

راهکارهای بازبرنامه‌ریزی سلول‌های بالغ: از انتقال هسته تا القای پرتوانی با استفاده از فاکتورهای رونویسی معین

محمودرضا رفیعی^۱، حمیدرضا کلهر^۲، محمد مرندی^۳، سیدجواد مولی^{۴*}

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- استادیار، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- کارشناسی ارشد، مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۴- دانشیار، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

دریافت مقاله: ۸۷/۶/۹

پذیرش مقاله: ۸۷/۷/۱۴

چکیده

کاربردهای بالینی سلول‌های بنیادی جنینی از یک سو با مشکل پس‌زدن بافت و از سوی دیگر با محدودیت‌های اخلاقی روبروست. یک راه حل برای این موضوع بازبرنامه‌ریزی سلول‌های سوماتیک به کمک انتقال هسته آنها به اووسیت یا زیگوت است. اما پیچیدگی‌های فنی و ملاحظات اخلاقی موجود، کاربرد بالینی این فن‌آوری را نیز با مشکل مواجه کرده است. راهکاری که به تازگی ابداع شده القای بازبرنامه‌ریزی در سلول‌های بالغ در شرایط محیط آزمایشگاه است. این کار اولین بار به واسطه بیان چهار فاکتور رونویسی به نام‌های c-Myc, Sox2, Oct4 و Klf4 انجام شده است. پس از آن به منظور بهینه‌سازی و نزدیک کردن این فن‌آوری به کاربردهای بالینی تلاش‌های بسیاری صورت گرفته است، اما به نظر می‌رسد هنوز راه درازی در پیش است. در این مقاله راهکارهای موجود برای بازبرنامه‌ریزی سلول‌های سوماتیک به دوران جنینی بررسی و سپس در مورد استراتژی اخیر و پیشرفت‌های صورت گرفته در آن بحث می‌شود.

کلیدواژگان: بازبرنامه‌ریزی، پیوند هسته، سلول القا شده پرتوان، درمان ویژه بیمار.

۱- مقدمه

با توصیف سلول‌های بنیادین همواره دو ویژگی اصلی مطرح است: توانایی خود-تکثیری (self-renewal) و تولید سلول‌های تمایز یافته. سلول‌های بنیادین از جنین و بسیاری از بافت‌های بالغ جداسازی شده‌اند. می‌توان سلول‌های بنیادی را بر اساس توانایی‌های تکوینی آنها دسته بندی نمود. در پستانداران تنها تخم و بلاستومرهای اولیه تام-توان (Totipotent) هستند و می‌توانند یک ارگانیسم کامل به همراه جفت و پرده‌های جنینی را ایجاد نمایند. همچنین سلول‌های بنیادی جنینی موش مثالی از سلول‌های پرتوان (Pluripotent) هستند و می‌توانند همه انواع سلول‌های بدن، به‌جز سلول‌های جفت

هم اکنون، ۲ دهه پس از آن که دانشمندان برای اولین بار سلول‌های بنیادین موش را جداسازی کردند، می‌توان سلول‌های بنیادین جنینی و بالغ بسیاری از جانداران از جمله انسان را کشت داد. سلول‌های بنیادی سلول‌هایی هستند که بافت‌ها را در هر زمان و هر جایی که نیاز باشد می‌سازند. بدون سلول‌های بنیادی، زخم‌ها هرگز خوب نمی‌شوند، سلول‌های پوست و خون نمی‌توانند خود را بازسازی کنند. بدون سلول‌های بنیادی، تخم‌های لقاح یافته به جنین و جنین به موجود بالغ تبدیل نمی‌شود. سلول‌های بنیادی در تمام موجودات پر سلولی از انسان گرفته تا گیاه وجود دارند. در رابطه

* نشانی مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پایه، گروه ژنتیک، صندوق پستی: ۱۷۵-۱۴۱۱۵

Email: sjmowla@modares.ac.ir

و پرده‌های جنینی را ایجاد نمایند [۱]. سلول‌های چند-توانه (Multipotent) مثل سلول‌های بنیادی مغز استخوان، انواع سلول‌های یک رده به خصوص را ایجاد می‌نمایند. سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی مثالی از سلول‌های یک-توانه (Unipotent) هستند که در شرایط این‌ویوو (in vivo) تنها می‌توانند اسپرم تولید کنند.

پیوند هسته (Nuclear transplantation)، که به آن SCNT (Somatic Cell Nuclear Transfer) نیز گفته می‌شود، به معنی وارد ساختن هسته یک سلول سوماتیک به درون یک تخمک بی‌هسته است تا یک حیوان همانندسازی شده ایجاد شود (مثل گوسفند دالی) [۲]. ایجاد حیوانات زنده به کمک این روش نشان داد که وضعیت اپی‌ژنتیک سلول‌های کاملاً تمایز یافته، با وجود این که پایدار است ولی غیر قابل بازگشت هم نیست و می‌توان آن را به دوران جنینی بازگرداند. این فناوری علاوه بر آن که ابزاری جالب برای مطالعه اپی‌ژنتیک تکوین جنین و برخی بیماری‌هاست، به منظور ابداع درمان‌های مختص هر فرد نیز مورد توجه است. اما، بازده کم این کار و مسائل اخلاقی مطرح شده مانع از کاربردهای درمانی آن بوده است. یکی از سؤالات کلیدی که پیرامون مسأله انتقال هسته‌ای مطرح است، به مکانیسم بازبرنامه‌ریزی (Reprogramming) مربوط می‌شود. در واقع چه عواملی در سیتوپلاسم تخمک وجود دارند که اپی‌ژنوم سلول سوماتیک را به دوران جنینی باز می‌گردانند؟ پاسخ به این سؤال سنگ بنای روش‌هایی است که برای بازبرنامه‌ریزی سلول به دوران پرتوانی ابداع شده‌اند. در این مقاله مروری ابتدا به بررسی راهکارهای موجود در این زمینه می‌پردازیم و سپس روی جدیدترین روش موجود که به آن القای پرتوانی در سلول‌ها گفته می‌شود، متمرکز خواهیم شد.

