کاربرد سلول‌های پرتوان بنیادی القایی اختصاصی بیمار از طریق برنامه‌ریزی مجدد ژنتیکی سلول‌های سوماتیک در درمان بیماری‌های نورودژنراتیو

Application of Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells Produced by Somatic Cells Reprogramming for Treatment of Neurodegenerative Diseases

سیدمصطفی مدرس موسوی[۱،۲]، امیر قائمی[۱،۳]، طاهره قدیری[۱،۴]، شاهین محمد صادقی[۵]

۱. مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفا، تهران، ایران.
۲. دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.
۳. گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران.
۴. دانشکده فناوریهای نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
۵. دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

Sayed Mostafa Modarres Mousavi[1,2], Amir Ghaemi[1,3], Tahere Ghadiri[1,4], Shahin Mohammad Sadeghi[5]

1. Shefa Neuroscience Research Center, Tehran, Iran.
2. Shiraz University, Shiraz, Iran.
3. Department of Biotechnology, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran.
4. School of Advanced Medical Technology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
5. Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

اطلاعات مقاله

دریافت: ۲۳ مهر ۱۳۹۱

پذیرش: ۳۰ آبان ۱۳۹۱

کلید واژه:

سلول های پرتوان بنیادی القایی،
سلول‌های بنیادی چندتوان،
بیماری های نورودژنراتیو،
مرگ سلولی.

چکیده

مقدمه بیماری های نورودژنراتیو گروهی از بیماری های حاد و یا مزمن می باشند که بسته به عامل و یا شرایط بیماری باعث از بین رفتن سلول های نورون و گلیا در نقاط مختلف مغز و نخاع شده و هنوز به علت عدم شناخت کامل این عوامل و شرایط دخیل در آنها، درمان قطعی برای آنها وجود ندارد. ضمن اینکه معمولا مدل های قابل اعتمادی جهت بررسی این بیماری های نورودژنراتیو که اختصاصی بیمار باشد در دسترس نمی باشند. اگرچه در سال های گذشته روش های درمانی جدیدی همچون درمان از طریق سلول های بنیادی جنینی و بالغ مطرح شده اند اما بعلت محدودیت هایی نظیر مشکل بودن نگهداری سلول های بنیادی جنینی و تهاجمی بودن روش های استخراج سلول های بنیادی بالغ و عدم قدرت تمایز آنها به تمامی رده های سلولی در سالهای اخیر روش جدید تولید سلول های پرتوان بنیادی القایی از طریق برنامه ریزی مجدد ژنتیکی سلول های سوماتیک در مطالعات بیماری های نورودژنراتیو به کمک محققان آمده و منجر به تولید سلول های پرتوان بنیادی القایی اختصاصی این بیماریها گردیده است. **نتیجه گیری** در این زمینه تا به حال محققان اقدام به تولید سلول های پرتوان بنیادی القایی اختصاصی بیماران مبتلا به آمیولترال اسکلروزیس و پارکینسون نموده و شرایط را برای تمایز آنها در محیط آزمایشگاهی به سمت سلول های نورون و گلیا فراهم نموده اند. این روش امید به درمان این بیماریها را در آینده دوباره زنده کرده است.

Article info:

Received: 14 Oct. 2012

Accepted: 20 Nov. 2012

Key words:
ips Cells,
Multipotent Stem Cells,
Neurodegenerative Diseases,
Cell Death.

ABSTRACT

Introduction Neurodegenerative diseases, depending on the cause and condition of disease, destroy neuronal and glial cells at different regions of the brain and the spinal cord. Due to unknown pathogenesis of these diseases, definite treatment is still not available. Furthermore, there is no reliable patient-specific model for experimental and clinical investigations. Despite emerging of new therapeutic methods such as embryonic and adult stem cell therapies in last decades, difficulty of maintaining embryonic stem cells for a long duration, aggressive process of adult stem cells extraction as well as difficulties to differentiation to all variety of cell lines, limited the usage of these techniques for treatment of the patients. **Conclusion** Novel method of induced Pluripotent Stem (iPS) cells production by somatic cells reprogramming may be useful for the treatment of neurodegenerative diseases. The investigators succeed to produce reliable patient-specific iPS cells models for some neurodegenerative diseases such as amyotrophic lateral sclerosis and Parkinson disease.

