

细胞转分化技术研究进展

马奎莹 范安然 谭文涛 张学明* 李子义*

(吉林大学动物医学学院, 动物胚胎工程吉林省重点实验室, 长春 130062)

摘要 随着体细胞核移植、细胞融合及细胞转分化等技术的发展与完善, 现已证明多数动物细胞的细胞核具有全能性, 高度分化细胞的命运也并非是不可逆的。特定的细胞类型在合适的重编程转录因子诱导下可转分化为另一细胞类型。转分化技术为人类细胞疾病模型和分子替代疗法提供了一个崭新的思路。该文评述了近年来将成纤维细胞直接或间接转分化为其他细胞类型的相关进展, 就该领域目前存在的问题和挑战及其临床潜在应用价值进行了讨论, 以为相关研究提供借鉴。

关键词 转分化; 直接转分化; 间接谱系转化; iPSCs

The Recent Progress of Cellular Transdifferentiation

Ma Kuiying, Fan Anran, Tan Wentao, Zhang Xueming*, Li Ziyi*

(Jilin Province Key Laboratory of Animal Embryo Engineering, College of Animal Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China)

Abstract With the development of techniques including somatic cell nuclear transfer, cell fusion and cellular reprogramming, mass of data indicate that most of animal cell nuclei have totipotency or pluripotency. Thus, the fate of terminal differentiated cells is not absolutely irreversibly. Recently, it is reported that differentiated cell can be transdifferentiated into another cell type using appropriate transcription factors. This innovative transdifferentiation strategy provides a new approach for human disease models and molecular therapy. Aiming to provide useful references for related studies in this field, we summarize the latest progress of direct/indirect transdifferentiation of fibroblasts, and discuss the current problems and challenges for its potential clinic applications in regenerative medicine.

Key words transdifferentiation; direct transdifferentiation; indirect lineage conversion; iPSCs

1 引言

机体内的分化细胞如何选择并维持其特定命运? 德国著名胚胎学家、诺贝尔奖获得者Spemann早在1928年就提出了一个天才的假设: 即细胞核对细胞的分化及生命个体宏观的发育起决定作用, 后来他用他刚出生儿子的头发丝将世界上首例“细胞核移植”付诸现实。1952年, 美国科学家Briggs和King用显微注射法将桑椹胚前的蛙胚细胞核注入去

核的蛙卵中, 证实了Spemann的想法。1974年, John Gurdon采用分化的体细胞克隆出两栖类动物豹蟾, 这一伟大的研究证明了分化细胞的命运并非不可逆转, 可通过核移植重编程为多能细胞。1996年, 体细胞克隆羊多莉出生, Wilmut和Campbell^[1]首次证明高等哺乳动物体细胞核在去核卵母细胞中具有发育全能性。随后, 又出现了细胞融合重编程和细胞提取物诱导重编程等技术。2006年, 细胞重编程取得突

收稿日期: 2013-01-07 接受日期: 2013-02-27

国家重点基础研究发展计划(973)项目(批准号: 2009CB941001)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0431-87836162, E-mail: zhxueming@yahoo.com; Tel: 0431-87836187, E-mail: ziyi@jlu.edu.cn

Received: January 7, 2013 Accepted: February 27, 2013

This work was supported by the National Basic Research Program of China (973 Program)(Grant No.2009CB941001)

*Corresponding author. Tel: +86-431-87836162, E-mail: zhxueming@yahoo.com; Tel: +86-431-87836187, E-mail: ziyi@jlu.edu.cn

网络出版时间: 2013-05-09 15:21 URL: http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130509.1521.003.html

破性进展, Yamanaka团队^[2]首次用筛选到的细胞重编程因子获得了诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs), 证明基于转录因子的重编程比核移植技术更能提高细胞类型的转换率。本课题组最近的研究显示, 用Oct4、Sox2、Klf4及c-Myc四因子转染, 可将猪脂肪间充质干细胞和骨髓间充质干细胞成功重编程为猪iPSCs^[3]。