۲- راهکارهای بازبرنامه‌ریزی سلول‌های سوماتیک

در تکوین طبیعی، سلول‌ها در یک مسیر یک طرفه از تخم تا-توان به توده سلولی درونی (Inner Cell Mass: ICM) پرتوان و در نهایت سلول‌های متمایزتر پیش می‌روند. این تغییرات در اثر برهم‌کنش سلول‌ها در جنین رخ می‌دهند و به واسطه دگرگونی‌های اپی‌ژنتیکی از هم متمایز می‌شوند [۴،۳]. مهم است بدانیم سلول‌هایی که در محیط کشت می‌رویند، برخلاف سلول‌های موجود در جنین، در معرض

شرایط انتخابی ویژه هستند و در نتیجه وضعیتی متفاوت از شرایط این‌ویوو دارند. باید تأکید کرد سلول‌هایی که به رشد در شرایط محیط کشت عادت کرده‌اند در بهترین حالت مشابه ویژگی سلول‌های جنینی را دارا هستند [۴،۳]. در نتیجه، مفاهیمی مانند پرتوانی، چند-توانی یا تمایز سلول‌های کشت داده شده در عمل با استانداردهای مولکولی و عملکردی متفاوتی ارزیابی می‌شوند ساده‌ترین آزمون در زمینه توانایی تکوینی سلول کشت داده شده، تمایز در شرایط آزمایشگاهی (in vitro) است. آزمون‌های دیگر مثل تولید تراتوم (Teratoma) (تومور لایه زاینده)، ساخت جنین کایمرا (Chimera)، و شرکت در ایجاد لایه زاینده به ترتیب سخت گیرانه‌تر می‌شوند (جدول ۱). موشکافانه‌ترین آزمون برای محک توانایی تکوینی، تزریق سلول‌های مورد سنجش به بلاستوسیست (Blastocyst) ϵn کروموزومی است [۵،۴]. در این آزمون، جنین تنها از سلول‌های تزریقی تشکیل می‌شود و سلول‌های بلاستوسیست خود میزبان در تکوین جنین شرکت نمی‌کنند.

چندین استراتژی مختلف مانند پیوند هسته‌ای، تلفیق سلولی، بازبرنامه‌ریزی به واسطه کشت طولانی مدت و القای بازبرنامه‌ریزی برای تبدیل سلول‌های تمایز یافته به وضعیت جنینی ابداع شده است. در این مقاله به‌طور خلاصه به بررسی این راهکارها می‌پردازیم و تمرکز اصلی ما بر آخرین راه کار ابداع شده یعنی القای بازبرنامه‌ریزی خواهد بود.

۳- انتقال هسته

برای تولید سلول‌های بنیادین جنینی از طریق انتقال هسته سلول شخص بیمار، تلاش‌های زیادی صورت گرفته است. این کار در فرایندی به نام پیوند هسته‌ای، SCNT یا شبیه‌سازی درمانی (Therapeutic Cloning) انجام می‌گیرد [۶]. تصور کنید دانشمندان می‌خواهند سلول‌های بنیادینی به‌دست آورند که از نظر ژنتیکی با سلول‌های شما یکسانند. برای این کار تعدادی از سلول‌های پوست یا خون شما را جمع‌آوری می‌کنند. از طرف دیگر تعداد زیادی از سلول‌های تخمک لقاح نیافته شما یا هر فرد دیگری را نیز تهیه می‌کنند، سپس هسته

یکی از این تخمک‌ها را با هسته یکی از سلول‌های شما عوض می‌کنند و سلول تخم به وجود آمده را وادار به انجام تقسیم‌های متوالی می‌کنند. یک تخم لقاح یافته انسان پس از ۳ تا ۶ روز رشد و تقسیم سلولی به مرحله بلاستولا (Blastula) می‌رسد. در این بلاستوسیست یک توده سلول داخلی وجود دارد که قسمت‌های مختلف بدن جنین را ایجاد می‌کند. دانشمندان این سلول‌ها را استخراج کرده و در آزمایشگاه کشت می‌دهند. این روش در مورد گوسفند، موش، گاو و میمون و دیگر پستانداران موفقیت آمیز بوده است و هیچ دلیل نظری قدرتمندی وجود ندارد که این روش برای انسان قابل انجام نباشد؛ با این وجود تاکنون تلاش‌ها برای به کار بردن این روش در مورد انسان اغلب با شکست مواجه شده‌اند [۷].

برخی افراد با ایجاد سلول‌های جنینی، از طریق پیوند هسته به دو دلیل مخالفند: اول آن که برای این کار باید یک جنین را از بین برد. دوم آن که ممکن است این جنین را در رحم دیگری رشد دهند تا به یک جنین کامل تبدیل شود. این مورد اخیر شبیه‌سازی تولید مثلی (Replicative Cloning) نام دارد و در مورد چند گونه پستاندار موفقیت آمیز بوده است. اما این تلاش‌ها اغلب با شکست مواجه می‌شوند زیرا جفت جنین به خوبی شکل نمی‌گیرد [۸،۷]. شبیه‌سازی تولید مثلی برای انسان در بسیاری از کشورها ممنوع شده است و بخش عمده‌ای از دانشمندان این کار را غیراخلاقی می‌دانند؛ به‌ویژه که این کار در اغلب موارد منجر به سقط جنین یا زاده‌های به‌شدت معلول می‌شود. هر چند انتظار می‌رفت این استراتژی نیاز به مهار سیستم ایمنی فرد گیرنده پیوند را برطرف سازد ولی در عمل پیچیدگی‌های تکنیکی و اخلاقی SCNT مانع از تحقق شبیه‌سازی درمانی شده است.

