## [Highly efficient and rapid generation of human pluripotent stem cells by chemical reprogramming](https://www.cell.com/cell-stem-cell/fulltext/S1934-5909(23)00069-3), 2023

Problema del paper anterior: repogramación química caracterizada por una cinética lenta. Llevan a cabo la detección de refuerzos de moléculas pequeñas y la optimización sistemática de la condición original, para establecer un protocolo de reprogramación sólido y químicamente definido, que acorta en gran medida el tiempo de inducción de aproximadamente 50 días a un mínimo de 16 días y permite una generación altamente reproducible y eficiente de hCiPSC de los 17 donantes analizados. Esto es así ya que el proceso de reprogramación es más directo al promover la proliferación celular y las actividades metabólicas de fosforilación oxidativa en la etapa temprana. El análisis de secuenciación de ARN unicelular (scRNA-seq) reveló un proceso de reprogramación más directo y rápido en el que las primeras células intermedias aumentaron su actividad metabólica de proliferación y fosforilación oxidativa (OXPHOS).

El análisis de agrupamiento no supervisado identificó eventos moleculares importantes que ocurrieron durante la reprogramación de células somáticas humanas en hCiPSC, que se caracteriza por la regulación negativa de los genes somáticos, la activación transitoria de los genes de desarrollo embrionario y la activación de genes de pluripotencia, respectivamente.

Para comparar el protocolo optimizado con el protocolo original, integramos nuestros datos de scRNA-seq publicados anteriormente con el generado utilizando el protocolo optimizado. **Nuestro estudio anterior mostró que la reprogramación química pasa por cuatro etapas secuenciales: un estado de tipo epitelial, un estado plástico intermedio, un estado de endodermo extraembrionario (tipo XEN) y un estado de pluripotencia ingenuo. De manera similar, la reprogramación siguiendo el protocolo optimizado también mostró los estados correspondientes, excepto el estado similar a XEN.** Curiosamente, encontramos una rápida activación de genes clave de pluripotencia, lo que sugiere que se mejoró la cinética de reprogramación.

***Cambios en el protocolo***

Primero, optimizamos nuestro método de reprogramación original para una condición químicamente definida y libre de suero. Para la etapa I, descubrimos que el suplemento nutricional BMP4 y B27 puede reemplazar el suero y convertir las células estromales derivadas del tejido adiposo adulto humano (hADSC) en células de tipo epitelial, aunque de manera menos eficiente ( Figura S1 A). Sobre esta base, el análisis químico identificó que una combinación de JNKIN8 (inhibidor de la quinasa N-terminal c-Jun), VTP50469 (inhibidor de la interacción Menin-MLL) y inhibidor de la quinasa AKT (inhibidor de la quinasa Akt) promueve en gran medida la aparición de células de tipo epitelial. colonias que expresaron LIN28A ( Figuras 1 A, 1B, S1 A y S1B), un marcador clave que identificamos previamente para la etapa I.6La eliminación de LIN28A perjudicó la generación de células de tipo epitelial en la etapa I y las hCiPSC posteriores ( Figuras S1 D – S1G). Para la etapa II, el ajuste de la concentración de CHIR99021 y el suplemento nutritivo B27 reemplazó efectivamente al suero ( Figura 1 C), lo que permitió que todo el sistema de reprogramación estuviera libre de suero.

En segundo lugar, dado que la etapa II es la parte que consume más tiempo y toma aproximadamente 20 días, analizamos aún más los moduladores epigenéticos e identificamos que la combinación del inhibidor de DOT1L EPZ5676 y el inhibidor de SAHasa DZNep pudo acortar la etapa II a 12 días con una generación exitosa de hCiPSC ( Figura 1 D). Además, descubrimos que la adición de EPZ5676 y DZNep a la etapa II condujo a que el tratamiento en etapa III (de 8 a 12 días de duración) fuera innecesario para inducir hCiPSC ( Figura 1 E) y, por lo tanto, el protocolo original de cuatro etapas se acortó por 16 a 20 días y simplificado en tres etapas. Una evaluación adicional identificó una combinación de VTP50469, inhibidor de la quinasa AKT, CX4945 (inhibidor de la quinasa CK2) y 5-yodotubercidina (inhibidor de la adenosina quinasa) que aumentó drásticamente la eficiencia de reprogramación del 0,016 % al 8,75 % ( Figura 1 E). Descubrimos que esta condición optimizada era menos eficiente en la reprogramación de fibroblastos de piel humana adulta (hASF) en células de tipo epitelial en la etapa I ( Figura S1 C). Para reprogramar eficientemente los hASF, seleccionamos moléculas pequeñas dirigidas a modificadores epigenéticos e identificamos que el inhibidor de histona metiltransferasa SETD2, SETD2-IN-1, promovió la inducción de colonias de tipo epitelial a partir de hASF en la etapa I ( Figura S1 C) seguida de la generación de hCiPSC en más de 8 veces ( Figura 1 F). Además, SETD2-IN-1 también promovió la inducción de hCiPSC a partir de hADSC ( Figura 1 G). En conjunto, estas optimizaciones formaron un protocolo mejorado de tres etapas definido químicamente que induce hCiPSC ( Figuras 1 L, 1M y S1 J), que aceleró notablemente el proceso de reprogramación y mejoró en gran medida la eficiencia de la reprogramación.

