

**ORIGINAL ARTICLE / ARTÍCULO ORIGINAL****TRANSCRIPTION FACTORS OF EMBRYONIC STEM CELLS AND INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS****FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS Y CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES INDUCIDAS**Ruth Aquino Ordinola¹ & Luis Tume²¹ Laboratorio de Biología molecular, Facultad de Medicina Humana, Universidad Nacional de Tumbes, Perú.² Laboratorios de Investigación y Desarrollo, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú.

Correo electrónico: luis.tume.f@upch.pe

The Biologist (Lima), 13(1), jan-jun: 143-152.

ABSTRACT

Since their therapeutic potential was discovered, stem cells with pluripotent capacity have been sought, and since then embryonic stem cells (ESCs) became an important center in stem cell-based therapy, there are ethical problems with the use of embryos. Using a small group of transcription factors (c-Myc, Oct4, Klf4 and Sox-2), fibroblasts in pluripotent stem cells (iPSC) were converted. This stem cell technology currently has some disadvantages, because there are differences in gene expression profiles due to retention of an "epigenetic memory" from the cells from which they were derived; this could cause problems when applying them in therapy. In this review we discuss the role of some transcription factors involved in iPSCs and ESCs.

Keyword: epigenetic, pluripotency, Stem cells, transcription factors.**RESUMEN**

En las células madre desde que se descubrió su potencial terapéutico se han buscado células madre con capacidad pluripotente, y desde entonces las células madre embrionarias (ESCs) se convirtieron en un centro importante en la terapia celular basada en células madre, ya que a partir de éstas se forman todos los tejidos del cuerpo, pero involucra problemas éticos por el uso de embriones. Posteriormente al usar un pequeño grupo de factores de transcripción (c-Myc, Oct4, Klf4 y Sox-2) se convirtió fibroblastos en células madre pluripotenciales (iPSC). Esta tecnología de células madre actualmente está teniendo ciertas desventajas, debido a que existen diferencias en los perfiles de expresión génica ya que conservan una "memoria epigenética" de las células donde derivan, lo que podría causar problemas al momento de aplicarlas en terapia. En esta revisión discutimos el papel de algunos factores de transcripción involucrados en las iPSCs y ESCs.

Palabras clave: Células madre, epigenética, pluripotencia, factores de transcripción.

INTRODUCCIÓN

Las células madre embrionarias (ESCs) derivadas de la masa celular interna (ICM) del blastocisto, pueden proliferar indefinidamente *in vitro* (auto-renovación), tienen cariotipos normales y expresan altos niveles de actividad de la telomerasa. Por ejemplo, durante cuatro a cinco meses estas células que proliferan sin diferenciación, siguen siendo cariotípicamente y fenotípicamente estables y proporcionan una excelente fuente de material para la terapia celular en varias enfermedades degenerativas (Carpenter *et al.* 2003). Estas células mantenidas *in vitro* tienen el potencial de desarrollar un trofoblasto y dar origen a las tres capas germinales embrionarias, tales como el endodermo (epitelio intestinal), mesodermo (cartílago, hueso, músculo liso y estriado, epitelio neuronal, ganglios embrionarios) y ectodermo (epitelio escamoso estratificado). Estas características únicas las hacen excepcionalmente valiosas no solo para la terapia celular, sino también para el descubrimiento de fármacos, estudios *in vitro* de enfermedades y terapia génica (Martin 1981, Thomson 1988, Pan & Thomson 2007).

Debido a los problemas éticos que se han venido dando por el uso de embriones como fuente de células pluripotentes, se han desarrollado nuevas fuentes para obtener células con las mismas características (Prelle *et al.* 2002), se empezó a usar la introducción de los cuatro factores de transcripción, Oct3/4, Sox2, Klf4 y c-Myc que originan con éxito la reprogramación de las células somáticas en células madre pluripotentes inducidas (iPSC). Los factores de transcripción son proteínas de unión a secuencias específicas del ADN que de alguna manera controlan el nivel de transcripción de la información genética. Este tipo de iPSCs tienen muchas de las características de las ESCs, incluyendo la pluripotencia y la capacidad de generar quimeras de línea germinal de ratón (Okita *et*

al. 2007, Yamanaka 2012). Es por eso que actualmente es necesario conocer detalladamente el papel específico de estos factores de transcripción para lograr una aplicación terapéutica eficiente. En esta revisión discutiremos el papel de algunos factores de transcripción son responsables de la pluripotencia de las ESCs y las iPSCs cuya diferencia es clave para los estudios de reprogramación celular.