۴- تلفیق سلول‌های سوماتیک و سلول‌های

بنیادی جنینی

امکان بازبرنامه‌ریزی اپی‌ژنتیک هسته سلول از طریق تلفیق سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های سوماتیک نیز به اثبات رسیده است. دوره‌گه سازی (Hybrid) بین انواع سلول‌های

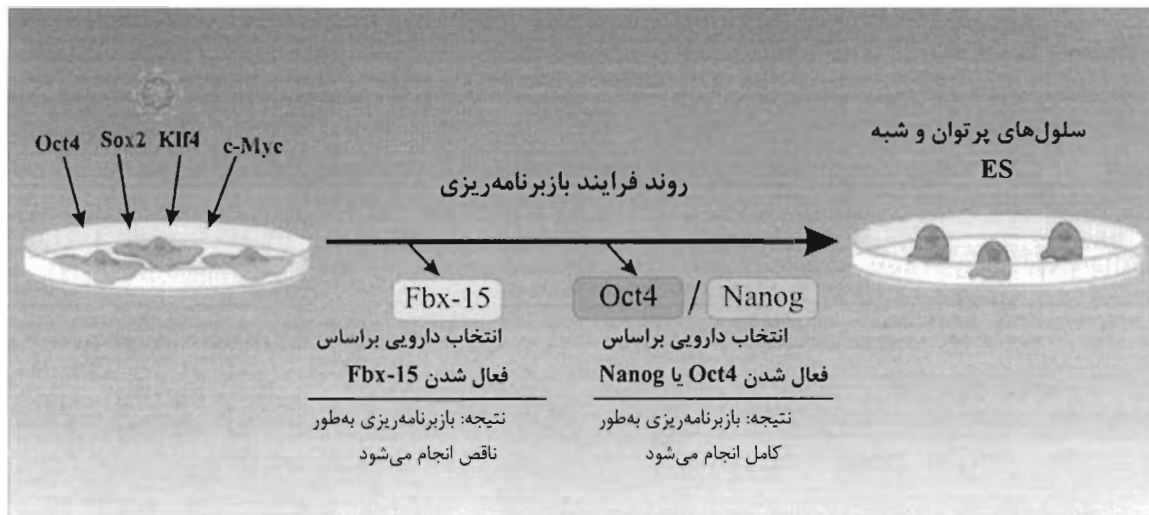
سوماتیک و سلول‌های کارسینومای جنینی [۹]. یا سلول‌های بنیادی و زاینده جنینی [۱۰] نشان می‌دهد که فنوتیپ پرتوانی در آن‌ها غالب است. فعال شدن نشانگرهای پرتوانی مانند Oct4 یا فعال شدن کروموزوم X غیرفعال، شواهد مولکولی مبنی بر بازبرنامه‌ریزی سلول دوره‌گه هستند. نشانگرهای پرتوانی اولین بار ۲ روز پس از تلفیق مشاهده می‌شوند [۱۱]، بنابراین به نظر می‌رسد که همانندسازی DNA برای فعال شدن نشانگرهای مولکولی ضروری است. متأسفانه، ناکارآمدی فرایند تلفیق مانع از مطالعه مکانیسم‌های مولکولی دخیل در بازبرنامه‌ریزی سلول سوماتیک شده است.

درحالی که این روش به انتقال هسته متکی نیست، ولی تتراپلویدی بودن سلول‌های بازبرنامه‌ریزی شده نقص بزرگی بر سر راه استفاده از این سلول‌ها در سلول‌درمانی است. اگرچه حذف انتخابی برخی از کروموزوم‌ها امکان‌پذیر است [۱۲]، اما ایجاد سلول‌های دیپلوئید به این نحو مشکل است زیرا خطر عدم پایداری ژنومی در سطح گسترده‌ای وجود دارد. در روشی دیگر چنین ادعا شده که تیمار کوتاه مدت سلول‌های سوماتیک با عصاره سلول‌های بنیادی جنینی منجر به بازبرنامه‌ریزی ژنومی می‌شود [۱۳]، اما هنوز شواهد برای بازبرنامه‌ریزی ژنوم سلول سوماتیک با این روش قانع‌کننده نیست.

۵- القای بازبرنامه‌ریزی به واسطه

کشت سلول

همان‌طور که ذکر شد، سلول‌های پرتوان از بافت‌های جنینی همچون بلاستومر و ICM جداسازی شده‌اند. علاوه بر این می‌توان از اپی‌بلاست (Epiblast)، سلول‌های نیایی زاینده (Primordial Germ Cells) و سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (Spermatogonial Stem Cell) نیز سلول‌های پرتوان استخراج نمود. سلول‌های پرتوان که از این بافت‌ها به‌دست می‌آیند به ترتیب EpiSC، EGC و maGCS نام‌گذاری شده‌اند. سلول‌های زایا، مانند سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی یا سلول‌های نیایی زاینده در شرایط این‌ویوو تک-توان هستند ولی مشاهده شده که در شرایط محیط آزمایشگاه پس از کشت‌های طولانی و در مجاورت عواملی همچون



شکل ۱ بازبرنامه‌ریزی سلول‌های سوماتیک به دوران پرتوانی. انتقال و بیان چهار فاکتور رونویسی Oct4, Sox2, Klf4 و c-Myc در فیروبلاست یا بسیاری از سلول‌های دیگر باعث بازبرنامه‌ریزی سلول به دوران پرتوانی می‌شود. چنانچه ژن *Fbx15* مبنای انتخاب دارویی قرار گیرد، بازبرنامه‌ریزی نیمه‌تمام خواهد بود. ولی چنانچه *Oct4* یا *Nanog* مبنای بازبرنامه‌ریزی قرار گیرند بازبرنامه‌ریزی کامل خواهد بود. به علاوه عدم انتخاب به‌واسطه دارو و تکیه بر ویژگی‌های ریخت‌شناسی نیز همین نتیجه را در بر دارد.