**Las hCiPSC se parecían a las hESC en los patrones de expresión genética global ( Figuras 2 D, S2 D y S2E), metilación global del ADN, en particular loci genéticos de OCT4 , DPPA4 y NANOG ( Figuras 2 E y 2F) y las modificaciones globales H3K4me3 y H3K27me3. ( Figuras S2 F – S2H). Además, el ensayo de formación de teratoma in vitro y del cuerpo embrioide in vitro mostró que las hCiPSC se diferencian en tipos de células representativos de las tres capas germinales ( Figuras 2 G y 2H). En conjunto, estos resultados demuestran que las hCiPSC establecidas mediante este protocolo de reprogramación química cumplen los criterios de células madre pluripotentes.**

Datos de secuenciación de RNA-seq (bulk), WGBS (Secuenciación de bisulfito del genoma completo), CUT & Tag (Escisión bajo objetivos y etiquetado, elaboración de perfiles de cromatina. Cleavage Under Targets and Tagmentation) aplica una transposasa pAG-Tn5 para escindir y “etiquetar” simultáneamente la cromatina unida a anticuerpos con adaptadores de secuenciación. El ADN etiquetado se amplifica selectivamente mediante PCR y se utiliza para NGS), scRNA-seq, scATAC-seq: Archivo de secuencia del genoma humano: [HRA003013](https://ngdc.cncb.ac.cn/gsa-human/browse/HRA003013)

Los datos de secuencia de ARN unicelular se asignaron al genoma de referencia humano hg19 utilizando Cell Ranger v3.1.0. Las matrices de expresión de todas las muestras se cargaron en el entorno R utilizando la función Read10X del paquete R Seurat.36Luego se realizó el control de calidad para eliminar las células con recuentos totales de UMI <1000, número de genes <500 o porcentaje de recuento de UMI mitocondrial> 20. Los recuentos de UMI se normalizaron utilizando la función NormalizeData con parámetros predeterminados. Luego, realizamos una canalización de preproceso estándar de Seurat ejecutando las funciones FindVariableFeatures, ScaleData, RunPCA, FindNeighbors y FindClusters en orden con los parámetros predeterminados. Se eliminaron los grupos con un recuento medio de UMI bajo (<1500).

Para identificar las células que se convirtieron en hCiPSC con éxito en cada momento, realizamos un análisis de Waddington-OT para construir una trayectoria unicelular utilizando el módulo wot de Python.37Seguimos el proceso de análisis WOT para calcular la probabilidad de transición hacia hCiPSC de cada celda. Luego anotamos las celdas en la trayectoria correcta de acuerdo con la distribución de esta probabilidad entre los grupos de celdas, que siguió una estrategia similar a la de nuestro artículo anterior.6

Utilizamos la función FindMarkers para identificar genes expresados ​​diferencialmente (DEG) entre grupos de células. El análisis GO se realizó a esos DEG utilizando el paquete R clusterProfiler.35

Hay 77 muestras de diferentes líneas celulares y estados:

* **hADSCs-0618**: Línea celular de adipocitos.
  + [HRR751042](https://ngdc.cncb.ac.cn/gsa-human/browse/runDetail/HRR751042), RNA-seq of hADSCs-0618:
  + [HRR751053](https://ngdc.cncb.ac.cn/gsa-human/browse/runDetail/HRR751053), RNA-seq of hCiPSCs-0618-1S#
  + [HRR751054](https://ngdc.cncb.ac.cn/gsa-human/browse/runDetail/HRR751054), RNA-seq of hCiPSCs-0618-8S#
  + [HRR751062](https://ngdc.cncb.ac.cn/gsa-human/browse/runDetail/HRR751062), WGBS of hCiPSCs-0618-1S#
  + [HRR751063](https://ngdc.cncb.ac.cn/gsa-human/browse/runDetail/HRR751063), WGBS of hCiPSCs-0618-8S#
  + scATAC-seq of Stage II-0618, HRI277488
  + scRNA-seq of StageI\_Day0.5-0618, HRI277488
  + scRNA-seq of StageI\_Day2-0618, HRI277488
  + scRNA-seq of StageI\_Day4-0618, HRI277488
  + scRNA-seq of StageI\_Day8-0618, HRI277488
  + scRNA-seq of StageII\_Day4-0618, HRI277488
  + scRNA-seq of StageII\_Day8-0618, HRI277488
  + scRNA-seq of StageIII\_Day0.33-0618, HRI277488
  + scRNA-seq of StageIII\_Day0.67-0618, HRI277488
  + scRNA-seq of StageIII\_Day1-0618, HRI277488
  + scRNA-seq of StageIII\_Day2-0618, HRI277488
  + scRNA-seq of StageIII\_Day4-0618, HRI277488
  + scRNA-seq of StageIII\_Day6-0618, HRI277488
  + scRNA-seq of StageIII\_Day8-0618, HRI277488
  + scRNA-seq of StageIII\_Day12-0618, HRI277488
  + scRNA-seq of hCiPSCs-0618: pluripotente
  + hADSCs-0618\_H3K4me3\_rep1, HRI277488
  + hADSCs-0618\_H3K4me3\_rep2, HRI277488
  + hADSCs-0618\_H3K27me3\_rep1, HRI277488
  + hADSCs-0618\_H3K27me3\_rep2, HRI277488
  + hCiPSCs-0618-1S#\_H3K4me3\_rep1 HRI277488
  + hCiPSCs-0618-1S#\_H3K4me3\_rep2 HRI277488
  + hCiPSCs-0618-1S#\_H3K27me3\_rep1 HRI277488
  + hCiPSCs-0618-1S#\_H3K27me3\_rep2 HRI277488
* hADSCs-0605:
  + HRI277487, RNA-seq of hADSCs-0605
  + RNA-seq of hCiPSCs-0605-1S# HRI277487
  + RNA-seq of hCiPSCs-0605-5S# HRI277487
* hADSCs-0809
  + HRI277489, RNA-seq of hADSCs-0809
  + hADSCs-0809\_H3K4me3\_rep1, HRI277489
  + hADSCs-0809\_H3K4me3\_rep2, HRI277489
  + hADSCs-0809\_H3K27me3\_rep1, HRI277489
  + hADSCs-0809\_H3K27me3\_rep2, HRI277489
  + RNA-seq of hCiPSCs-0809-1S# HRI277489
  + hCiPSCs-0809-1S#\_H3K4me3\_rep1 HRI277489
  + hCiPSCs-0809-1S#\_H3K4me3\_rep2 HRI277489
  + hCiPSCs-0809-1S#\_H3K27me3\_rep1 HRI277489
  + hCiPSCs-0809-1S#\_H3K27me3\_rep2 HRI277489
* hADSCs-1009
  + HRI277490, RNA-seq of hADSCs-1009
  + RNA-seq of hCiPSCs-1009-1S# HRI277490
* hADSCs-1013
  + HRI277491, RNA-seq of hADSCs-1013
  + hADSCs-1013\_H3K4me3\_rep1, HRI277491
  + hADSCs-1013\_H3K4me3\_rep2, HRI277491
  + hADSCs-1013\_H3K27me3\_rep1, HRI277491
  + hADSCs-1013\_H3K27me3\_rep2, HRI277491
  + WGBS of hADSCs-1013, HRI277491
  + RNA-seq of hCiPSCs-1013-2S# HRI277491
  + WGBS of hCiPSCs-1013-2S# HRI277491
  + hCiPSCs-1013-1S#\_H3K4me3\_rep1 HRI277491
  + hCiPSCs-1013-1S#\_H3K4me3\_rep2 HRI277491
  + hCiPSCs-1013-1S#\_H3K27me3\_rep1 HRI277491
  + hCiPSCs-1013-1S#\_H3K27me3\_rep2 HRI277491
* hADSCs-PT5006
  + HRI277492, RNA-seq of hADSCs-PT5006
  + RNA-seq of hCiPSCs-PT5006-1S# HRI277492
* hASFs-0605: fibroblastos
  + RNA-seq of hASFs-0605, HRI277493
  + RNA-seq of hCiPSCs-0605A-1S# HRI277493
* hASFs-3595
  + RNA-seq of hASFs-3595, HRI277494
  + RNA-seq of hCiPSCs-3595-1S# HRI277494
* hASFs-38040
  + RNA-seq of hASFs-38040 HRI277495
  + RNA-seq of hCiPSCs-38040-2S# HRI277495
  + WGBS of hCiPSCs-38040-2S# HRI277495
* H9
  + RNA-seq of H9 HRI368146
  + H9\_H3K4me3\_rep1 HRI368146
  + H9\_H3K4me3\_rep2 HRI368146
  + H9\_H3K27me3\_rep1 HRI368146
  + H9\_H3K27me3\_rep2 HRI368146
* H1
  + RNA-seq of H1 HRI277486
  + H1\_H3K4me3\_rep1 HRI277486
  + H1\_H3K4me3\_rep2 HRI277486
  + H1\_H3K27me3\_rep1 HRI277486
  + H1\_H3K27me3\_rep2 HRI277486

Muestras comunes a los dos papers:

* Células madre mesenquimales derivadas de adipocitos humano adulto (0618)
* Fibroblastos dérmicos humano adulto (0605)
* H1