI Dong-Wei, CHEN Jie-Kai, PEI Duan-Qing*

(CAS Key Laboratory of Regenerative Biology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Stem Cell and Regenerative Medicine, Guangzhou Institutes of Biomedicine and Health, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510530, China)

Abstract: Epigenetic regulation is one of the fundamental mechanisms of cell fate transition and determination. In 2006, Japanese scientist Shinya Yamanaka found that differentiated somatic cells can be reprogrammed to embryonic stem cell-like pluripotent state, named induced pluripotent stem cells (iPSCs) by induction of four transcriptional factors including Oct4, Sox2, Klf4 and c-Myc. This induced programming technique is not only a breakthrough on stem cells field, but also opens a gate for studying epigenetic regulation mechanism of cellular

收稿日期: 2017-09-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(91419310)

*通信作者: E-mail: pei_duanqing@gibh.ac.cn

reprogramming *in vitro*. Understanding this mechanism will push the process of cell fate manipulation, then take advantage on regenerative medicine to treat disease caused by injury, degeneration or defect of functional cells, tissue or organ. Here we reviewed the progress in epigenetic regulation mechanism of induced reprogramming and gave a perspective of future research aim in this field.

Key words: iPSCs; reprogramming; epigenetic; regenerative medicine; histone methylation

在早期发育和细胞分化过程中有许多重要的细胞命运决定事件, 这些事件就像一个个有序的程序一样, 主导着个体发育的正常进行。破解生命程序中的细胞命运决定过程, 是遗传学、发育生物学、细胞生物学等领域共同面对的重要科学问题, 科学家们为此进行了大量的探索工作, 也取得了非常瞩目的成就。从遗传信息载体 DNA 的发现, 到遗传信息流和中心法则的确定, 让我们对细胞生命活动的基本信息来源有了最基本的了解。然而, 具备同一套遗传信息的多细胞个体能够展示出多种不同的细胞命运, 提示在基本遗传信息流之上, 还有不依赖 DNA 序列的控制信息表达模式的机制存在。通过追寻这一机制, 科学家提出了表观遗传的概念, 并在转录研究的基础上发现了大量表观遗传调控的机制。这一概念提出后就被广泛接受, 而且有更多的科学家投身到表观修饰这一领域, 极大地推动了这一领域的发展, 比如 DNA 甲基化、基因组印记、组蛋白乙酰化、组蛋白甲基化等^[1], 为人们展现了生命多样性的神奇一面。借助人基因组计划 (Human Genome Project, HGP) 的东风^[2], 一代、二代高通量 DNA 测序仪被发明应用, 随着这一强有力的工具的出现, 科学家实现了全基因组范围内的信息收集与检索。尤其是最近几年, 生命信息的发现呈现爆炸式的增长, 如转录组测序、表观组测序、转录因子调控网络、染色体高级结构等领域, 这些更加促进了科学的发展, 也让我们从更加全面的角度来考量细胞生命事件。

在哺乳动物正常发育中, 细胞是由一个具备全能性 (totipotency) 的受精卵细胞, 到多能性 (pluripotency) 的胚胎干细胞逐渐分化发育到具有特异性功能的终末分化细胞类型, 生物个体就是由这些具有不同功能的分化细胞类型组合而成。然而, 无论是干细胞, 还是分化细胞, 绝大部分都有一个共同特点: 即包含了个体发育所需的全部遗传信息。细胞核具备发育个体所需的遗传信息, 是在 1962 年由英国科学家约翰·戈登率先证实的, 他把青蛙卵细胞的细胞核替换为了成熟肠细胞的细胞核, 这个经过人工改造的细胞最终发育成了一只正常的蝌蚪, 开创了体

细胞核重编程为胚胎早期状态的研究领域^[3]。这一成果激励着众多科学家在重编程领域奋力前行, 1998 年, Wilmut 等^[4]首先在哺乳动物中完成体细胞核移植, 获得克隆羊“多利”, 证实哺乳动物的卵细胞中具备将体细胞核重编程的条件。日本科学家山中伸弥 (Yamanaka) 在 2006 年发现, 用 Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc (OSKM) 4 个转录因子就可以把小鼠胚胎成纤维细胞重编程到多能性状态^[5]。这一突破性成果迅速打开了干细胞和重编程研究领域的大门, 破解了卵细胞复杂的黑箱, 使得在体外细胞培养条件下大量进行体细胞重编程实验成为可能, 因而也提供了前所未有的研究体细胞重编程机制的机会。