Las células madre embrionarias (ESCs)

Gracias a las tecnologías de alto rendimiento que han facilitado el genoma en estudios de red de la transcripción, da lugar al descubrimiento de nuevos factores de transcripción implicados en el mantenimiento del estado de la célula madre embrionaria. Mientras que el circuito transcripcional sigue creciendo, la regulación epigenética ha ganado la atención como un proceso importante en la función de las células madre (Ng *et al.* 2008; Hosseinpour 2013).

Para hacerse una idea de la regulación transcripcional de las ESCs, hay 11 regiones promotoras de genes expresados tales como SOX2, LIN28, STAT3, NANOG, LEFTB, TDGF1, POU5F1, FOXD3, TERF1, REX1 y GDF3. Las ESCs tienen una continua auto-renovación y diferenciación debido a los factores de transcripción, Oct4, Sox2, y Nanog. Además, las combinaciones de factores, incluyendo siempre Oct4 y Sox2, se reprograman células somáticas a un estado pluripotente (Orkin *et al.* 2008).

ZIC3, un miembro de la familia de factores de transcripción “dedos de zinc”, juega un papel importante en el mantenimiento de la pluripotencia mediante la prevención de especificación a ciertos linajes endodérmicos en las células madre embrionarias. La expresión es reprimida en la diferenciación. La expresión de ZIC3 en células madre embrionarias pluripotentes también está regulada directamente por Oct4, Sox2, y

Nanog (Lim *et al.* 2007).

En la figura 1 se muestra varias señales extrínsecas tales como el factor inhibitorio de leucemia (LIF), proteína morfogénica del hueso (BMP) y Wnt que apoyan la auto-renovación y pluripotencia de las ESC a través de la regulación de los "genes pluripotentes." Un único factor de transcripción Nanog, es uno de los efectores claves de estas señales. Los niveles altos de elevado de Nanog pueden mantener las ESC de ratón en constante auto-renovación independiente de LIF y permitir el crecimiento de células ESC humanas sin células alimentadoras. Además de las vías de

señales externas, factores de transcripción intrínsecos tales como Foxd3, P53 y Oct4 también están involucrados en la regulación de la expresión de Nanog. Funcionalmente, Nanog trabaja en conjunto con otros factores pluripotentes clave tales como Oct4 y Sox2 para controlar un conjunto de genes diana que tienen funciones importantes en la pluripotencia de ESC. En la figura 2 se muestra como estos factores clave forman una red de regulación para apoyar o limitar el nivel de expresión de cada uno, que mantiene las propiedades de las ESC (Pan & Thomson 2007).