زمینه بازبرنامه‌ریزی سلول‌های سوماتیک به وضعیت شبه جنینی دست یافته‌اند [۱۷]. آن‌ها توانستند فیروبلاست موش را با انتقال ژن به کمک رتروویروس به صورت شبه جنینی و پرتوان درآورند. القای پرتوانی در این روش برای اول بار به واسطه انتقال ژن چهار فاکتور رونویسی به نام‌های Oct4, Sox2, Klf4 و c-Myc و انتخاب براساس فعال شدن ژن *Fbx15* صورت پذیرفت. در واقع ژن *Fbx15* تنها در دوران جنینی بیان می‌شود و در این آزمایش سلول‌هایی که قادر می‌شوند این ژن را روشن نمایند زنده می‌مانند (شکل ۱). در واقع موشی که سلول‌ها از آن به‌دست آمده مورد مهندسی ژنتیکی قرار گرفته و دارای کاست Fbx15-IRES-neo است. به واسطه روشن شدن ژن *Fbx15* ژن مقاومت به نئوماسین (Neomycin) نیز روشن می‌شود و سلول بازبرنامه‌ریزی شده به نئوماسین مقاوم می‌شود. سلول‌های بنیادی القا شده پرتوان (induced Pluripotent Stem Cell: iPS) نامی بود که روی این سلول‌ها گذارده شد. بازگشت به دوران پرتوانی ابتدا با مشاهده بیان ژن‌های مختص دوران جنینی از جمله *Oct4*, *Nanog*, *Nucleostemin* [۱۹, ۱۸] و بسیاری ژن‌های از این دست تأیید شد. در ادامه توانایی تمایز به بافت‌های گوناگون و توانایی تشکیل تراکم بیانگر پرتوانی این سلول‌ها بود.

FGF و LIF و یا GDNF (برای maGCS)، سلول‌های پرتوان و شبه ES نیز از آن‌ها قابل استحصال هستند [۱۴-۱۶].

مزیت این روش در آن است که نیازی به تغییرات ژنتیکی در سلول هدف نیست. اما مشکل عمده آن است که سلول‌های اپی‌بلاست و سلول‌های زاینده نیایی تنها در دوران جنینی وجود دارند و در موجود بالغ یافت نمی‌شوند. همچنین سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به‌راحتی در دسترس نیستند و تبدیل آن‌ها به maGCS فرایندی بسیار ناکارآمد است.

در مورد سایر سلول‌های بنیادین بافتی باید گفت که قابلیت پرتوانی و دگرتمایزی (Transdifferentiation) در آن‌ها در حد یک نظریه اثبات نشده باقی مانده است. گاهی اوقات ممکن است یک دگرتمایزی در رده‌ای از سلول‌های سوماتیک ایجاد شود ولی این موارد بسیار محدود هستند و نیروی عمده‌ای برای ترمیم به حساب نمی‌آیند.