在体细胞重编程快速发展的 10 年里, 对重编程机制的研究也越来越深入, 越来越清晰。重编程体系的优化, 效率的提高, 从 Yamanaka 因子到非 Yamanaka 因子, 从因子诱导到化合物诱导, 都极大地拓展了这个领域。重编程障碍的寻找, 由 DNA 甲基化到表观修饰因子和关键转录因子, 以及相关细胞表面标志物筛选, 都促进了重编程领域的清晰化。

1 研究成果

1.1 适合机理研究的重编程体系

iPS 重编程技术相较于之前的体细胞核移植、胚胎干细胞体细胞融合重编程技术^[6], 具有因子确定、生化操作方便、易于在大量细胞中进行体外研究的优点, 因此成为重编程分子机制研究的首选系统。然而, 其重编程体系效率非常低, 以 Nanog-GFP 作为指标只有 0.001%~0.01% 的重编程效率 (本文所述效率均为可信 iPS 克隆数 / 起始细胞数), 而且重编程时间需要一个月, 加上培养体系中含有血清等成分不清楚的物质, 无法为后续机制探索和药物筛选提供有力的帮助。因此, 优化重编程体系, 提升 iPS 细胞诱导效率, 是在诱导重编程系统上深入研究机制的重要前提。诱导重编程包括多个技术环节, 最早进入优化视野的是起始细胞, 最早使用的是 Fbx15 启动子或 Oct4 启动子介导的 neo 敲入

细胞^[5,7]。该细胞可以通过药物筛选的方式获得激活多能性基因的干细胞,而我们实验室通过无基因修饰的成纤维细胞在中国首次成功建立诱导重编程系统^[8]。此后,各实验室使用了神经干细胞^[9]、B细胞^[10]、脑膜细胞^[11]等加强重编程的效率或降低对重编程因子的需求。另一方面,科学家们通过添加与多能性调控网络有关的转录因子来提高重编程效率,如Lin28、Esrrb、Nr5a2等^[12-15],也通过可诱导表达的系统构建iPS细胞后分化再进行二次诱导的策略,从而提升细胞的均一性^[16-17]。一个重要的思路是,使用小分子抑制剂对特定的通路进行干预,从而满足提升重编程效率或减少重编程因子的需求,其中组蛋白去乙酰化酶(HDAC)的抑制剂VPA是最早被发现在重编程中有强大提升效果的药物^[18],而后被广泛应用的药物则是我们实验室发现的维生素C^[19]。相对于大部分被发现的药物都是靶点明确的小分子特异性抑制剂,维生素C是一个靶点不明确的营养因子。虽然具备抗氧化剂效果,但和其他常用的抗氧化剂相比,有着极为突出的提升重编程效率的作用。最为珍贵的是,不同于其他药物,维生素C在提升重编程效率中对细胞毒性很低,而且可以广泛作用于所有不同的重编程因子组合,这提示维生素C直接调控了体细胞重编程中非常关键的分子机制。

从维生素C的发现中我们得到提示:细胞外的环境在重编程中扮演与细胞内因子同等重要的作用。我们假设Yamanaka发现的因子已经有能力将体细胞带回多能性干细胞状态,而重编程在大部分细胞中失败的原因,则是因为重编程的环境并不适合。为了开发出更具效果的培养系统,我们首先决定去除血清等不确定因素,在这种条件下我们就能够评价每一条信号通路在重编程中的作用。在此思路下,我们开发了无血清重编程诱导培养体系iSF1,相对于传统的mES培养基来说,在iSF1系统中只需要8d就可以促使OSKM四因子重编程Oct4-GFP阳性克隆的出现,效率达到0.5%,而对OSK三因子(Oct4、Sox2、Klf4)重编程体系促进效果更为显著^[20]。在iSF1的基础之上,我们经过对候选化合物进行系统性的筛选,很快开发出了更高效的化学成分确定诱导培养基iCD1,可以促进OSK诱导系统在8d就可以达到10%的重编程效率,而且在iCD1体系下单因子O就可以诱导出多能干细胞^[21]。

从机制研究的角度讲,体细胞重编程的效率

是极为关键的指标,对于降低实验数据(如高通量测序)的信噪比至关重要。此外,重编程系统是否能够代表细胞经历重编程的普遍事件也是需要考虑的关键因素,因此,我们认为通过病毒随机感染系统或者使用独立实验来源的至少三株二次诱导重编程iPS细胞系进行实验。因此,iCD1在Yamanaka因子体系下,是非常适合进行机制研究的实验系统。