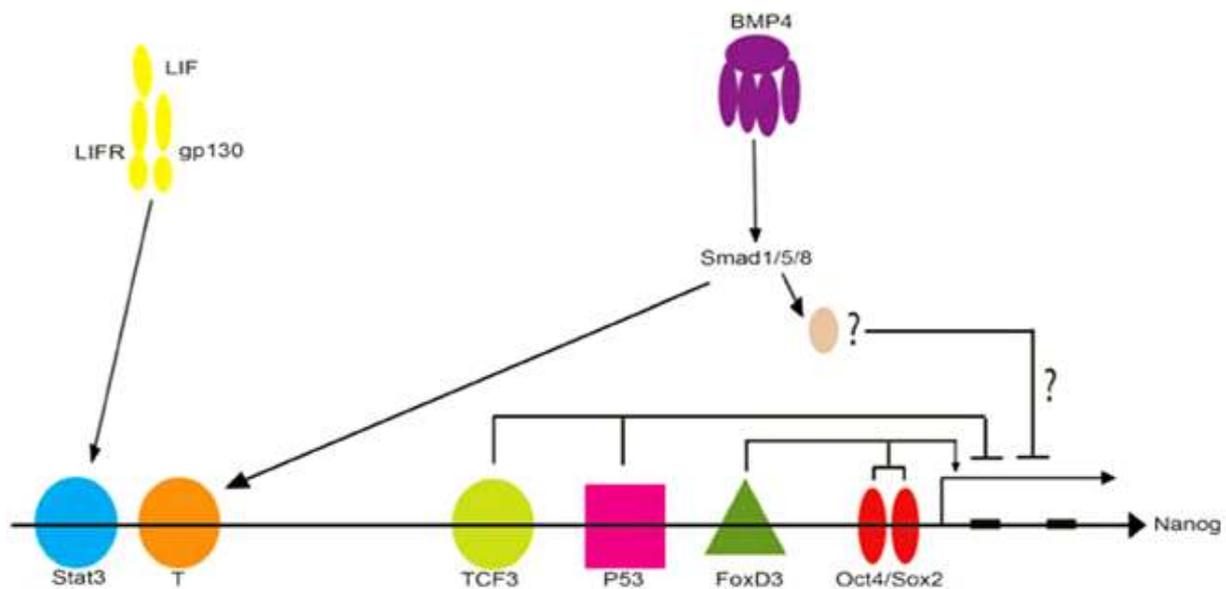


Figura 1. Regulación de la expresión de Nanog. Foxd3 y Oct4/Sox2 se unen a la región proximal del promotor Nanog y apoyan su expresión. TCF3 y p53 también se unen al promotor y regular negativamente la expresión de Nanog. LIF (factor inhibitorio de leucemia) y la señalización de BMP (proteína morfogénica del hueso) y sus efectores intermedios STAT3 y T también pueden estar involucrados en la regulación de Nanog. Los signos de interrogación muestran la posible participación de otros reguladores, que aún se desconoce. Tomado de Pan & Thomson (2007).

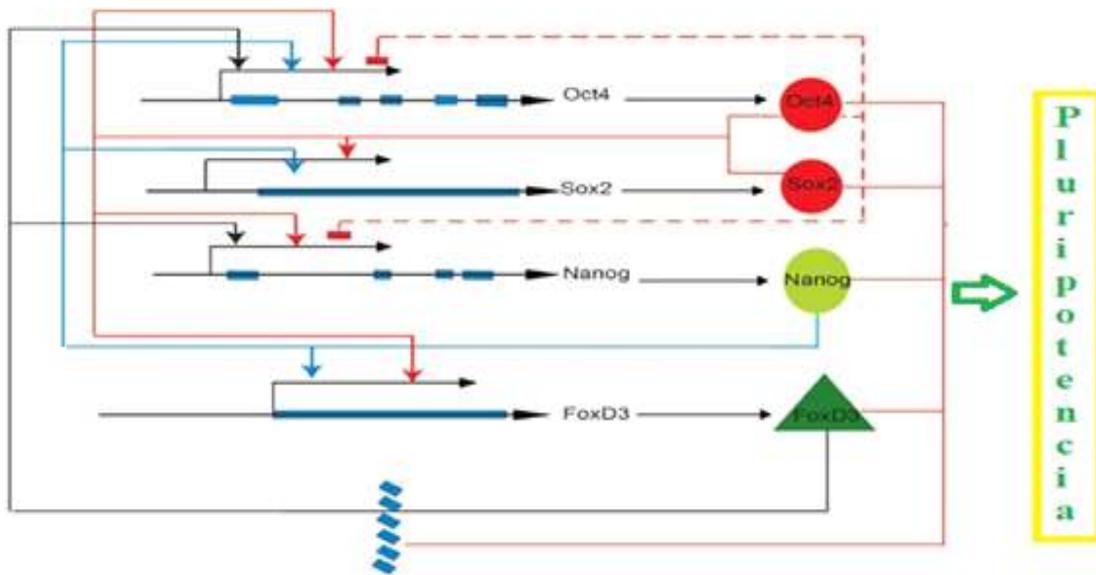


Figura 2. Interconexiones de regulación de factores de transcripción clave en el mantenimiento de la pluripotencia y autorenovación de las ESC. Los reguladores como Oct4, Nanog, Sox2 y Foxd3 se unen al promotor de uno al otro, y ya sea apoyan o limitan la expresión del otro, formando una red interconectada de autorregulación. Las flechas conectadas a los factores por las líneas continuas indican la regulación positiva de un promotor por los factores. Las líneas discontinuas que unen a Oct4 indican regulación negativa. Tomado de Pan & Thomson (2007).

Estas células expresan altos niveles de telomerasa y parecen tener potencial de crecimiento indefinido. La generación de las grandes cantidades de células necesarias para terapias de reemplazo celular requerirá una población de células que es estable en cultivo a largo plazo. Se han caracterizado las propiedades de varias líneas de células madre embrionarias humanas (hESCs) que han sido mantenidas en cultivo durante períodos prolongados. Los análisis cuantitativos demuestran que todas las líneas celulares examinadas muestran la expresión del marcador coherente y conservan un cariotipo normal después de un cultivo a largo plazo. Las hESCs se han diferenciado en los derivados de las tres capas germinales. Específicamente esto incluye cardiomiocitos, células neurales, células hepatocitos como las células endoteliales, y células progenitoras hematopoyéticas. Estos datos demuestran la estabilidad cariotípica y fenotípica de las