۶- بازبرنامه‌ریزی به کمک عوامل

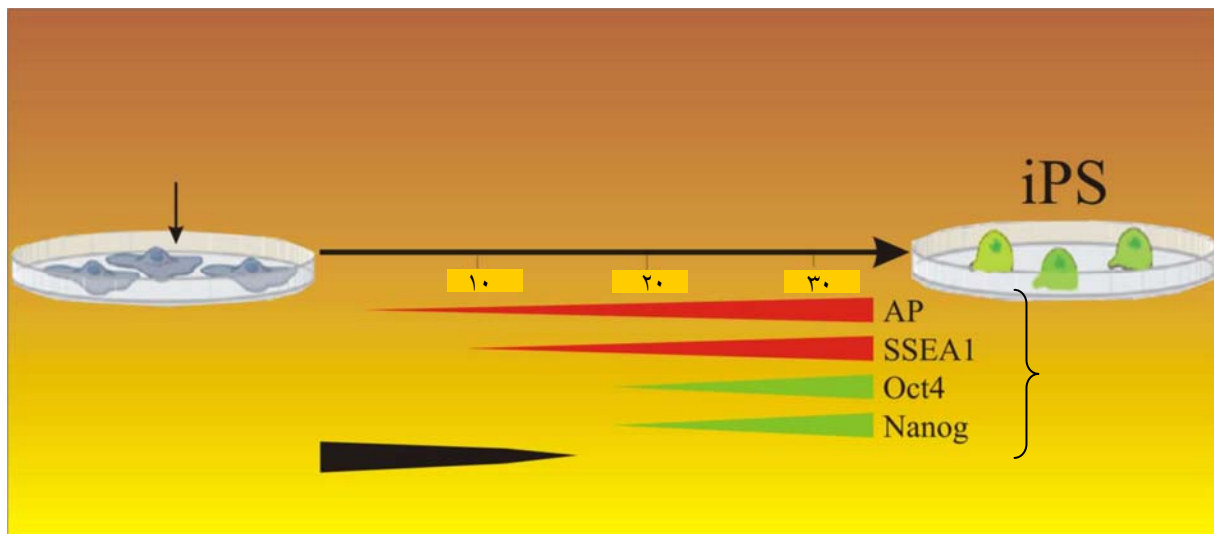
رونویسی معین

اخیراً دانشمندان ژاپنی برای اولین بار به پیشرفت مهمی در

همان‌طور که گفته شد، القای بازبرنامه‌ریزی به واسطه بیان اکتوپیک (Ectopic) چهار ژن به نام‌های *Oct4*، *Sox2*، *c-Myc* و *Klf4* صورت گرفته است. *Oct4* یک فاکتور رونویسی است که در تخمک بیان می‌شود و تا زمان لانه‌گزینی در جنین فعال باقی می‌ماند. بیان *Oct4* با عدم تمایز همراه است. در واقع، حذف ژن *Oct4* باعث تمایز در سلول‌های جنینی می‌شود، بنابراین نقش آن در خود-تکثیری سلول‌های بنیادی جنینی اثبات شده است. بیان ژن *Oct4* باید به شدت تنظیم شده باشد زیرا بیان بیش از اندازه یا کم آن باعث تمایز سلول‌های ES می‌شود [۲۰]. *Sox2* نیز یک فاکتور رونویسی است که بیان آن برای بقای خود-تکثیری سلول‌های ES ضروری است. *Sox2* از خانواده فاکتورهای رونویسی HMG-box (High Mobility Group box) و شبیه SRY (Sex-determining Region Y) است. هنگامی که *Sox2* با سایر پروتئین‌ها دیمریزه شود، می‌تواند به صورت یک عامل فعال‌کننده رونویسی (Transcriptional activator) وارد عمل شود. *Sox2* در تکوین سلول‌های ES و تعیین سرنوشت آن‌ها دخیل است [۲۱]. *Klf4* نیز یک فاکتور رونویسی است. تاکنون تأثیر آن بر جلوگیری از تقسیم سلولی و تأثیر p53 بر بیان آن و بالعکس مشخص شده است. هنگامی که به DNA آسیب وارد شود، بیان *Klf4* القا شده و باعث بیان CKIها (Cyclin dependent Kinase Inhibitors)، مثل p21 می‌شود [۲۲، ۲۳]. در کل *Klf4* بیشتر به عنوان یک بازدارنده تقسیم، به خصوص در سلول‌های معده و روده، عمل می‌کند [۲۴، ۲۵]. *Myc* نیز یک فاکتور رونویسی است که در بیان بسیاری از ژن‌ها دخیل است. *Myc* به ناحیه‌ای از DNA موسوم به E-box (Enhancer box) متصل می‌شود و هیستون استیل ترانسفرازها (Histone acetyltransferases: HATs) را به کار می‌گیرد [۲۶]. اولین عملکردی که از *Myc* شناخته شد توانایی آن در به راه انداختن تقسیم سلول بود. *Myc* باعث بیان سایکلین‌ها و کاهش بیان p21 می‌شود. همچنین *Myc* باعث افزایش بیان rRNAها و پروتئین‌های ریبوزومی و رشد سلول می‌شود [۲۷] به علاوه *Myc* می‌تواند باعث مرگ برنامه‌ریزی شده سلول (Apoptosis) نیز بشود. *Myc* یک پروتئین‌کوژن (Proto-oncogen) بسیار قویست و در بسیاری

از سرطان‌ها بیان آن افزایش می‌یابد [۲۸]. طی آزمایش‌های ژنتیکی مشخص شده که وجود ژن *Oct4* و *Sox2* برای پرتوانی ضروریست [۲۹] ولی نقش دو انکوژن *c-Myc* و *Klf4* در بازبرنامه‌ریزی کمتر آشکار شده است. در واقع، *c-Myc* برای به دست آوردن سلول‌های iPS انسان و موش غیر ضروری است ولی کنار گذاشتن آن بازده کار را به شدت کاهش می‌دهد [۳۰-۳۲].

همان‌طور که گفته شد، نسل اول سلول‌های iPS بر پایه فعال شدن ژن *Fbx15* ابداع شده بود بنابراین آن را *Fbx15-iPS* نام نهادند. این سلول‌ها قادر به ایجاد تراتوم بودند، اما نمی‌توانستند کایمرای زنده تشکیل دهند. بقای پرتوانی در این سلول‌ها به بیان ژن‌های *Oct4* و *Sox2* توسط ویروس بستگی داشت و ژن‌های *Oct4* و *Nanog* خود سلول یا بیان نمی‌شدند یا در سطحی پایین‌تر از سلول ES بیان می‌شدند. در واقع پروموتور آن‌ها تا حد زیادی متیله شده بود. هنگامی که به جای ژن *Fbx15*، فعال شدن ژن‌های *Oct4* و *Nanog* خود سلول به عنوان مبنای انتخاب دارویی برگزیده شد، سلول‌های iPS حاصل به طور کامل به حالت پرتوان و شبه جنینی بازبرنامه‌ریزی شدند (شکل ۱) [۳۳، ۳۴]. شباهت این سلول‌های iPS و ES از جنبه‌های مختلف زیستی مورد بررسی قرار گرفت: ۱) الگوی جامع بیان ژن و وضعیت کروماتینی این سری از سلول‌های iPS از سلول‌های ES تا حد زیادی غیر قابل تمایز بودند. ۲) برخلاف سلول‌های *Fbx15-iPS*، سلول‌های *Oct4-iPS* و *Nanog-iPS* برای بقای پرتوانی خود کاملاً به بیان ژن‌های *Oct4* و *Nanog* خود سلول متکی بودند، در حالی که سلول‌های *Fbx15-iPS* به بیان ژن‌های ویروسی وابسته هستند. از سوی دیگر شواهد نشان می‌دهند که ویروس‌های موشی در سلول‌های جنینی به شدت خاموش می‌شوند. این مطلب توجهی برای خاموش شدن ژن‌های ویروسی در سلول‌های *Oct4-iPS* و *Nanog-iPS* است [۳۵، ۳۶]. در واقع این مساله به دلیل عملکرد متیل ترانسفرازهای *Dnmt3a* و *Dnmt3b* در حین بازبرنامه‌ریزی رخ می‌دهد. ۳) کروموزوم X غیر فعال سلول‌های دهنده مجدداً فعال می‌شود [۳۳]. ۴) از همه مهم‌تر، سلول‌های *Oct4-iPS* و *Nanog-iPS* جنین‌های کایمرای زنده ایجاد کردند و در لایه