• نویسنده مسئول:
شاهین محمد صادقی
آدرس الکترونیکی: drshmsadeghi@gmail.com

* Corresponding Author:
Shahin Mohammad Sadeghi
E-mail: drshmsadeghi@gmail.com

مقدمه

کاربرد سلول های بنیادی در درمان بعضی از بیماریها تا حدودی شناخته شده است با این حال استفاده از این روش دارای محدودیت هایی می باشد. از مشکلات موجود می توان به هزینه های سنگین نگهداری سلول های بنیادی جنینی، مباحث اخلاقی در ارتباط با سلول های بنیادی جنینی، تهاجمی بودن روش های جداسازی سلول های بنیادی بالغ از انسان و تمایز به رده های سلولی خاص اشاره داشت. در سال های اخیر روش جدیدی با عنوان برنامه ریزی مجدد ژنتیکی سلول ها معرفی شده است که در طی این روند به طرق مختلف سلول های سوماتیک را به رده ی سلول های پرتوان بنیادی القایی تبدیل می نمایند، همچنین سلول های پرتوان توانایی تمایز به انواع رده های سلولی را نیز دارا هستند (۶ -۱).

از طرفی بیماری های نورودژنراتیو به گروهی از بیماری ها اطلاق می شود که به دو صورت حاد یا مزمن بروز نموده و بسته به شرایط بیماری و عامل بیماری، می توانند سلول های عصبی و گلیا در مغز و طناب نخاعی را صدمه زده و در نهایت از بین ببرند. در موارد حادی مانند ترومای منجر به ایسکمی و یا آسیب طناب نخاعی، انواع مختلفی از نورون ها و سلول های گلیا در محدوده مشخصی از مغز و در مدت زمان کوتاهی می میرند. در بیماریهای نورودژنراتیو مزمن شایع نظیر پارکینسون نورون های دوپامینرژیک و در آمیوتروفیک لترال اسکلروزیس نورون های حرکتی در طی یک مدت زمان طولانی که معمولا چندین سال طول می کشد، دچار مرگ سلولی می شوند. در اکثر این بیماریها درمانی وجود ندارد. جایگزینی آنزیم های خاص، جراحی و پیوند سلولهای بنیادی خونساز روش های پیشنهادی درمانی در بعضی بیماریها می باشد که البته هیچ یک از آنها درمان قطعی نمی باشند (۵ ،۳ -۱).

در سال های اخیر پیشرفت دانش سلول های بنیادی نوید بخش ارائه درمانهایی نوین برای بیماریهای نورودژنراتیو با رویکرد تولید سلول های پرتوان بنیادی القایی و به خصوص سلول های پرتوان بنیادی القایی اختصاصی بیماران بوده است (۶ ،۱). در این نوشته با مروری بر روند تولید سلول های پرتوان بنیادی القایی سعی می شود به بررسی امکان استفاده از سلول های پرتوان بنیادی القایی اختصاصی بیمار در درمان بیماری های نورودژنراتیو بپردازیم.

برنامه ریزی مجدد ژنتیکی سلول ها

به چهار طریق مختلف می توان از طریق تکنولوژی برنامه ریزی مجدد ژنتیکی سلول های سوماتیک را به سلول های پرتوان بنیادی القایی تبدیل نمود که این روش ها شامل انتقال هسته سلول های سوماتیک به سلول های اووسیت، القا فاکتورهای ایجادکننده برنامه ریزی مجدد ژنتیکی از طریق ادغام سلولی، وارد کردن فاکتورهای رونویسی دخیل در برنامه ریزی مجدد ژنتیکی به درون کروماتین سلولی و برنامه ریزی مجدد ژنتیکی مستقیم می باشند (۶،۷). اصطلاح پرتوان (Pluripotent) به دسته وسیعی از سلول ها با ظرفیت های عملکردی گسترده اطلاق می گردد که توانایی تبدیل شدن به انواع سلول های سه لایه زایای جنینی شامل اندودرم، مزودرم و اکتودرم را دارا هستند. یک سلول پرتوان به تنهایی قابلیت تبدیل شدن به یک ارگانیسم کامل و تولید تمام سلول های آن ارگانیسم را دارد (۸). در تکنولوژی اخیر مهمترین متغیری که مد نظر قرار می گیرد، نوع سلول مورد استفاده برای پرتوانی است. در مجموع ترکیبی از سه عامل نوع سلول، روش تحویل فاکتور ایجاد کننده پرتوانی به سلول هدف و عامل ایجاد کننده پرتوانی در بالا بردن کیفیت پرتوانی موثر هستند (۲).