hESCs y su amplia capacidad de diferenciación indican que pueden ser una fuente adecuada de células para múltiples aplicaciones de la medicina regenerativa. Ya se ha reportado los defectos de la impronta genómica que producen en las células madre embrionarias de ratón, con datos obtenidos también en primates no humanos y células madre embrionarias humanas (Huntriss & Picton 2008). La investigación sobre células madre humanas y de ratón indica que el desarrollo, los genes relacionados con el cáncer, y los genes regulados por la impronta genómica son particularmente susceptibles a los cambios en la metilación del ADN. Junto con la aparición de alteraciones genéticas, la inestabilidad epigenética necesita ser monitoreada al considerar las células madre humanas para fines terapéuticos y tecnológicos (Pannetier & Feil 2007). Pero a pesar de que las células madre embrionarias constituyen una herramienta muy importante

para la medicina regenerativa en la actualidad. Estas células madre embrionarias de ratón y las células madre embrionarias humanas, en particular, son casi todos derivados de embriones obtenidos por fecundación *in vitro* (FIV) y del cultivo *in vitro* (IVC), sin embargo, los embriones manipulados *in vitro* tienden a una impronta genómica anormal, respecto a estas *in vivo* (Horii *et al.* 2010). Estas modificadores epigenéticos juegan un rol decisivo en la regulación del equilibrio entre la pluripotencia y la diferenciación mediante la promoción de cambios en la estructura de la cromatina (Keenen & Serna 2009).

Otro punto que se debe tomar en cuenta es el empaquetamiento de ADN en la cromatina a través de asociaciones con las histonas y proteínas no histonas que inhiben varios procesos celulares. La cromatina restringe la accesibilidad del ADN y genera mecanismos complejos para la regulación de los procesos que utilizan ADN. Un rasgo característico de la cromatina de las ESCs es que los sitios reguladores específicos, en particular los de un loci específico de factores de transcripción parecen estar en un estado de “silencio”, pero en donde requieren ciertos factores para ser activados. La variante de la histona, H2AZ se requiere para el desarrollo temprano de mamíferos y ha sido implicado en la regulación de la expresión génica específica de las ESCs. En las ESC hay una mayor estructura de cromatina ordenada que es generalmente dinámica y permisiva a la maquinaria transcripcional (Saladi 2010).

Los análisis moleculares, celulares y fisiológicos demuestran que los cardiomiocitos derivados de células ES son funcionalmente viables y que estos derivados de células exhiben características típicas de las células del corazón en las primeras etapas de desarrollo cardíaco. Debido a que la insuficiencia cardíaca terminal se caracteriza por una pérdida significativa de los cardiomiocitos, el uso de la progenie derivada

de células ES humanas representa una posible fuente para las terapias de trasplante de células (Wei *et al.* 2005).

Las células madre pluripotentes inducidas (iPSCs)

Las células adultas (somáticas) pueden ser reprogramadas a un embrión usando la transferencia nuclear de células somáticas (Kim 2010). Como se muestra en la Figura 3 diferentes tipos de células adultas pueden ser genéticamente “reprogramadas” a células madre embrionarias al introducir factores de transcripción utilizando virus, plásmidos y proteínas (Yamanaka 2006, Takahashi *et al.* 2007, Yu 2007). Este tipo de células podría utilizarse para el estudio de la patogénesis de enfermedades y también para la terapia basada en células madre para la regeneración (Wu & Hochedlinger 2011). Este tipo de células madre pluripotentes inducidas tienen muchas de las características de las ESCs, incluyendo la pluripotencia y la capacidad de generar quimeras de línea germinal de ratón (Okita *et al.* 2007). Otro punto importante es que este tipo de células madre dan origen a tumores que pueden ser mortales. Nuevas corrientes científicas siguen surgiendo para el desarrollo de las células madre pluripotenciales inducidas. Una de las ventajas de la tecnología de iPSC es su simplicidad y reproducibilidad. Muchos laboratorios empezaron a explorar los mecanismos subyacentes, modificar los procedimientos para obtener nuevos resultados.

Aunque se pueden generar iPSCs, la eficiencia del proceso sigue siendo baja: típicamente menos del 1% de fibroblastos transfectados llega a ser iPSCs (Yamanaka 2009). Es por eso que actualmente en muchos centros de investigación se están diseñando y modificando los protocolos actuales para obtener mejores resultados. A pesar de esta desventaja, actualmente se están proponiendo nuevos métodos con el uso de efectores

parecidos a activadores de transcripción (TALE) provenientes de bacterias como una herramienta para diseñar factores de transcripción (TF) que se pueden utilizar en la regulación de potenciadores de genes y la reprogramación. Existen TF de las ESCs que han sido utilizados para reprogramar células somáticas a un estado pluripotente (Tabla 1). Algunos TF potencian al locus *Pou5f1* (*Oct4*) induciendo a cambios epigenéticos, en su expresión, y sustituye exógenos *OCT4* en la reprogramación de fibroblastos de embriones

de ratón (MEFs) a iPSCs. Del mismo modo, los TF dirigidos a *Nanog* sirven para reprogramar células madre del epiblasto a iPSCs. Por el contrario, represores de TF dirigidos a los mismos elementos genéticos inhiben la expresión de estos loci, y bloquean eficazmente la reprogramación (Gao *et al.* 2013). Se debe tener en cuenta que el potencial de una reprogramación de fibroblastos murinos primarios en iPSCs disminuye a medida que encaminan a la senescencia (Utikal *et al.* 2012).