近年来发现, 虽然iPSCs规避了胚胎干细胞带来的伦理问题, 但是其来源的可靠性和技术的安全性仍是应用方面的最大障碍^[4]。一直以来, 学者们也在不断地尝试寻找一些关键的细胞重编程因子, 希望成体分化细胞可以不用绕回多能性状态而直接改变其表型, 即细胞转分化。1991年, Tosh等^[5]将转分化定义为一种已分化细胞不可逆地转化为另一种分化细胞的过程。转分化作为转化的一个分支, 打破了先前关于终末分化细胞发育路径不可逆转的传统观念。细胞转分化包括直接转分化和间接谱系转化两种方式。本文结合本课题组的工作, 就近期有关细胞转分化的研究进行了评述和讨论, 以期对相关研究提供借鉴。

2 直接转分化

2.1 MyoD与肌形成

早在1979年, Taylor和Jones研究发现, 将癌化的小鼠成纤维细胞在DNA去甲基化作用因子5-氮胞苷处理后可形成肌源性成软骨及成脂细胞克隆。Etzion等^[6]采用出生7天SD大鼠梗死区心肌和正常心肌中的成纤维细胞进行体外培养, 将携带MyoD(*Ad-*

MyoD/GFP)基因的腺病毒感染成纤维细胞, 结果显示, *MyoD*能激活并转化成纤维细胞为成肌细胞, 并向肌形成方向分化, 为缺乏自体肌细胞移植源的梗死心肌找到了丰富的移植替代资源。Kocafe等^[7]用携带*MyoD*的腺病毒载体转染体外培养的成体SD大鼠脂肪细胞, 结果证实, *MyoD*能促使脂肪细胞向成肌细胞转化, 并诱导肌纤维形成。Jin等^[8]用携带*MyoD*的逆转录病毒感染体外培养的缺乏肿瘤抑制基因*p53*、*pl6INK4a*的牛成纤维细胞, 结果表明, *MyoD*也能促使牛成纤维细胞向肌细胞方向分化, 并形成多核肌纤维; 经过对肌形态学和肌形成特异调节因子的表达分析, 他们发现这种作用比成肌细胞(C2C12)的肌分化作用更加快速、显著。可见, *MyoD*不仅能使未分化细胞转化为成肌细胞, 而且可诱导已分化的细胞向肌方向转分化, 并形成多核肌纤维。

2.2 诱导性心肌细胞

很多研究试图鉴别出心肌形成过程中最关键的调节因子, 但均未能有所收获。最近发现, 心脏发育似乎受到转录因子(*Gata4*、*Tbx5*、*Mef2c*以及*Nk2*和*Hand*家族转录因子)中一个高度保守的核心模式所控制, 该模式调节着心脏的大小、形态及终末分化方向^[9-10]。2009年, Takeuchi等^[11]将*Gata4*、*Tbx5*和*Baf60c*瞬时转入受精第6天的鼠卵中, 结果胚胎形成后本该分化成四肢肌肉和胎儿羊膜的中胚层细胞分化成了心肌细胞, 首次证明哺乳动物非心源中胚层细胞可被转分化为心肌细胞(表1)。

*Baf60c*和*Gata4*组合可诱导一些心脏发育早期

表1 采用成纤维细胞为起始细胞的细胞重编程研究进展

Table 1 Summary of recent advances in lineage reprogramming from fibroblasts

起始细胞	转录因子	转化细胞	参考文献
Starting cells	Transcription factors	Target cells	References
Mouse fibroblasts	C/EBP α , PU.1	Macrophages	[47]
	C/EBP β , Prdm16	Brown fat	[48]
	Gata4, Tbx5, Mef2c	Cardiomyocytes	[13]
	Ascl1, Myt11, Brn2	Glutamatergic neurons	[16]
	Ascl1, Lmx1a, Nurr1	Dopaminergic neurons	[49]
	Gata4, Hnf1 α , Foxa3, p19 ^{ARF} knockout	Hepatocytes	[31]
	Hnf4 α , Foxa1/Hnf4 α , Foxa2/Hnf4 α , Foxa3	Hepatocytes	[36]
Human fibroblasts	Prdm16, C/EBP β	Brown fat	[48]
	Oct4	Hematopoietic progenitors	[24]
	Ascl1, Brn2, Myt11, NeuroD1	Glutamatergic neurons	[51]
	Ascl1, Myt11, NeuroD2, miR-9/9, miR-124	Glutamatergic neurons GABAergic neurons	[52]
	Ascl1, Brn2, Myt11, Lmx1a, Foxa2	Dopaminergic neurons	[17]
	Ascl1, Lmx1a, Nurr1	Dopaminergic neurons	[49]
	Sox2, Oct4, Klf4, MYCL1, LIN28, shP53, MIM	Angioblast-like progenitor cells	[38]