مطالعات مربوط به کاربردهای سلول های پرتوان بنیادی القایی اولین تلاشها جهت القای پرتوانی در انسان و موش با استفاده از سلول های فیبروبلاستی صورت گرفت (۹) و بدنبال آن انواعی از سلول های مختلف شامل کراتینوسیت ها، سلول های پیش ساز نورونی، هپاتوسیت ها، سلول های اپیتلیال معده، سلول های بتا پانکراس و سلول های اپیتلیال روده جهت ایجاد پرتوانی مورد استفاده قرار گرفتند (۱۰). در تحقیقات جهت پرتوان نمودن سلول ها وکتورهای ویروسی و یا پلاسمیدی برای بیان و تحویل فاکتورهای ایجاد کننده پرتوانی مورد استفاده قرار می گیرند. در روش‌های جدیدتر به جای وارد کردن فاکتورهای ایجاد کننده پرتوانی از طریق وکتورهای ویروسی یا پلاسمیدی، محصولات پروتئینی آن فاکتورهای نسخه برداری شده را با ایجاد تغییراتی در غشا سلولی، به درون سلول هدایت می نمایند تا از مشکلات تکنیکی استفاده از وکتورهای ویروسی نیز ممانعت به عمل آید. در تازه ترین تکنیک ها از ترکیب فاکتورهای نسخه برداری انواع مختلف ریز مولکول‌ها به عنوان عامل ایجاد کننده پرتوانی استفاده می کنند (۲).

مطالعات انجام شده در این زمینه نشان می دهند که در روند تولید پرتوانی سلول های سوماتیک از طریق برنامه ریزی مجدد ژنتیکی معمولا ابتدا یک مرحله بینابینی از سلول های پرتوان ایجاد شده و سپس سلول های با قابلیت کامل پرتوانی بوجود می آیند. در ارتباط با رده های سلولی که تا حدی پرتوان گردیده اند از رتروویروس ها جهت انتقال فاکتورهای نسخه برداری عامل پرتوانی استفاده گردیده و ژن های داخل سلولی عامل پرتوانی دمتیله شدن ناقصی را نشان می دهند (۹). قسمت جالب توجه این مرحله، فعال شدن ژن هایی اختصاصی همچون Gata6، Sox9 و Pax7 است که در جمعیت سلول های ابتدایی و یا در سلول های کاملا پرتوان شده به هیچ وجه بیان نمی شوند (۱۱). این روند نشان دهنده این است که بیان نابجای این ژن های اختصاصی از روند تبدیل سلول تمایز یافته به سلول پرتوان تا حدودی ممانعت بعمل می آورد و باعث کاهش کیفیت سلول

پرتوان نهایی می شود. بنابراین غیر فعال کردن هر کدام از این ژن ها باعث افزایش کیفیت پرتوانی سلولی می گردد (۱۱). بعلاوه در بعضی مطالعات اثر دمتیله کردن کروماتین به همراه استفاده از فاکتورهای رونویسی، بعنوان تغییرات اپی ژنتیک در برنامه ریزی مجدد سلولی، مورد بررسی قرار گرفته است که باعث بالا بردن کیفیت پرتوانی گردیده است (۱۲).

مطالعات دیگری نشان داده که سلول های تمایز یافته فیبروبلاست مشتق از پوست موش (۱۵-۱۳ ،۹) و انسان (۱۶) می توانند از طریق برنامه ریزی مجدد ژنتیکی به سلول های پرتوان تبدیل شوند که عملکردی مشابه سلول های بنیادی جنینی خواهند داشت. این ویژگی به واسطه ترانسداکشن رتروویروس هایی که فاکتورهای نسخه برداری KLF4, SOX2, OCT4, c-MYC را کد می کنند به داخل سلول های تمایز یافته فیبروبلاست حاصل می‌شود (۱۷).