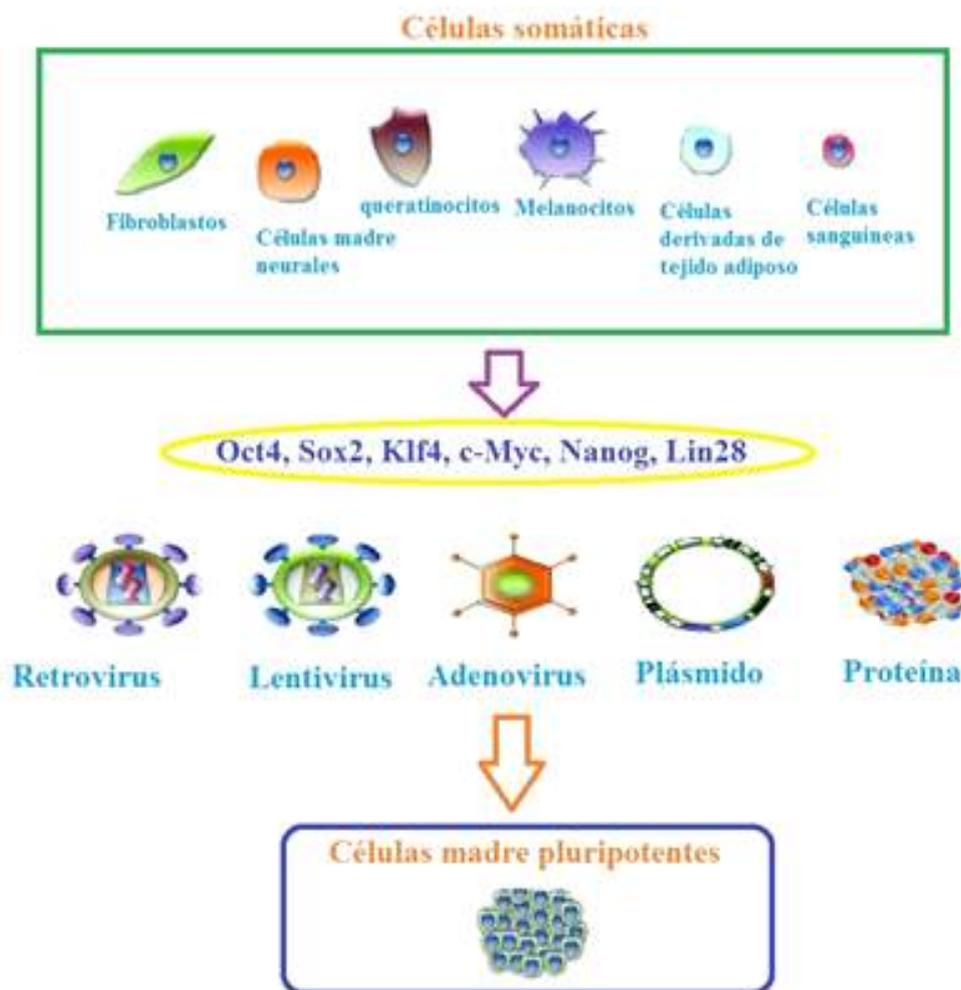


Figura 3. Diferentes células somáticas y los métodos de liberación de factores de transcripción para la generación de células madre pluripotentes (iPSCs). Los virus han sido hasta ahora el mejor mecanismo de introducción de estos factores de transcripción.

Tabla 1. Factores de transcripción de las ESCs y las iPSCs.