除了通过高效的重编程系统研究分子机制,发展与Yamanaka因子完全不同的重编程系统也是机制研究的关键。其原因在于,某一套特定的重编程因子系统很可能具有路径的单一性,在揭示体细胞重编程的普遍机理上存在不足。新的重编程系统分为两个主要思路:一个是用化合物替代因子,最早系统进行这种尝试的是Sheng Ding实验室,用BIX01294和BayK8644等替代了Sox2等因子^[22]。后续报道的因子中,RepSOX(E-616452)也能够有效地替代Sox2^[23]。2011年数个实验室相继报道Oct4单因子+化合物成功诱导出多能性干细胞。2013年,邓宏魁课题组率先报道了完全用小分子化合物诱导多能性干细胞,该重编程体系经过类似胚外内胚层的阶段到达多能性阶段,揭示了不同的重编程路径^[24]。在因子方面,Buganim等^[25]率先报道了Sall4、Nanog、Esrrb和Lin28的组合(SNEL),但该组合效率非常低。我们实验室经过多年的积累,将数个不同研究发现的因子组合起来,我们筛选出了非Yamanaka的6因子诱导系统(Glis1、Sall4、Lrh1、Jdp2、Jhdm1b、Id1),其中的核心之一是体细胞转录因子c-Jun的拮抗因子Jdp2,这一六因子的体系也体现出和Yamanaka因子重编程不同的路径过程,目前我们正在深入研究^[26]。

1.2 诱导重编程的表观遗传调控机制

由于表观遗传调控是细胞产生不同命运的物质基础,科学家们一直相信,重编程之所以困难,在于细胞在分化过程中设立了各种固定的表观调控模式,形成了重编程的障碍。由于重编程在普通的体细胞中是不会自发产生的,可以把这种重编程的障碍理解为体细胞的身份确定机制,而只有迫使体细胞重编程,我们才能理解这些机制中哪些是处于关键调控地位的。

从HDAC抑制剂可以促进重编程的研究开始,科学家就致力于通过小分子探针,直接过表达或敲降表观遗传调控酶,来发掘对重编程关键的表观遗传调控机制。后续发现DNA甲基化、组蛋白H3K4甲基化、组蛋白H3K79甲基化都起到一定的效

果^[27-29]。在前文中我们提到维生素 C 可能直接调控了关键的重编程分子机制, 因此, 我们以维生素 C 作为探针研究诱导重编程的表观遗传调控机制。维生素 C 的体内功能中, 很大一部分是作为 α 酮戊二酸/ Fe^{2+} 依赖性的双加氧酶的辅酶因子存在, 有理论认为这种双加氧酶作用过程中会使电子传递核心的亚铁离子氧化到三价或四价, 而维生素 C 在细胞内铁离子的还原中扮演不可替代的角色^[30]。2004 年, Shi 等^[31] 发现第一个组蛋白去甲基化酶 LSD1; 而 2006 年, Klose 等^[32] 鉴定了一个组蛋白去甲基化酶家族 JmjC 结构域蛋白, JmjC 结构域也被证实是一个 α 酮戊二酸/ Fe^{2+} 依赖性的双加氧酶结构域。因此, 我们推测维生素 C 在组蛋白去甲基化中扮演重要的角色。经过筛选, 我们发现 H3K36me2 的去甲基化酶 JHDM1A 和 JHDM1B (也称 KDM2A、KDM2B) 在维生素 C 促进重编程的过程中起着重要的作用^[33], 从而揭开了维生素 C 通过组蛋白去甲基化进行表观遗传调控的研究序幕, 维生素 C 对于重编程乃至大量细胞命运决定事件的关键作用得到理论上的阐明。后来, DNA 甲基氧化酶 TET 家族被发现^[34-35], 该家族也属于 α 酮戊二酸/ Fe^{2+} 依赖性的双加氧酶, 我们发现 TET1 在重编程中的功能受到维生素 C 调节^[36](图 1), 另外一项研究也发现维生素 C 可以通过加强 TET 的活性从而在胚胎干细胞中激活部分与生殖相关的基因。