بعلاوه بعضی از مواد شیمیایی توسط محققین شناسایی شده است که در ترکیبی با تمامی این چهار فاکتور و یا تعدادی از آنها سبب افزایش کیفیت سلوهای پرتوان بنیادی القایی تولید شده ونیز بهبود روند برنامه ریزی مجدد ژنتیکی سلول های تمایز یافته می گردند. مکانیسم عمل این مواد شیمیایی به طور کلی شامل مهار متیل- ترانسفرازهای هیستونی، بکارگیری آگونیست کانال های کلسیمی، مهار متیل ترانسفرازهای ژنومی، مهار هیستون داستیلازها و مهار TGF بتا می باشد. به عنوان مثال زمانی که آگونیست کانال های کلسیمی نوع ال به همراه دو فاکتور,OKT4 KLF4 استفاده می شود، کیفیت سلول های پرتوان شده که با استفاده از سلول های فیبروبلاست جدا شده از موش تولید شده است حدود ۱۵ برابر بیشتر از زمانی بوده است که این دو فاکتور به تنهایی مورد استفاده قرار گرفته بودند و یا زمانی که مهار کننده های هیستون داستیلازها به همراه هر چهار فاکتور فوق به کار برده می شوند، کیفیت پرتوانی مشتق شده از فیبروبلاست های موش ۱۰۰ برابر زمانی است که آن چهار فاکتور به تنهایی مورد استفاده قرار بگیرند و هنگامی که مهار کننده های هیستون داستیلازها به همراه این فاکتورها به جز c-MYC به کار برده می شوند، کیفیت سلول پرتوان شده مشتق از فیبروبلاست های موشی ۵۰ برابر زمانی است که سه فاکتور ,OCT4, SOX2 KLF4 به تنهایی مورد استفاده قرار می گیرند و این شواهد نقش مهم فاکتور c-MYC را نشان می دهد (۱۷).

تولید رده های سلولی پرتوان بنیادی القایی از بیمارانی که دارای تنها یک نقص ژنتیکی می باشند، شاخه دیگری از تکنولوژی برنامه ریزی مجدد ژنتیکی سلول است که قابلیت کار بر روی فنوتیپ بیماری را در محیط آزمایشگاه فراهم کرده و فرصتی برای ترمیم نقص ژنتیکی در محیط آزمایشگاه برای محققان پدید آورده است. ترمیم نقص های ژنتیکی در سلول های پرتوان بستری مناسب برای ترکیب درمانی ترمیم نقص ژنی به همراه جایگزینی سلول در طیف وسیعی از بیماری های ژنتیکی فراهم می آورد که به واسطه توانایی تمایز این سلول ها به سلول های بنیادی پیکری و سلول های بافتی است. در این راستا پارک و همکاران در سال ۲۰۰۸ با استفاده از سلولهای فیبروبلاست پوستی و سلول های مزانشیمی با منشا مغز استخوان جدا شده از بیماران مبتلا به انواع بیماری های ژنتیکی به تولید سلول های پرتوان بنیادی القایی پرداختند. آنها در این تحقیق بیماران مبتلا به هانتینگتون، پارکینسون، دیابت ملیتوس نوع یک، گوشه نوع سه و دیستروفی عضلانی بکر و سندرم هایی همچون سندرم داون و لش نیان سندرم و تریزومی ۲۱ را مورد بررسی قرار دادند. سلول های بنیادی که اختصاصی بیماری می باشند، فرصت بی سابقه ای را جهت بررسی صفات ارثی در طی چند نسل متوالی در آزمایشگاه برای این بیماری ها در اختیار پژوهشگران قرار داده و ابزار مناسبی برای بررسی روند بیماری و مدلی مناسب برای بررسی انواع درمان های ژنتیکی و یافتن داروهای مناسب جهت درمان این بیماریها فراهم کرده است (۳).

سلول های پرتوان بنیادی القایی اختصاصی بیمار

از آنجایی که می توان از سلول های پرتوان بنیادی مشتق شده از سلولهای سوماتیک یک فرد جهت درمان در بیماری های مختلف سایر افراد استفاده نمود، اگر بتوان این سلول های پرتوان بنیادی القایی را از سلولهای سوماتیک خود فرد بیمار تولید نمود اهمیت آنها چند برابر گشته زیرا در این صورت این سلول ها از نظر ذخیره ژنتیکی با سلول های فرد بیمار مشابه می باشند (۴).