Factores de transcripción de las ESCs	Factores de transcripción de las iPSCs
Brachyury, Pax2, EOMES, Pax6, FoxC2, PRDM14, FoxD3, Rex-1/ZFP42, FoxF1, SALL1, FoxH1, SALL4, SOX2, KLF5, SOX7, c-Maf, SOX15, Max, SOX17, MEF2C, activadores de STAT, MIXL1, inhibidores de STAT, MTF2, STAT3, c-Myc, SUZ12, Nanog, TBX6, activadores de NFkB/IkB, TCF-3/E2A, inhibidores de NFkB/IkB, THAP11, NFkB1, UTF1, NFkB2, WDR5, Oct-3/4, WT1, Otx2, ZNF206, p53, ZNF281.	KLF2, SOX1, KLF4, SOX2, c-Maf, SOX3, c-Myc, SOX15, Nanog, SOX18, Oct-3/4, TBX18, p53

Riesgos de tumorigénesis en las iPSCs

Aunque se pueden generar iPSCs, la eficiencia del proceso sigue siendo baja, típicamente menos del 1% de fibroblastos transfectados llega a ser iPSCs (Yamanaka 2009). Además hay una baja eficiencia en la diferenciación en estudios con células neurales, además de cierta inclinación a la heterogeneidad fenotípica y la inestabilidad (Parsons *et al.* 2013, Snyders *et al.* 2009). Por lo tanto un obstáculo para la aplicación clínica de iPSCs es el riesgo de tumorigénesis. Recientemente, se ha informado de que las iPSCs pueden ser generadas sin el uso de solo c-Myc (factor de transcripción tumorigénico) (Takahashi *et al.* 2007). Por ejemplo se ha creado un método para generar iPSCs humanas a partir de células derivadas de la orina libres de virus, sin suero y sin el oncogén c-Myc, donde presentaron una alta eficiencia al ser reprogramadas, lo que ofrece ventajas con respecto a las ESCs. Es por eso que el establecimiento de estrategias de reprogramación basados en proteínas o en tipos de ARN (microARNs) ayudará a generar iPSCs humanas sin alteraciones genéticas que dificultarían la aplicación clínica.

El rol de Prdms en células madre embrionarias (ESC) y células pluripotentes inducidas (iPSC)

En cultivo, las células madre deben mantener activamente un estado pluripotente, y deben

reprimir simultáneamente rutas metabólicas que comprometan la diferenciación en tipos celulares específicos. Tales funciones son llevadas a cabo por Prdm1 y Prdm14. La formación de las células germinales embrionarias (EGCs) requiere la actividad de Prdm14 y la pérdida simultánea de la expresión de Prdm1 (Ancelin *et al.* 2006, Durcova-Hills 2008).

Las células somáticas, tales como los fibroblastos adultos, también pueden ser convertidas *in vitro* en células madre con características de ESC en cultivo. Estas células madre pluripotentes inducidas (iPSC) requieren un conjunto de factores como Sox2, Oct4 (Pou5f1; POU dominio, factor de transcripción 1 clase 5), Myc y Klf4 (factor 4 similar a Kruppel). En particular, Prdm14 también tiene actividad de inducción a iPSC, y puede aumentar la actividad de conjunto de factores de transcripción, incluso si c-Myc o Klf4 no se incluyen en los protocolos (Pan & Thomson 2007, Chia 2010).

Las proteínas Prdm pertenecen a la familia de proteínas del dominio SET implicado en la regulación de la expresión génica. Aunque algunos miembros PRDM poseen actividad histona metiltransferasa, los mecanismos moleculares por los que los otros miembros ejercen regulación transcripcional aún no se han descrito. Se ha encontrado que Prdm5 está altamente expresado en células madre

embrionarias de ratón (mESC). Mediante la combinación de la proteómica y las tecnologías se ha logrado determinar que Prdm5 es prescindible para el mantenimiento de mESC, teniendo una participación directamente a las regiones genómicas que intervienen en el desarrollo embrionario temprano y afecta a la expresión de un subconjunto de reguladores de desarrollo durante la diferenciación celular. Es importante destacar que Prdm5 interactúa con CTCF, cohesina y el factor de transcripción de la ARN polimerasa III (TFIIIC) y ocupa conjuntamente loci genómicos (Galli 2013). Por el contrario tanto *Prdm1* y *Prdm14* no participan en este tipo de transformación en cultivo de células somáticas de ratón (Chu

2011). No obstante, una vez convertidas estas células a un estado de pluripotencia requieren de Prdm14 para mantener su estado (Hohenauer & Moore 2012).

Similitudes y diferencias entre las ESCs y iPSC

La inducción de la pluripotencia por factores de transcripción se ha convertido en un método común para producir células madre pluripotentes. Grandes avances se han hecho en la comprensión del mecanismo por el cual esto ocurre, en particular en términos de eventos de regulación de la transcripción y cambios en la estructura de cromatina, a través de mecanismos epigenéticos. Sin embargo,

Tabla 2. Diferencias entre las células madre embrionarias y células madre pluripotentes inducidas tanto en ratones como en humanos (Plath & Lowry 2011).