由于在血清培养条件下, 重编程诱导效率非常

低, 我们推测在血清中有某种成分会抑制 Yamanaka 因子的重编程进程。通过分析血清中的成分, 结合无血清培养体系, 我们发现 BMP4 非常显著地抑制的 iSF1 诱导的 Yamanaka 因子的重编程进程。在此基础之上, 我们尝试在血清中加入 BMPs 信号通路的拮抗因子 Noggin 和 ALK1-ECD, 发现能解除血清的抑制效果, 显著提高重编程效率。BMPs 或血清使得重编程停留在一个中间状态 (pre-iPS 细胞), 我们进行更深入的机制探索发现 BMP 通过调控 Setdb1, 对多能性相关的位置 (如 Oct4 结合位点) 进行组蛋白 H3K9me3 的修饰调控, 从而形成异染色质, 阻断重编程因子 Oct4 等对这些位点的调控与激活。H3K9me3 这一关键的表观遗传障碍可以被维生素 C 激活的 KDM3/4 家族蛋白所清除, 从而促进不完全重编程的 pre-iPS 细胞高效地转化为 iPS 细胞^[37](图 1)。这一发现基于重编程, 系统阐述了胞外信号通路如何通过表观遗传调控机制影响细胞命运, 对于理解信号通路在发育等细胞命运决定过程中的重要作用提供了新的理解层面。2014 年, Zhang 实验室证明在体细胞核移植 (SCNT) 过程中, 体细胞核重编程失败的主要原因也是体细胞保留的 H3K9 甲基化, 从而证实 H3K9 甲基化的确是体细胞身份标记的关键^[38]。