شکل ۲. فعال شدن یک به یک نشانگرهای پرتوانی در حین بازبرنامه‌ریزی. فسفاتاز قلیایی (AP) و سلول‌های SSEA1 مثبت به ترتیب پس از ۳ و ۹ روز مشاهده می‌شوند. در موش‌های ترانسژنیک کاست Oct4-IRES-GFP یا Nanog-IRES-GFP تعبیه شده که با روشن شدن ژن Oct4 یا Nanog ژن GFP نیز در آن‌ها بیان می‌شود. مشاهده شده که در iPS حاصل از این موارد GFP حدوداً پس از ۲ هفته بیان می‌شود. فاکتورهای رونویسی که به واسطه ویروس منتقل شده‌اند باید حدود ۲ هفته بیان شوند تا بازبرنامه‌ریزی صورت پذیرد..

Chromatin Modification) یا تغییرات متیلاسیون DNA می‌شود که در نهایت باعث پرتوان شدن برخی سلول‌ها می‌شود. سؤالی که مطرح است آن است که نقش این عوامل رونویسی در بازبرنامه‌ریزی چیست؟ همان‌طور که گفته شد، c-Myc مشخصاً این فرایند را تسریع می‌کند ولی غیر ضروریست. همچنین سلول‌های iPS انسانی با Oct4, Sox2, Nanog و lin28 نیز قابل استحصال بوده‌اند (lin28 یک پروتئین متصل شونده به ریبوزوم است) [۳۲]. این موضوع نشان می‌دهد که ترکیب‌های متفاوتی از این عوامل می‌تواند باعث بازبرنامه‌ریزی شود. این احتمال وجود دارد که Oct4 بالادستی‌ترین ژن در ارتباطات مولکولی موجود در پرتوانی باشد. چنین به نظر می‌رسد که تنها عامل اجباری برای بازبرنامه‌ریزی Oct4 است و سایر عوامل باعث تسریع و افزایش بازده می‌شوند. در واقع تصور می‌شود که Oct4 چارچوب اولیه بیان ژن‌های مورد نیاز برای پرتوانی را ایجاد می‌کند. در عین حال Sox2 می‌تواند برای انجام این کار با Oct4 هترودمریزه شود [۴۰]. همچنین Klf4 فاکتوری است که بیان ژن p53 را مهار می‌کند، از سوی دیگر می‌دانیم p53 بازدارنده بیان Nanog است. بنابراین Klf4 غیر مستقیم باعث

زنده جنینی نیز شرکت کردند. بنابراین سلول‌های iPS و سلول‌های ES بسیار شبیه یکدیگرند، اگرچه یکسان نیستند [۳۷،۳۴،۳۳]. به‌عنوان مثال سنجش جامع بیان ژن‌ها به کمک ریزآرایه (Microarray) نشان داده است که سلول‌های iPS انسانی در میان ۳۲۲۶۶ ژن مورد بررسی در بیان ۱۲۶۷ ژن بیش از ۵ برابر با سلول‌های بنیادی جنینی تفاوت دارند [۳۷]. ۵ نشانگرهای پرتوانی همچون فسفاتاز قلیایی، SSEA1، Oct4 و Nanog به ترتیب در حین بازبرنامه‌ریزی ظاهر می‌شوند (۳۸، ۳۹، ۴۰). در نهایت، شواهد به‌دست آمده از ناقلین لتی ویروسی نشان می‌دهد که چهار فاکتور رونویسی باید بیش از ۱۲ روز در سلول‌های MEF (Mouse Embryonic Fibroblast) بیان شوند تا iPS تولید شود. از آن پس سلول iPS کاملاً به بیان ژن‌های خود متکی است [۳۸] (شکل ۲).

بیان عوامل بازبرنامه‌ریزی کننده در فیروبلست باعث آغاز یک سری فرایندهای تصادفی می‌شود که در نهایت منجر به ایجاد تعداد اندکی سلول iPS می‌شود. بنابراین، بیان ژن‌های Oct4, Sox2, c-Myc و Klf4 باعث القای یک سری وقایع اپی ژنتیک مانند دگرگونی کروماتینی