标记及心脏发育的重要调节因子如*Nkx2-5*的表达。*Baf60c*的表达对*Gata4*结合目的基因的亚基非常重要,在非正常胚胎环境中,组织特异性以及染色质的重构需要这些心源性转录因子的参与。此外,在心脏发育过程中,*Baf60c*对维持心脏形态和决定心肌组织终末分化方向具有重要作用。小鼠胚胎发育早期表达的*Smarcd3*可编码*Baf60c*蛋白,后者是BAF复合体的一个亚单位,在心脏和体节中特异性表达。通过RNA干扰抑制小鼠胚胎*Smarcd3*的表达能导致心脏发育障碍、心肌和骨骼肌分化缺陷、脉管异常等。*Baf60c*在培养细胞中的过表达可介导心脏转录因子和BAF复合体ATP酶Brg1的结合,从而引起目的基因活化的增强^[12]。

2010年, Ieda等^[13]将小鼠心脏及尾尖的成纤维细胞直接转分化为诱导性心肌细胞(induced cardiomyocytes, iCMs)(表1)。为了确定潜在的重编程因子,研究人员选择了和心脏发育相关的14种基因作为重编程转录因子组合。这些基因缺失可导致小鼠心肌明显缺陷,与心肌成纤维细胞相比,其表达量在心肌细胞中更高^[14-15]。用于最初筛选的成纤维细胞是类心肌成纤维细胞(不表达增强型绿色荧光蛋白EGFP),这类细胞是从能表达*EGFP/PAC*(N-乙酰转移酶,嘌呤霉素抗性基因)转基因(由心肌特异性肌球蛋白启动子 α -MHC控制)的鼠心脏培养获得的。进一步对这14种因子进行筛选,发现*Gata4*、*Mef2c*和*Tbx5*(*T-box*转录因子)三因子组合能够有效地将成纤维细胞转分化为iCMs。

这种iCMs即使在切断三种转录因子的表达后,还能在体外稳定培养至少一周。此外, iCMs的一个亚群表现出体外自主节律收缩性和电生理特性,尤其是从心肌成纤维细胞中分离的iCMs。随后,作者将转分化初期的成纤维细胞注射到活体动物的心肌当中,这些细胞很快分化,形成了带有肌丝标记的心肌样细胞。但只有小部分iCMs能在体内观测到,这些心肌样细胞是否能与内源性心肌细胞发生耦连目前还不清楚。最后,利用诱导性报告基因(*Mesp-Cre/R26R-YFP*和*Isl1-Cre/R26R-YFP*报告小鼠)的细胞系图谱实验表明,成纤维细胞可被直接转分化为iCMs,且诱导过程并没有出现中胚层祖细胞等中间产物^[13]。

2.3 诱导性神经元

2010年, Vierbuchen等^[16]报道了一种使成纤维细胞诱导为兴奋性神经元的方法,所诱导的细胞被称

为诱导型神经(induced neuronal, iN)细胞(表1)。采用与Takahashi和Yamanaka相似的实验路线,他们用了慢病毒载体,将19种候选转录因子共转导入从神经发育障碍小鼠胚胎分离到的成纤维细胞中。这些细胞在Tau启动子的控制下,能够表达EGFP。Tau是一种在中枢神经系统中含量最为丰富的微管连接蛋白,可用来筛选特定神经元。在转导后第12天,他们发现荧光细胞同样表达神经元的分子标记(如Tuj1、NeuN、MAP2、Synapsin及vGLUT)。随后,他们对各种转录因子的组合进行试验,发现只需*Ascl1*、*Brn2/4*、*Myt1l*、*Zic1*、*Olig2*五种因子就能将成纤维细胞转分化成iN细胞,其中必需的只有*Ascl1*、*Brn2*、*Myt1l*或*Zic1*几个因子。电生理研究证明, iN细胞在体外可实现典型神经元的功能。然而,该研究仍有很多问题悬而未决。比如,作者用强力霉素诱导系统开始重编程,但他们并未通过撤除强力霉素测试iN细胞的稳定性。同样,也没有进行迁移实验和对细胞分子特性的全面分析(比如:基因表达谱分析、核型分析、蛋白组学分析)来更好地描述iN细胞的体内发育潜能和体外培养特性。