正常发育过程中, 上皮细胞向间充质细胞转变 (EMT) 是一个非常关键的细胞命运决定事件。小鼠成纤维细胞就是 EMT 过程中的的一个产物, 而体

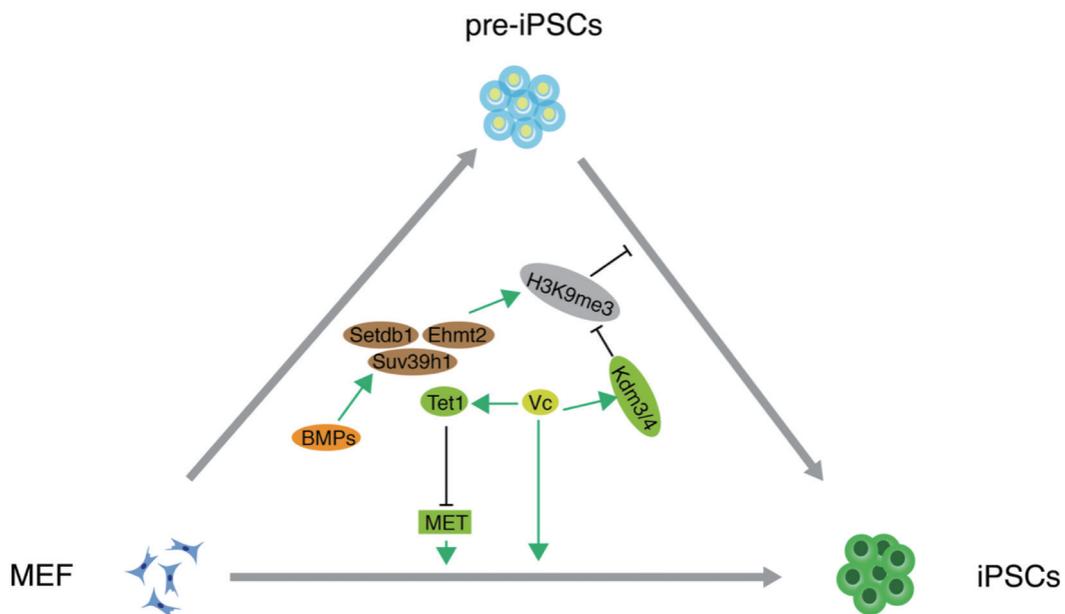


图1 Vc在重编程中的作用机制

细胞重编程是细胞命运发生逆转的一个过程,那么体细胞重编程会不会发生 EMT 向 MET 逆转呢?通过仔细分析重编程细胞形态变化,我们实验室首次证实重编程过程早期会发生 MET^[39]。同时,我们也发现 Klf4 在重编程早期具有促使 MET 发生的作用。通过检索文献我们发现 BMP4 能促进 MET 过程,因此,我们猜测 BMP4 或许可以替代 Klf4 促进重编程,最终实验结果证实 BMP4 确实可以促进 OS 两因子的重编程进程^[40]。在 MET 过程中,Sox2 和 Oct4 会抑制 EMT 的介导者 Snail; c-Myc 则负责下调 TGF- β 1 和 TGF- β receptor2; Klf4 诱导上皮化相关的基因,如 Cdh1 等。一旦阻碍 MET 过程则会抑制重编程进程。我们对这一关键细胞生物学现象的表观遗传调控机理进行了深入研究后发现,表观修饰酶 Tet 家族在 MET 过程中承担着重要的作用。敲除 Tet1/2/3 会阻碍 MET 过程而严重抑制重编程^[41],过表达 MET 相关的关键的 miRNAs (miR-200b、miR-200c、miR-429) 则能恢复 Tet1/2/3 敲除的表型。深入研究发现 Tet1/2/3 的敲除会导致这些关键 miRNAs 启动子区的甲基化不能被去除而被沉默,从而影响了 MET 过程。

1.3 染色质动态变化

染色质分为常染色质和异染色质,常染色质结构比较松散,基因表达比较活跃,异染色质则处于压缩状态,基因表达不活跃。而体细胞重编程过程中常异染色质的转变这一关键科学问题仍没有被清晰地阐述。基于常异染色质光漂白后荧光恢复 (FRAP) 技术,我们实验室开发了活细胞内实时精确定量常染色质和异染色质的松散程度的成像方法,通过红色荧光 (HP1a-mCherry) 标记异染色质标记蛋白 HP1 和绿色荧光蛋白 (H1-GFP) 标记维持组蛋白复合物稳定的 H1,来区分常异染色质。结合 FISH 技术发现,在重编程中原本处于异染色质状态的多能性基因 Oct4 位点被打开。同时,基于这个技术我们也发现, Gadd45a 可以促进异染色质转变为常染色质而促进重编程进程,这个转变过程伴随着异染色质标记 H3K9me2/3 和 H3K27me2/3 修饰转变为常染色质标记 H3K9ac 和 H3K27ac^[42]。Celoufih 等^[43]发现在重编程中敲降 CAF-1 (染色质组装因子 -1) 可以使多能性相关的增强子区的染色质结构变得更加松散,促进 Sox2 结合到多能性位点,进而显著地促进重编程。表观修饰在染色质结构改变过程中扮演着重要的角色,那么启动重编程进程的 Oct4、Sox2、Klf4 是怎么工作的呢? Chronis

等^[44]发现,OSKM 这 4 个 Yamanaka 因子在重编程中不同阶段起着不同的作用。在重编程早期 OSK 会结合到小鼠胚胎成纤维细胞特异性的增强子区,并介导体细胞转录因子重定向到其他位点,并最终导致其失活,而多能性位点的打开则是一个逐步实现的一个过程。

人们已经揭示了许多重编程的机制,但是至今染色质结构层面的动态变化却没有被很深入地研究过。基于这个前提,我们采用最新的染色质研究工具 ATAC-seq 来检测重编程中染色质动态变化规律。通过分析我们发现在重编程中染色质发生了剧烈的变化,首先是关闭了许多体细胞特异性的位点,随后打开了多能性相关的位点。同时,我们也继续研究了 c-Jun 在重编程中对染色质结构的影响,发现 c-Jun 对重编程的抑制主要体现在其阻碍了正常重编程的染色质关闭/打开的动态变化,而且诱导打开了更多非重编程需要的位点,进而抑制了重编程进程 (未发表结果)。

2 展望

2.1 临床应用

体细胞重编程技术的建立为临床治疗某些特殊疾病提供了很好的技术突破,如需求量大的器官移植,完全可以借助体细胞重编程来获得患者自身遗传背景来源的干细胞,再通过合适方法诱导分化成特殊细胞类型或器官,以达到治疗的目的。而且,由于干细胞便于进行基因编辑的特点,可以将由基因突变导致疾病的患者的体细胞诱导成多能性细胞,进而通过基因编辑来校正这一突变使其恢复成正常细胞,再分化成特殊细胞来达到治疗的目的。