Características	ESCs vs. iPSCs (ratón)	ESCs vs. iPSCs (humanos)
Expresión de mRNA	En el pasaje temprano las iPSCs son diferentes a las ESCs ya que reflejan la expresión de las células de origen.	En el pasaje temprano iPSCs son diferentes a las ESCs, reflejando la expresión de las células diana, pero en el pasaje tardío las iPSCs se aproximan a parecerse a las ESCs en sus perfiles de expresión génica.
Expresión de miRNA	miR-302, 367	Salvo excepciones no se han encontrado diferencias consistentes a través de múltiples líneas de iPSC y ESC.
Expresión de lncRNA	No determinada	Se han descrito diferencias, y algunos tienen funciones en la reprogramación.
Modificaciones de Histona	Modificaciones probadas (H3K4me3 y H3K27me3) parecen ser indistinguibles entre las ESCs y iPSCs	Dos modificaciones (H3K4me3 y H3K27me3) parecen que son idénticas; H3K9me3 es diferente.
Metilación de ADN	Distinta en el paso temprano, en el pasaje tardío es casi idéntica.	Se han descrito algunas diferencias.
Estado de activación del cromosoma X	Tanto las iPSCs y ESCs son XaXa.	Las ESCs son en su mayoría XaXa, pero va depender de las condiciones de cultivo.
Metabolismo	Divergen en algunas rutas metabólicas	Idénticos o casi idénticos.

H3K4me3, trimetilación de la lisina 4 de la histona H3; lncRNA, ARN largo no codificante; miRNA, microARN; Xa, Cromosoma X activado; Xi, Cromosoma X inactivado.

sólo una pequeña parte del panorama ha sido dilucidado. Una comprensión del mecanismo de reprogramación de pluripotencia tendrá importantes implicaciones para la mejora de la eficiencia y la calidad de la reprogramación y la promoción de la aplicación terapéutica de células madre pluripotentes inducidas (Plath & Lowry 2011), especialmente en la diferencia entre ambos tipos de células (Tabla 2) que son estudiadas a partir de humanos y de modelos experimentales como ratón.

CONCLUSIÓN

Las iPSCs al igual que las ESCs dan lugar *in vitro* a todos los tipos de tejidos en un organismo maduro debido a su pluripotencia, cuyo estado depende de un proceso que involucra un conjunto de factores de transcripción que controlan la expresión de genes que mantienen el estado pluripotente, tales como Oct-3/4, KLF4, Sox2, y c-Myc que son esenciales para reprogramar una célula somática nuevamente a un estado pluripotente inducida (iPSCs). La búsqueda de nuevos factores de transcripción claves en el mantenimiento de la pluripotencia es esencial para obtener iPSCs con aplicaciones futuras en la práctica clínica, debido a que el uso de las ESCs implica el problema ético.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ancelin, K. 2006. Blimp1 associates with Prmt5 and directs histone arginine methylation in mouse germ cells. *Nature Cell Biology*, 8: 623-630.
- Carpenter, M. K.; Rosler, E. & Rao, M. S. 2003. Characterization and differentiation of human embryonic stem cells. *Cloning Stem Cells*, 5: 79-88.
- Chia, N. 2010. A genome-wide RNAi screen reveals determinants of human embryonic stem cell identity. *Nature*, 468: 316-320.
- Chu, L. F. 2011. Blimp1 expression predicts embryonic stem cell development in vitro. *Current Biology*, 21: 1759-1765.
- Durcova-Hills G. 2008. Reprogramming primordial germ cells into pluripotent stem cells. *PLoS ONE*, 3: e3531.
- Evans, M. J. & Kaufman, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292: 154-156.
- Galli, G. G. 2013. Genomic and proteomic analyses of Prdm5 reveal interactions with insulator binding proteins in embryonic stem cells. *Molecular Cell Biology*, 33:4504-4516.
- Gao, X.; Yang, J.; Tsang, J.C.; Ooi, J.; Wu, D. & Liu, P. 2013. Reprogramming to pluripotency using designer TALE Transcription Factors Targeting Enhancers. *Stem Cell Reports*, 1(Sup. 2): 183-197.
- Hohenauer, T. & Moore, A.W. 2012. The Prdm family: expanding roles in stem cells and development. *Development*. 139 (sup. 13): 2267-2282.
- Horii, T.; Yanagisawa, E.; Kimura, M.; Morita, S. & Hatada, I. 2010. Epigenetic differences between embryonic stem cells generated from blastocysts developed in vitro and in vivo. *Cell Reprogramming*, 12:551-563.
- Hosseinpour, B. 2013. Predicting distinct organization of transcription factor binding sites on the promoter regions; a new genome-based approach to expand human embryonic stem cell regulatory network. *Gene*, 531: 212-219.
- Huntriss, J. & Picton, H.M. 2008. Stability of genomic imprinting in embryonic stem cells: lessons from assisted reproductive technology. *Current Stem Cell Research Therapy*, 3: 107-116.
- Kim, Y.H. 2010. Differential regulation of proliferation and differentiation in neural precursor cells by the Jak pathway. *Stem Cells*, 28(Sup. 10):1816-1828.
- Lim, L.S.; Loh, Y. H; Zhang, W.; Li, Y. & Chen X. 2007. Zic3 is required for maintenance of pluripotency in embryonic stem cells. *Molecular Biology Cell*, 18(sup. 4): 1348-1358.
- Keenen, B. & de la Serna IL. 2009. Chromatin