الف: کاربرد سلول های پرتوان بنیادی القایی اختصاصی بیمار در بیماری آمیوتروفیک لترال اسکلروزیس

دراین زمینه تحقیقات نسبتاً موفقی نیز انجام شده است که البته هنوز در فازهای اولیه قرار دارند. درمطالعه ای محققین توانستند که سلول های پرتوان بنیادی القایی را با استفاده از فیبروبلاست های جدا شده از بیماری ۸۲ ساله مبتلا به آمیوتروفیک لترال اسکلروزیس تولید کنند. این سلول های پرتوان بنیادی القایی الگوی بیان ژنی مشابهی با سلول های بنیادی جنینی انسانی داشته و توانایی تمایز به انواع سلول هایی که نماینده هر کدام از سه لایه زایای جنینی می باشند را داشتند. ضمنا از نظر مارکرهای ژنی الگوی بیان مشابهی بین سلول های فیبروبلاست بیماران با سلول های فیبروبلاست طبیعی وجود داشت. در این مطالعه از این سلول های پرتوان بنیادی القایی جهت تولید نورون های حرکتی و سلول های گلیا (سلول های دخیل در روند بیماری آمیوتروفیک لترال اسکلروزیس) اختصاصی بیمار استفاده گردید (۴). در این تحقیق از طریق واکنش زنجیره پلیمراز معکوس کمی نشان داده شد که میزان بیان ژن‌های ,REX1/ZFP42 FOXD3 TERT, NANOG, CRIPTO/TDGF1 در سلول‌های پرتوان بنیادی القایی قابل مقایسه با سلول‌های بنیادی جنینی انسانی

می باشند. در عین حال نشانگرهای ژنی سلول های بنیادی شامل SOX2, OCT4 در سلول های فیبروبلاست مختص بیمار بیان نمی گردید. ضمن اینکه رده های سلول های پرتوان بنیادی القایی کاریوتایپ طبیعی خود را حفظ کرده بودند (۴).

ب: کاربرد سلول های پرتوان بنیادی القایی اختصاصی بیمار در بیماری پارکینسون

بیماری دیگر نورودژنراتیو که در مطالعات سلول های پرتوان بنیادی القایی به آن پرداخته شده است، بیماری پارکینسون می باشد. این بیماری یک نقص نورودژنراتیو پیش رونده مزمن می باشد که با از بین رفتن جمعیت وسیعی از نورون های دوپامینرژیک نیگرواستریاتال ایجاد می گردد. اگرچه شناسایی ژن هایی که ارتباط عملکرد آنها با ایجاد فرم فامیلی بیماری پارکینسون به اثبات رسیده است، سرنخ هایی حیاتی جهت شناخت روند بیماری زایی سلولی و مولکولی این بیماری فراهم نموده است، اما اکثریت موارد این بیماری تک گیر بوده و بدون مشخص بودن موتاسیون های ژنتیکی نتیجه ای از کنش پیچیده میان عوامل محیطی و ژنتیکی می باشند. استفاده از سلول های فیبروبلاست جدا شده از بیماران پارکینسونی و تولید سلول های پرتوان بنیادی القایی اختصاصی بیماری و به دنبال آن تمایز آنها به نورون های دوپامینرژیک توانسته است مدل اختصاصی بیماری را در محیط آزمایشگاه بوجود آورد (۵).

با این حال هنوز این ابهام وجود دارد که سلول های پرتوان بنیادی القایی به طور مستقیم قابلیت مشتق شدن از افراد مسن با بیماری های مزمن را دارند یا خیر و اینکه آیا سلول های پرتوان بنیادی القایی مختص هر بیمار با توجه به اینکه این سلول ها یک دوره زمانی را در معرض عوامل بیماریزا بوده اند، بدون احتیاج به درمان و در نظر گرفتن شرایط خاص توانایی تمایز به رده سلولی خاصی را خواهند داشت؟ اگرچه در این زمینه محققین نتایج رضایت بخشی را به دست آورده اند، ولیکن هنوز بعضی از مسائل به طور کامل حل نشده است و باید در این زمینه تحقیقات گسترده تری صورت پذیرد (۴).