将体细胞诱导到多能性状态再分化成特殊类型细胞的过程是一个漫长的过程,因此,可以将体细胞诱导到一个合适的中间状态再诱导到特定细胞类型将是另一个可行的方式。

2.2 人诱导多能性干细胞和naïve干细胞

人诱导多能性干细胞 (hiPSCs) 领域中一直存在两个比较重要的问题:一是人诱导多能性干细胞的周期比较长、效率低;二是人的 naïve 态的多能性干细胞没有清晰的定义。针对第一个问题,我们需要在培养体系和诱导系统上继续优化,寻找合适的诱导培养基和诱导因子组合,提高诱导效率和缩短诱导时间。针对第二个问题,我们同样需要开发新的培养体系来体外维持和扩增真正的人胚胎干细胞,进而为人诱导多能性干细胞提供

帮助。

2.3 细胞命运路线的转变

体细胞重编程是一个很好的研究细胞命运转变的系统, 通过深入的体细胞重编程机制研究, 阐述清楚转录因子调控网络与细胞命运的维持、表观遗传修饰在细胞命运转变中的作用以及染色质高级结构的动态变化这三个方面, 我们可以清晰地了解细胞命运决定的相关机制, 为理解个体发育和生命活动提供更有力的证据, 并为未来定向改变细胞命运提供更高效的快速的转变方法。

然而, 细胞的异质性会对这个过程产生很大的影响, 而无论哪种细胞命运转化模型(体内发育、体外定向分化、体外重编程)都具备很强的细胞异质性, 因此, 单细胞分辨率的信息采集是必需的。目前单细胞 RNA 测序技术相对比较成熟, 单细胞水平的 DNA 开放位点等技术也都被逐渐开发出来, 但这些单细胞方法的技术噪音还比较大, 在数据计算和生物学层面功能挖掘上还存在较多问题, 大部分还处于描述已知的生物学过程的研究层面。如何结合这些新方法发现新的细胞命运决定规律, 将是接下来细胞命运研究领域的研究重点。

[参 考 文 献]

- [1] Reik W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature*, 2007, 447: 425-32
- [2] The Human Genome Project Completion: Frequently Asked Questions [EB/OL]. <https://www.genome.gov/11006943/>
- [3] Gurdon JB. Adult frogs derived from the nuclei of single somatic cells. *Dev Biol*, 1962, 4: 256-73
- [4] Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 1997, 385: 810-3
- [5] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006, 126: 663-76
- [6] Takahashi K, Yamanaka S. A decade of transcription factor-mediated reprogramming to pluripotency. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2016, 17: 183-93
- [7] Wernig M, Meissner A, Foreman R, et al. *In vitro* reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature*, 2007, 448: 318-24
- [8] Qin D, Li W, Zhang J, et al. Direct generation of ES-like cells from unmodified mouse embryonic fibroblasts by Oct4/Sox2/Myc/Klf4. *Cell Res*, 2007, 17: 959-62
- [9] Eminli S, Utikal J, Arnold K, et al. Reprogramming of neural progenitor cells into induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2 expression. *Stem Cells*, 2008, 26: 2467-74
- [10] Hanna J, Markoulaki S, Schorderet P, et al. Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. *Cell*, 2008, 133: 250-64
- [11] Qin D, Gan Y, Shao K, et al. Mouse meningeocytes express Sox2 and yield high efficiency of chimeras after nuclear reprogramming with exogenous factors. *J Biol Chem*, 2008, 283: 33730-5
- [12] Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 2007, 318: 1917-20
- [13] Maekawa M, Yamaguchi K, Nakamura T, et al. Direct reprogramming of somatic cells is promoted by maternal transcription factor Glis1. *Nature*, 2011, 474: 225-9
- [14] Heng JC, Feng B, Han J, et al. The nuclear receptor Nr5a2 can replace Oct4 in the reprogramming of murine somatic cells to pluripotent cells. *Cell Stem Cell*, 2010, 6: 167-74
- [15] Feng B, Jiang J, Kraus P, et al. Reprogramming of fibroblasts into induced pluripotent stem cells with orphan nuclear receptor Esrrb. *Nat Cell Biol*, 2009, 11: 197-203
- [16] Hockemeyer D, Soldner F, Cook EG, et al. A drug-inducible system for direct reprogramming of human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell*, 2008, 3: 346-53
- [17] Cacchiarelli D, Trapnell C, Ziller MJ, et al. Integrative analyses of human reprogramming reveal dynamic nature of induced pluripotency. *Cell*, 2015, 162: 412-24
- [18] Huangfu D, Osafune K, Maehr R, et al. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only *Oct4* and *Sox2*. *Nat Biotechnol*, 2008, 26: 1269-75
- [19] Esteban MA, Wang T, Qin B, et al. Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 2010, 6: 71-9
- [20] Chen J, Liu J, Han Q, et al. Towards an optimized culture medium for the generation of mouse induced pluripotent stem cells. *J Biol Chem*, 2010, 285: 31066-72
- [21] Chen J, Liu J, Chen Y, et al. Rational optimization of reprogramming culture conditions for the generation of induced pluripotent stem cells with ultra-high efficiency and fast kinetics. *Cell Res*, 2011, 21: 884-94
- [22] Shi Y, Desponts C, Do JT, et al. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Oct4 and Klf4 with small-molecule compounds. *Cell Stem Cell*, 2008, 3: 568-74
- [23] Ichida JK, Blanchard J, Lam K, et al. A small-molecule inhibitor of *tgf-β* signaling replaces *sox2* in reprogramming by inducing *nanog*. *Cell Stem Cell*, 2009, 5: 491-503
- [24] Hou P, Li Y, Zhang X, et al. Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science*, 2013, 341: 651-4
- [25] Buganim Y, Markoulaki S, van Wietmarschen N, et al. The developmental potential of iPSCs is greatly influenced by reprogramming factor selection. *Cell Stem Cell*, 2014, 15: 295-309
- [26] Liu J, Han Q, Peng T, et al. The oncogene *c-Jun* impedes somatic cell reprogramming. *Nat Cell Biol*, 2015, 17: 856-67