2011年, Pfisterer等^[17]通过慢病毒转染*Ascl1*、*Brn2*和*Myt1l*,成功地将人胚胎成纤维细胞和新生儿成纤维细胞转分化为人诱导性神经元(human-derived induced neurons, hiNs)(表1)。将*Lmx1a*和*FoxA2*与上述三因子联合转染则可将hiN成功分化成多巴胺能神经元。经检测,这些hiNs可以表达TH、 β III-微管蛋白并分泌L-芳香族氨基酸脱羧酶(多巴胺合成途径中的重要中间产物),说明hiNs的分化程度十分接近成熟细胞。

另据报道,*MiR-124*在MYT1L和BRN2两个转录因子过表达的情况下,能显著增强诱导的效率^[18](表1)。*MiR-124*是哺乳动物中枢神经系统中表达量最高的内源小RNA^[19]。Ambasudhan等^[18]通过转染*MiR-124*、*Brn2*和*Myt1l*,也成功实现了将新生儿及成人皮肤成纤维细胞直接转分化为功能性神经元。

2.4 转分化血细胞

造血系统是哺乳动物中最为典型的细胞分化系统^[20-21],所有的血细胞均从造血干细胞中分化而来。造血系统中的两种成熟细胞之间可以发生直接的系谱转化^[22]。2004年, Xie等^[23]将亮氨酸拉链类转录因子CCAAT/增强子结合蛋白(C/EBP) α 或 β 导入原代骨髓或脾脏B细胞中,4天后B细胞开始表达巨噬细胞的标记因子Mac1。

2010年, Szabo等^[24]研究指出, 不同于多种转录因子组合的直接转化, 在干细胞因子SCF和FMS样酪氨酸激酶3配体(FLT3LG)存在的情况下, *Oct4*单因子过表达即可将人皮肤成纤维细胞的一个亚群分化为CD45⁺/CD34⁺(造血干细胞表面因子)造血祖细胞(表1)。这种细胞具有形成粒细胞、单核细胞、巨核细胞和红细胞的潜能。造血祖细胞表型的获得与*Oct4*和造血特异性基因调节位点的结合是密不可分的^[25-27]。该结果令人意外的是, *Oct4*是调节多能性的一个关键因子, 但在造血系统各类细胞中并不表达^[28]。而与*Oct4*同属POU蛋白家族的*Oct1*和*Oct2*则在成年人淋巴系统生成中起着重要作用^[29-30]。结合位点预测提示, *Oct4*、*Oct1*和*Oct2*所共享的POU蛋白结构域很有可能在造血细胞转化过程中起到了特殊作用。

2.5 诱导性肝细胞样细胞

2011年, Huang等^[31]对在肝脏发育及功能中起重要作用的14种转录因子通过慢病毒分别感染了3T3成纤维细胞、小鼠胎儿成纤维细胞及小鼠尾尖成纤维细胞(表1)。感染后第5天, 这些细胞中均检测到了肝脏特异因子Alb和Tdo2的表达, 证实了成纤维细胞有分化为肝样细胞的潜能。为了保证独立的自发永生性, 他们后续的研究选用了小鼠尾尖部成纤维细胞。同时, 为了避免了细胞增殖方面的限制, 抑制了供体细胞周期抑制因子p19^{Arf}, 以保证转基因细胞在体外培养的稳定性^[32]。经过筛选, 研究人员证实, 导入*Gata4*、*Hnf1a*、*Foxa3*三因子, 即可将成纤维细胞诱导转化为具有功能的诱导型肝样细胞(induced hepatocyte-like cell, iHep)。这些iHep细胞呈典型的上皮样形态, 能够表达肝细胞的大部分特异基因, 并能发挥肝细胞功能。随后, 他们将iHep细胞移入延胡索酰乙酰乙酸水解酶(*Fah*)基因缺陷小鼠体内。对照组小鼠在数周后全部死亡, 而接受iHep细胞移植的12只小鼠中有5只存活下来。他们推测*Gata4*和*Foxa3*可能扮演着“先锋”的角色, 它们在成纤维细胞向肝细胞转分化的过程中触发了细胞核染色质的修正^[33-34]。*Hnf1a*可能使肝基因的表达更稳定, 例如*Hnf1a*、*Foxa2*和*Hnf4a*占据彼此的启动子, 维持其肝脏的表型^[35-36]。