نتیجه گیری

اگرچه تولید سلول های پرتوان بنیادی القایی مسیری جدید را برای درمان بیماری ها و به خصوص بیماری های صعب العلاج پیش روی محققان قرار داده است اما می بایست در آینده مباحث پیچیده ایمنی زیستی این شیوه درمانی مرتفع گردد تا بتواند با اطمینان خاطر برای درمان بیماری‌های انسانی مورد استفاده قرار گیرد. به عنوان مثال وکتورهای رتروویروسی که در روند تولید سلول های پرتوان بنیادی القایی مورد استفاده قرار می گیرند به طور بالقوه توانایی وارد شدن به درون ژنوم میزبان را داشته و با درنظر گرفتن امکان وقوع موتاسیون احتمال تبدیل این سلول‌ها به سلول های سرطانی متصور می باشد. روش های جدیدی که به نظر می رسد در آینده جایگزین روش های کنونی در تولید سلول های پرتوان بنیادی القایی خواهد گردید مبتنی بر استفاده از ریزمولکول ها و یا غشاهای سلولی با خاصیت نفوذ پذیری نسبت به پروتئین هایی که توسط ژن های موثر در روند تولید سلول های پرتوان بنیادی القایی تولید شده اند را دارا باشند و به جای اینکه این ژن ها را وارد وکتورهای ویروسی نموده و سپس وارد سلول کنیم، پروتئین های تولیدی توسط آن وکتورها را وارد سلول های مورد نظر می نمایند. یکی از مسائل دیگری که در ارتباط با روش درمانی برنامه ریزی مجدد ژنتیکی سلول های تمایز یافته می بایست مورد توجه قرار گیرد، فاکتورهای ژنتیکی ناشناخته ای می باشند که احتمالا عامل ایجاد بیماری بوده و به صورت بالقوه توانایی نابودی سلول های پرتوان بنیادی القایی را دارند. برای درمان بیماری های نورودژنراتیو توسط سلول های پرتوان بنیادی القایی می بایست ابتدا دستورالعمل بالینی مشخصی تعریف گردد و آنچه که می تواند نقطه عطفی در تبدیل تحقیقات بنیادی به کاربردهای کلینیکی باشد، حل شدن مسائل تکنیکی، اخلاقی، اجتماعی و اقتصادی این شیوه درمانی می باشد (۵-۱).

منابع

1. Lindvall O, Kokaia Z. Stem cells in human neurodegenerative disorders - time for clinical translation? J Clin Invest. 2010; 120(1): 29-40.

2. Kang HC. Disease - specific pluripotent stem cells. Korean J Pediatr. 2010; 53(8): 786-789.

3. Park IH, Arora N, Huo H, Maherali N, Ahfeldt T, Shimamura A, et al. Disease-specific induced pluripotent stem cells. Cell. 2008; 134(5): 877-86.

4. Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, Weisenthal LM, Mitsumoto H, Chung W, et al. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. Science. 2008; 321: 1218-21.

5. Soldner F, Hockemeyer D, Beard C, Gao Q, Bell GW, Cook EG, et al. Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. Cell. 2009; 136(5): 964-77.

6. Patel M, Yang S. Advances in reprogramming somatic cells to induced pluripotent stem cells. Stem Cell Rev. 2010; 6(3): 367-80.

7. Maherali N, Hochedlinger K. Guidelines and techniques for the generation of induced pluripotent stem cells. Cell Stem Cell. 2008; 3(6): 595-605.

8. Robinton DA, Daley GQ. The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. Nature. 2012; 481: 295-305.

9. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell. 2006; 126(4): 663-76.

10. Cox JL, Rizzino A. Induced pluripotent stem cells: what lies beyond the paradigm shift. Exp Biol Med. 2010; 235(2): 148-58.

11. Mikkelsen TS, Hanna J, Zhang X, Ku M, Wernig M, Schorderet P, et al. Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. Nature. 2008; 454: 49-55.

12. Gaspar-Maia A, Alajem A, Meshorer E, Ramalho-Santos M. Open chromatin in pluripotencyand reprogramming. Nat Rev Mol Cell Biol. 2011; 12(1): 36-47.

13. Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. Nature. 2007; 448: 313-7.

14. Maherali N, Sridharan R, Xie W, Utikal J, Eminli S, Arnold K, et al. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. Cell Stem Cell. 2007; 1(1): 55-70.

15. Meissner A, Wernig M, Jaenisch R. Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells. Nat Biotechnol. 2007; 25(10): 1177-81.

16. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell. 2007; 131(5): 861-72.

17. Feng B, Ng JH, Heng JC, Ng HH. Molecules that promote or enhance reprogramming of somatic cells to induced pluripotent stem cells. Cell Stem Cell. 2009; 4(4): 301-12.