بیان Nanog می‌شود، فاکتوری که موجب بقای پرتوانی در سلول‌های بنیادی جنینی می‌شود. Myc فاکتوری است که در طیف وسیعی از عملکردهای سلولی از جمله تقسیم آن نقش دارد. به نظر می‌رسد Myc به‌طور کلی باعث استیله شدن هیستون‌ها می‌شود تا Oct4 و Sox2 بتوانند به جایگاه عملکرد خود متصل شوند. مدل دیگری که برای Myc مطرح می‌شود توانایی آن در به راه انداختن همانندسازی ژنوم سلولی است. بنابراین با همانندسازی DNA، ژنوم فرصت می‌یابد تا الگوی اپی‌ژنتیکی خود را تغییر دهد. از سوی دیگر مشاهده شده که هر یک از فاکتورهای Nanog و Oct4 و Sox2 قادرند به پرموتور یکدیگر و ژن‌های تحت کنترلشان متصل شوند [۴۰]. این موضوع نشان می‌دهد که این ۳ فاکتور در بیان خود با یکدیگر همکاری دارند. بنابراین هنگامی که این ۳ عامل به کمک ناقل ویروسی در سلول تمایز یافته بیان می‌شوند، باعث روشن شدن همین ژن‌ها روی ژنوم سلول می‌شوند. این ۳ فاکتور رونویسی کنترل بیان صدها ژن دیگر از جمله فاکتورهای رونویسی، مسیرهای علامت‌دهی سلولی و دگرگون‌سازی هیستون‌ها را بر عهده دارند. از سوی دیگر این ۳ فاکتور جلوی بیان ژن‌های مخصوص تکوین و تمایز سلولی را گرفته و باعث می‌شوند تا سلول در وضعیت تمایز نیافته باقی بماند.

آزمایش‌ها نشان می‌دهند که فراوانی بازبرنامه‌ریزی و تولید iPS حداکثر ۰/۵ درصد در سلول‌های MEF و در مدت زمان ۳ تا ۴ هفته است [۴۱]. یک سؤال مطرح آن است که چرا بازده تولید سلول‌های iPS بسیار اندک است. یک فرضیه برای پاسخ به این سؤال آن بود که در واقع این سلول‌های بنیادی بافتی هستند که به iPS تبدیل می‌شوند. تاکنون سلول‌های iPS از بافت‌های مختلف موش همچون فیروبلاست [۳۳، ۱۷]، سلول‌های کبد و معده [۴۲]، لنفوسیت B [۴۳] و سلول‌های بتای پانکراس [۴۴] استحصال شده‌اند. بنابراین سلول‌های کاملاً تمایز یافته نیز قابل بازبرنامه‌ریزی به این روش هستند و این موضوع محدود به سلول‌های خاصی همچون سلول‌های بنیادین بافتی نمی‌شود. پرسش دیگر آن است که آیا ورود رتروویروس به ناحیه خاصی از ژنوم الزامی است یا خیر؟ در واقع بررسی محل ورود رتروویروس در گونه‌های iPS به‌دست آمده از سلول‌های کبدی الگوی مشترکی را نشان نمی‌دادند [۴۲]. بنابراین به‌نظر می‌رسید که الحاق ژن

ویروسی در نواحی ویژه‌ای از ژنوم ضروری نباشد؛ اما بررسی جامع‌تری برای صحت این مدعا نیاز است [۴۲]. همان‌طور که قبلاً گفته شد، استحصال سلول‌های iPS اولین بار به واسطه بیان برخی انکوژن‌ها و مقاومت دارویی انجام پذیرفته است. این دو مؤلفه به طور جدی جلوی کاربرد درمانی این سلول‌ها را در انسان می‌گیرد، چرا که موش‌های کایمرای به‌دست آمده از سلول‌های iPS مکرراً دچار سرطان شدند [۳۴]. از سوی دیگر ایجاد مقاومت به دارو در سلول‌های فرد بیمار امکان‌پذیر نیست. برخی از این محدودیت‌ها در آزمایش‌های اخیر مرتفع شده‌اند. به‌عنوان مثال مشاهده شد که c-Myc برای انجام بازبرنامه‌ریزی غیر ضروریست؛ اگرچه فرایند بازبرنامه‌ریزی بسیار به تأخیر می‌افتد و بازده آن به‌شدت کاهش می‌یابد [۳۰-۳۲]. درحالی‌که موش‌های به‌دست آمده از این روش دچار تومورهای ناشی از فعال شدن c-Myc نشدند، نمی‌توان گفت که آیا سایر فاکتورها همچون Oct4 نیز در مراحل بعدی ایجاد تومور می‌نمایند یا خیر [۴۵، ۴۶]. گام دیگر آن بود که انتخاب سلول‌های پرتوان تنها براساس جنبه‌های ریخت‌شناسی (Morphology)، و نه به کمک مقاومت به دارو، انجام گیرد [۳۶، ۴۲]. پس از این مطالعات، سلول‌های iPS انسانی از سلول‌های فیروبلستی، بدون نیاز به مقاومت به دارو جداسازی شدند [۳۷، ۴۱، ۴۷]. این مطلب نشان داد، همان ژن‌هایی که موجب بازبرنامه‌ریزی سلول‌های موشی می‌شوند، می‌تواند سلول‌های انسانی را نیز بازبرنامه‌ریزی نمایند [۳۷].

یکی از امیدهای تولید سلول‌های بنیادی مخصوص هر فرد کاربرد آن‌ها در درمان بیماری‌های ویژه همان فرد است. در این راستا اخیراً سلول‌های iPS حاصل از پوست یک موش مبتلا به آنمی داسی شکل (Sickle Cell Anemia) مورد اصلاح ژنی قرار گرفتند و پس از تمایز به رده‌های هماتوپوئیک (Hematopoietic)، مجدداً به همان موش پیوند زده شدند [۴۹]. نتایج نشان از بهبود پایدار وضعیت سلامتی موش داشته است. در واقع سلول‌های هماتوپوئیک حاصل از سلول‌های iPS اصلاح شده، تا حد زیادی جایگزین سلول‌های معیوب شده بودند [۴۹]. از طرف دیگر مشاهده شد که سلول‌های iPS را می‌توان به سلول‌های پیش‌ساز عصبی (Neural Progenitor Cell: NPC) تمایز داد. در صورت پیوند این سلول‌ها به مغز جنین موش، این سلول‌ها