同年, Sekiya等^[37]将*Hnf4a*+*Foxa1*、*Hnf4a*+*Foxa2*和*Hnf4a*+*Foxa3*三组两因子组合, 均可将成体小鼠成纤维细胞在体外直接分化为iHep(表1)。经检测这

些细胞具有成体肝细胞的形态和功能, 在*Fah*^{-/-}小鼠模型中同样可以定植并发挥健康肝细胞的功能。其优势在于只需采用更少的转录因子, 就能将成纤维细胞分化为肝样细胞, 并可在体内变为成熟的功能性肝细胞, 因而减少了因过多外源基因导入而产生的风险。

3 间接谱系转化

2012年12月, Kurian等^[38]开发出了一种由体细胞转化为特定谱系祖细胞的技术——“间接谱系转化(indirect lineage conversion, ILC)”技术(表1)。首先, 他们筛选出可使人多能干细胞分化为中胚层祖细胞的条件性培养基(mesodermal induction medium, MIM), 然后将*Sox2*、*Oct4*、*Klf4*、*MYCL1*、*LIN28*及*shP53*六因子分别用电穿孔法非整合地导入人皮肤成纤维细胞, 在iPSCs培养体系中培养8天使细胞达到可塑的中间过渡态, 而后转入MIM中继续培养8天, 使其分化为CD34⁺的中胚层祖细胞。通过验证, 此CD34⁺细胞具有分化为内皮细胞和血管平滑肌细胞的能力。将这些细胞植入小鼠后, 可形成参与血液循环的脉管系统。该项研究首次证明这种涉及部分去分化(partial de-differentiation)的重编程策略在人类细胞中是可行的, 可用于多潜能祖细胞的生成。ILC不仅节省了时间, 减少了自发突变发生的机会; 也避免了iPSCs的生成, 减少了畸胎瘤出现的风险。相比于直接转分化, ILC为更加高产、快速得到临床所需的目的细胞提供了保障^[39-40]。

4 存在的问题及挑战

转分化细胞与靶细胞有多大程度的相似性? 1989年, Weintraub等^[41]发现, 对于对数增长期的细胞, *MyoD*可诱导肌源性程序而并不抑制起始细胞的命运。这样, 转分化的神经细胞就同时表达神经和肌肉的标志基因。同时, 由*MyoD*诱导的畸胎瘤细胞仍可产生色素沉积。另外研究表明, 人的iPSCs细胞除具有全能性之外, 仍不能与人胚胎干细胞等同, 也就是说iPSCs细胞可具有全能性状态, 但同时还可拥有其起始细胞的分子痕迹^[42]。在再生医学研究领域, 这些重编程细胞能否排除肿瘤或其他畸变细胞的风险, 并最终安全应用于所有细胞类型的临床医疗当中, 目前仍是未知数。

综上所述, 细胞的转分化均经过了一些重要转录调控因子的诱导。由此产生的疑问是, 转分化细

胞能否在撤除诱导因子的情况下一如既往地保持其所有特性? Hanna等^[43]使用DNA敲除非整合基因的实验表明, 相对于很多细胞, iPSCs在去除重编程因子的情况下, 多能标记因子仍能继续表达, 仍保持着分化潜能和遗传状态。这种稳定性很可能是受操控多能性控制因子所固有的正反馈网络所调节的^[44]。对于分化细胞中是否存在相似的固有基因的表达网络以及这些网络在直接转分化过程中是否被触发, 结果因细胞类型而异。通过基因敲除或者非整合手段(载体或小分子)将重编程因子完全除去, 是在转分化过程中探寻这一问题的十分重要的实验。