- [27] Buganim Y, Faddah DA, Jaenisch R. Mechanisms and models of somatic cell reprogramming. *Nat Rev Genet*, 2013, 14: 427-39
- [28] Ang YS, Tsai SY, Lee DF, et al. Wdr5 mediates self-renewal and reprogramming via the embryonic stem cell core transcriptional network. *Cell*, 2011, 145: 183-97
- [29] Onder TT, Kara N, Cherry A, et al. Chromatin-modifying enzymes as modulators of reprogramming. *Nature*, 2012, 483: 598-602
- [30] Monfort A, Wutz A. Breathing-in epigenetic change with vitamin C. *EMBO Rep*, 2013, 14: 337-46
- [31] Shi Y, Lan F, Matson C, et al. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell*, 2004, 119: 941-53
- [32] Klose RJ, Kallin EM, Zhang Y. JmjC-domain-containing proteins and histone demethylation. *Nat Rev Genet*, 2006, 7: 715-27
- [33] Wang T, Chen K, Zeng X, et al. The histone demethylases Jhdm1a/1b enhance somatic cell reprogramming in a vitamin-C-dependent manner. *Cell Stem Cell*, 2011, 9: 575-87
- [34] He YF, Li BZ, Li Z, et al. Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science*, 2011, 333: 1303-7
- [35] Ito S, Shen L, Dai Q, et al. Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science*, 2011, 333: 1300-3
- [36] Chen J, Guo L, Zhang L, et al. Vitamin C modulates TET1 function during somatic cell reprogramming. *Nat Genet*, 2013, 45: 1504-9
- [37] Chen J, Liu H, Liu J, et al. H3K9 methylation is a barrier during somatic cell reprogramming into iPSCs. *Nat Genet*, 2013, 45: 34-42
- [38] Matoba S, Liu Y, Lu F, et al. Embryonic development following somatic cell nuclear transfer impeded by persisting histone methylation. *Cell*, 2014, 159: 884-95
- [39] Li R, Liang J, Ni S, et al. A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell*, 2010, 7: 51-63
- [40] Chen J, Liu J, Yang J, et al. BMPs functionally replace Klf4 and support efficient reprogramming of mouse fibroblasts by Oct4 alone. *Cell Res*, 2011, 21: 205-12
- [41] Hu X, Zhang L, Mao SQ, et al. Tet and TDG mediate DNA demethylation essential for mesenchymal-to-epithelial transition in somatic cell reprogramming. *Cell Stem Cell*, 2014, 14: 512-22
- [42] Chen K, Long Q, Wang T, et al. Gadd45a is a heterochromatin relaxer that enhances iPS cell generation. *EMBO Rep*, 2016, 17: 1641-56
- [43] Cheloufi S, Elling U, Hopfgartner B, et al. The histone chaperone CAF-1 safeguards somatic cell identity. *Nature*, 2015, 528: 218-24
- [44] Chronis C, Fiziev P, Papp B, et al. Cooperative binding of transcription factors orchestrates reprogramming. *Cell*, 2017, 168: 442-59, e20