- remodeling in embryonic stem cells: regulating the balance between pluripotency and differentiation. *Journal of Cell Physiology*, 219 (Sup.1):1-7.
- Martin, G. 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78: 634-638.
- Ng, J.H.; Heng, J.C.; Loh, Y. H. & Ng, H.H. 2008. Transcriptional and epigenetic regulations of embryonic stem cells. *Mutation Research*, 647 (Sup. 1-2): 52-58.
- Okita, K.; Ichisaka, T. Yamanaka, S. 2007. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*, 448:313-317.
- Orkin, S.H.; Wang, J.; Kim, J.; Chu, J.; Rao, S. & Lévassieur, D.N. 2008. The transcriptional network controlling pluripotency in ES cells. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 73: 195-202.
- Pan, G. & Thomson, J.A. 2007. Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. *Cell Research*, 17 (sup. 1): 42-49.
- Pannetier, M. & Feil, R. 2007. Epigenetic stability of embryonic stem cells and developmental potential. *Trends in Biotechnology*, 25: 556-562.
- Parsons, X. H. 2013. Human Stem Cell Derivatives Retain More Open Epigenomic Landscape When Derived from Pluripotent Cells than from Tissues. *Journal Regenerative Medicine*, 1: 23-33.
- Plath K. & Lowry, W.E. 2011. Progress in understanding reprogramming to the induced pluripotent state. *Nature Reviews Genetics*, 12: 253-265.
- Prelle, K.; Zink, N. & Wolf, E. 2002. Pluripotent stem cells--model of embryonic development, tool for gene targeting, and basis of cell therapy. *Anatomy Histology Embryology*, 31(Sup. 3):169-186.
- Saladi, S.V. & de la Serna, I. L. 2010. ATP dependent chromatin remodeling enzymes in embryonic stem cells. *Stem Cell Reviews and reports*, 6: 62-73.
- Snyders, S.; Henkens, T.; De Rop, E.; Vinken, M.; Fraczek, J.; De Kock, J. & De Prins, E. 2009. Role of epigenetics in liver-specific gene transcription, hepatocyte differentiation and stem cell reprogramming. *Journal of Hepatology*, 51: 187-211.
- Takahashi, K.; Okita, K.; Nakagawa, M. & Yamanaka, S. 2007. Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nature Protocols*, 2: 3081-3089.
- Thomson, J.A.; Itskovitz-Eldor, J.; Shapiro, S.S.; Waknitz, M.A.; Swiergiel, J.J. & Marshall, V.S. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282: 1145-1147.
- Utikal, J.; Polo, J.M.; Stadtfeld, M.; Maherali, N.; Kulalert, W. & Walsh, R.M. 2012. Immortalization eliminates a roadblock during cellular reprogramming into iPS cells. *Nature*, 460: 1145- 1148.
- Yamanaka, S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(Sup4):663-676.
- Yamanaka, S. 2009. A fresh look at iPS cells. *Cell*, 137(Sup. 1):13-17.
- Yamanaka, S. 2012. Induced pluripotent stem cells: past, present, and future cell stem cell perspective. 10.1016/j.stem.2012.05.005.
- Yu, J. 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 318: 1917-1920.
- Wei, H.; Juhasz, O.; Li, J.; Tarasova, Y.S. & Boheler, K.R. 2005. Embryonic stem cells and cardiomyocyte differentiation: phenotypic and molecular analyses. *Journal of Cell Molecular Medicine*, 9(sup. 4): 804-817.
- Wu, S.M. & Hochedlinger, K. 2011. Harnessing the potential of induced pluripotent stem cells for regenerative medicine. *Nature Cell Biology*, 13: 497-505.

Received November 16, 2014.
Accepted June 22, 2015.