最后, 在应用中最有争议的问题就是转分化细胞在体内和体外的存活、整合与生理反应如何? 比如, iN细胞在移植后是否可以发送和接受突触信号? iCMs是否可以有效地整合到受损的心脏, 真正实现其功能? 这些问题均有待进一步的探索。

5 在临床方面的潜在应用

自人iPSCs^[2]产生以来, iPSCs技术已成为了治疗人类遗传疾病以及后续药物筛选的新方法^[45]。iPSCs具有更好的广泛性和灵活性, 以及分化为与特定性状相关的多种细胞的能力。此外, 利用小分子和蛋白分子直接特异性地改变iPSCs的命运, 以及将多种细胞系按照模板化的发育模式进行高效的iPSCs诱导也得到了快速发展^[46]。但iPSCs的来源, 包括细胞种类、年龄等问题始终是iPSCs跨入临床应用一个不可忽视的问题。

再生生物学的终极目标就是将实验室中的研究发现应用于临床, 但iPSCs重编程和直接转分化都面临着巨大的困难, 致瘤性仍然是这两种途径的瓶颈。新的技术方法带来了新的挑战, 通过iPSCs这一途径增加了致瘤的危险, 例如由重编程因子方法导致的不完全重编程、组织差异或插入诱变等。直接转分化作为一个引人注目的治疗策略就是将细胞命运原地转化。这种途径被Zhou等^[15]于2008年所最先倡导, 他们通过转录因子在小鼠胰腺中将外分泌细胞转分化为可产生胰岛素的内分泌细胞系。目前来看, 在心脏和脑损伤后, 将成纤维细胞原地转化为心肌细胞或神经细胞应用于临床虽然还是一种科学假想, 但已引起了干细胞领域和再生医学领域的高度重视。

几年前, 对于制造符合细胞治疗或人类疾病模型的组织还没有什么好的选择, 研究人员不得不努

力发掘以核移植为基础的重编程技术的潜能。今天, 至少有两种主要的选择可应用于未来的治疗研究。为了解决上述所探讨的技术难题, 直接转分化研究将可能从众多由iPSCs技术发展而来的路线中脱颖而出。直接转分化将可能使我们越过细胞系间的重重阻隔, 实现真正的细胞命运的转变。

参考文献 (References)

- Campbell KH, McWhir J, Ritchie WA, Wilmot I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 1996; 380(6569): 64-6.
- 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.
- Tang L, Yin Y, Zhou H, Song G, Fan A, Tang B, *et al.* Proliferative capacity and pluripotent characteristics of porcine adult stem cells derived from adipose tissue and bone marrow. *Cell Reprogram* 2012; 14(4): 342-52.
- Tobe TD, Snyder EY, Nye JS. Modeling complex neuropsychiatric disorders with human induced pluripotent stem cells. *Curr Opin Pharmacol* 2011; 11(5): 521-7.
- Tosh D, Slack JM. How cells change their phenotype. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3(3): 187-94.
- Etzion S, Barbash IM, Feinberg MS, Zarin P, Miller L, Guetta E, *et al.* Cellular cardiomyoplasty of cardiac fibroblasts by adenoviral delivery of MyoD *ex vivo*: An unlimited source of cells for myocardial repair. *Circulation* 2002; 106(12 Suppl 1): I125-30.
- Kocafee YC, Israeli D, Ozguc M, Danos O, Garcia L. Myogenic program induction in mature fat tissue (with MyoD expression). *Exp Cell Res* 2005; 308(2): 300-8.
- Jin X, Lee JS, Kwak S, Jung JE, Kim TK, Xu C, *et al.* Myogenic differentiation of p53- and Rb-deficient immortalized and transformed bovine fibroblasts in response to MyoD. *Mol Cells* 2006; 21(2): 206-12.
- Olson EN. Gene regulatory networks in the evolution and development of the heart. *Science* 2006; 313(5795): 1922-7.
- Srivastava D. Making or breaking the heart: From lineage determination to morphogenesis. *Cell* 2006; 126(6): 1037-48.
- Takeuchi JK, Bruneau BG. Directed transdifferentiation of mouse mesoderm to heart tissue by defined factors. *Nature* 2009; 459(7247): 708-11.
- Lickert H, Takeuchi JK, von Both I, Walls JR, McAuliffe F, Adanson SL, *et al.* Baf60c is essential for function of BAF chromatin remodelling complexes in heart development. *Nature* 2004; 432(7013): 107-12.
- Ieda M, Fu JD, Delgado-Olguin P, Vedantham V, Hayashi Y, Bruneau BG, *et al.* Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell* 2010; 142(3): 375-86.
- Zhou Q, Melton DA. Extreme makeover: Converting one cell into another. *Cell Stem Cell* 2008; 3(4): 382-8.
- Zhou Q, Brown J, Kanarek A, Rajagopal J, Melton DA. *In vivo* reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature* 2008; 455(7213): 627-32.

- 16 Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP, Kokubu Y, Südhof TC, Wernig M. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* 2010; 463(7284): 1035-41.
- 17 Pfisterer U, Kirkeby A, Torper O, Wood J, Nelander J, Dufour A, *et al.* Direct conversion of human fibroblasts to dopaminergic neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(25): 10343-8.
- 18 Ambasadhan R, Talantova M, Coleman R, Yuan X, Zhu S, Lipton SA, *et al.* Direct reprogramming of adult human fibroblasts to functional neurons under defined conditions. *Cell Stem Cell* 2011; 9(2): 113-8.
- 19 Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, *et al.* Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 2005; 433(7027): 769-73.
- 20 Reyes T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414(6859): 105-11.
- 21 Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: An evolving paradigm for stem cell biology. *Cell* 2008; 132(4): 631-44.
- 22 Graf T, Enver T. Forcing cells to change lineages. *Nature* 2009; 462(7273): 587-94.
- 23 Xie H, Ye M, Feng R, Graf T. Stepwise reprogramming of B cells into macrophages. *Cell* 2004; 117(5): 663-76.
- 24 Szabo E, Rampalli S, Risueño RM, Schnerch A, Mitchell R, Fiebig-Comyn A, *et al.* Direct conversion of human fibroblasts to multilineage blood progenitors. *Nature* 2010; 468(7372): 521-6.
- 25 Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, *et al.* Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 2005; 122(6): 947-56.
- 26 Sridharan R, Tchieu J, Mason MJ, Yachechko R, Kuoy E, Horvath S, *et al.* Role of the murine reprogramming factors in the induction of pluripotency. *Cell* 2009; 136(2): 364-77.
- 27 Kwon UK, Yen PH, ColliN T, Wells RA. Differential lineage-specific regulation of murine CD45 transcription by Oct-1 and PU.1. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 344(1): 146-54.
- 28 Lengner CJ, Camargo FD, Hochedlinger K, Welstead GG, Zaidi S, Gokhale S, *et al.* Oct4 expression is not required for mouse somatic stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell* 2007; 1(4): 403-15.
- 29 Wang VE, Schmidt T, Chen J, Sharp PA, Tantin D. Embryonic lethality, decreased erythropoiesis, and defective octamer-dependent promoter activation in Oct-1-deficient mice. *Mol Cell Biol* 2004; 24(3): 1022-32.
- 30 Sebastiano V, Dalvai M, Gentile L, Schubart K, Sutter J, Wu GM, *et al.* Oct1 regulates trophoblast development during early mouse embryogenesis. *Development* 2010; 137(21): 3551-60.
- 31 Huang P, He Z, Ji S, Sun H, Xiang D, Liu C, *et al.* Induction of functional hepatocyte-like cells from mouse fibroblasts by defined factors. *Nature* 2011; 475(7356): 386-92.
- 32 Li H, Collado M, Villasante A, Strati K, Ortega S, Cañamero M, *et al.* The Ink4/Arf locus is a barrier for iPS cell reprogramming. *Nature* 2009; 460(7259): 1136-9.
- 33 Zaret KS, Watts J, Xu J, Wandzioch E, Smale ST, Sekiya T. Pioneer factors, genetic competence, and inductive signaling: Programming liver and pancreas progenitors from the endoderm. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2008; 73: 119-26.
- 34 Cirillo LA, Lin FR, Cuesta I, Friedman D, Jarnik M, Zaret KS. Opening of compacted chromatin by early developmental transcription factors HNF3 (FoxA) and GATA-4. *Mol Cell* 2002; 9(2): 279-89.
- 35 Kyrmizi I, Hatzis P, Katrakili N, Tronche F, Gonzalez FJ, Talianidis I. Plasticity and expanding complexity of the hepatic transcription factor network during liver development. *Genes Dev* 2006; 20(16): 2293-305.
- 36 Odom DT, Zizlsperger N, Gordon DB, Bell GW, Rinaldi NJ, Murray HL, *et al.* Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors. *Science* 2004; 303(5662): 1378-81.
- 37 Sekiya S, Suzuki A. Direct conversion of mouse fibroblasts to hepatocyte-like cells by defined factors. *Nature* 2011; 475(7356): 390-3.
- 38 Kurian L, Sancho-Martinez I, Nivet E, Aguirre A, Moon K, Pendaries C, *et al.* Conversion of human fibroblasts to angioblast-like progenitor cells. *Nat Methods* 2013; 10(1): 77-83.
- 39 Vierbuchen T, Wernig M. Direct lineage conversions: Unnatural but useful? *Nat Biotechnol* 2011; 9(10): 892-907.
- 40 Sancho-Martinez I, Baek SH, Izpisua Belmonte JC. Lineage conversion methodologies meet the reprogramming toolbox. *Nat Cell Biol* 2012; 14(9): 892-9.
- 41 Weintraub H, Tapscott SJ, Davis RL, Thayer MJ, Adam MA, Lassar AB, *et al.* Activation of muscle-specific genes in pigment, nerve, fat, liver, and fibroblast cell lines by forced expression of MyoD. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86(14): 5434-8.
- 42 Ohi Y, Qin H, Hong C, Blouin L, Polo JM, Guo T, *et al.* Incomplete DNA methylation underlies a transcriptional memory of somatic cells in human iPS cells. *Nat Cell Biol* 2011; 13(5): 541-9.
- 43 Hanna J, Saha K, Pando B, van Zon J, Lengner CJ, Creighton MP, *et al.* Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration. *Nature* 2009; 46(7273): 595-601.
- 44 Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, *et al.* Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 2005; 122(6): 947-56.
- 45 Dolmetsch R, Geschwind DH. The human brain in a dish: the promise of iPSC-derived neurons. *Cell* 2011; 145(6): 831-4.
- 46 Chambers SM, Fasano CA, Papapetrou EP, Tomishima M, Sadelain M, Studer L. Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat Biotechnol* 2009; 27(3): 275-80.
- 47 Feng R, Desbordes SC, Xie H, Tillo ES, Pixley F, Stanley ER, *et al.* PU.1 and C/EBPalpha/beta convert fibroblasts into macrophage-like cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(16): 6057-62.
- 48 Kajimura S, Seale P, Kubota K, Lunsford E, Frangioni JV, Gygi SP, *et al.* Initiation of myoblast to brown fat switch by a PRDM16-C/EBP-beta transcriptional complex. *Nature* 2009; 460(7259): 1154-8.
- 49 Caiazzo M, Dell'Anno MT, Dvoretzskova E, Lazarevic D, Taverna S, Leo D, *et al.* Direct generation of functional dopaminergic neurons from mouse and human fibroblasts. *Nature* 2011; 476(7359): 224-7.
- 50 Kajimura S, Seale P, Kubota K, Lunsford E, Frangioni JV, Gygi SP, *et al.* Initiation of myoblast to brown fat switch by a PRDM16-C/EBP-beta transcriptional complex. *Nature* 2009; 460(7259): 1154-8.
- 51 Pang ZP, Yang N, Vierbuchen T, Ostermeier A, Fuentes DR, Yang TQ, *et al.* Induction of human neuronal cells by defined transcription factors. *Nature* 2011; 476(7359): 220-3.
- 52 Yoo AS, Sun AX, Li L, Shcheglovitov A, Portmann T, Li Y, *et al.* MicroRNA-mediated conversion of human fibroblasts to neurons. *Nature* 2011; 476(7359): 228-31.