جدول ۱. آزمون‌های رایج برای محک قدرت تمایزی سلول‌ها

آزمون	هدف	محدودیت‌ها
تمایز در شرایط این‌ویترو	القای تمایز در سلول‌ها و سنجش نشانگرهای مخصوص هر بافت	آزمون نشانگرهای مخصوص هر بافت نشان دهنده کارا بودن آن سلول‌ها نیست. بیان نشانگرها ممکن است به دلیل استرس سلولی باشند.
ایجاد تراکم	ایجاد تومور نشان‌دهنده توانایی سلول‌ها در تمایز به انواع رده‌های سلولی است.	توانایی سلول‌ها را در تکوین طبیعی محک نمی‌زند.
تشکیل کایمرا	شرکت سلول‌ها در تکوین طبیعی پس از تزریق به بلاستوسیت میزبان	سلول‌های میزبانی ممکن است نقص‌های تکوینی سلول‌های تزریق شده را جبران نمایند.
شرکت در لایه زاینده	سنجش توانایی سلول‌های مورد آزمایش از جهت تولید سلول‌های زاینده	نقص‌های ژنتیکی که ممکن است در تکوین مداخله کنند را در نظر نمی‌گیرد.
جبران تراپلوییدی	تزریق سلول‌های مورد آزمایش به بلاستوسیت ۴n کروموزومی. از آنجایی که سلول‌های ۴n کروموزومی نمی‌توانند در رده‌های سوماتیک شرکت کنند، چنین حاصل منحصر از سلول‌های مورد آزمایش تشکیل می‌شود.	این آزمون، سخت‌گیرانه‌ترین محک برای سنجش پرتوانی است، اما توانایی تشکیل جفت و پرده‌های جنینی را ارزیابی نمی‌کند.

به نقاط مختلف مغز مهاجرت کرده و به سلول‌های گلیال و انواع سلول‌های نورونی متمایز می‌شوند [۵۰]. به‌علاوه سلول‌های iPS به نورون‌های دوپامینی مغز میانی تمایز داده شدند و پس از پیوند به مغز موش مدل پارکینسون (Parkinson)، باعث بهبود عملکرد موش شدند [۵۰]. در گامی دیگر دانشمندان توانستند سلول‌های پیش‌ساز بافت عصبی [۵۱] و سلول‌های بنیادی عصبی [۵۲] را با به‌کارگیری فاکتورهای کمتری بازبرنامه‌ریزی نمایند. از آنجایی که سلول‌های بنیادی عصبی خود دارای بیان ژن‌های *Sox2* و *c-Myc* هستند، بازبرنامه‌ریزی آن‌ها تنها با *Oct4* و *Klf4* میسر شد [۵۲]. این نتایج نشان داد که ترکیب فاکتورهای لازم برای بازبرنامه‌ریزی سلول‌ها به پیش‌زمینه سلول نیز بستگی دارد.

۷- انتقال هسته در مقایسه با بازبرنامه‌ریزی

به کمک فاکتورهای رونویسی

از آنجایی که بازبرنامه‌ریزی با انتقال هسته و یا به کمک فاکتورهای رونویسی منجر به تولید سلول‌های پرتوان و شبه ES می‌گردد، این سؤال مطرح می‌شود که آیا مکانیسم‌های مولکولی مشابهی مسئول ایجاد وضعیت اپی‌ژنتیک مشابه هستند یا خیر. با توجه به موارد زیر این موضوع بعید به نظر می‌رسد: (۱) به خوبی آشکار شده است که سلول دهنده هسته در

SCNT باید در وضعیت عدم تقسیم باشد (۲). در حالی که تولید iPS به تقسیمات فعال سلول سوماتیک وابسته است. (۲) بازبرنامه‌ریزی با SCNT در مقایسه با تولید iPS در مدت زمان کوتاه‌تری انجام می‌گیرد. برای مثال، *Oct4* در جنین کلون شده در حالت ۲ تا ۴ سلولی فعال می‌شود [۵۳] و عمده تغییرات کروماتینی اندکی پس از انتقال هسته‌ای مشاهده می‌شوند [۵۴]. بر عکس، تولید iPS یک فرایند طولانی است که چند هفته به طول می‌انجامد. (۳) اگرچه مکانیسم مولکولی بازبرنامه‌ریزی در روش SCNT روشن نشده است، اما به نظر نمی‌رسد که بیان بالای انکوژن‌هایی همچون *c-Myc* و *Klf4* نقش مهمی در آن داشته باشد.

۸- دورنمای بازبرنامه‌ریزی

تولید سلول‌های پرتوان مخصوص هر بیمار به روش SCNT به دلیل مشکلات تکنیکی و محدودیت‌های اخلاقی امکان‌پذیر به نظر نمی‌رسد. ابداع بازبرنامه‌ریزی به کمک فاکتورهای رونویسی مشخص گامی نوین در زمینه درمان‌های مخصوص هر فرد محسوب می‌شود، اگرچه کاربرد آن برای درمان بیمار با چندین چالش روبروست. به‌نظر می‌رسد که انکوژن‌هایی همچون *c-Myc* و *Klf4* را می‌توان حذف کرد [۳۰-۳۲]، اما انتقال ژن *Oct4* به سلول همچنان نگران‌کننده است چرا که خود *Oct4* نیز یک انکوژن قویست [۴۵، ۴۶].

شوند. در واقع این مولکول‌ها می‌توانند در بازبرنامه‌ریزی سلول‌ها ایفای نقش کنند. به‌عنوان مثال والپروئیک اسید (Valproic acid) که یک هیستون داستیلاز است، می‌تواند جایگزین c-Myc شود بدون آن که بازده کار کاهش یابد [۵۶]. گروهی دیگر متوجه اثر BIX-01294 شدند. این مولکول یک بازدارنده G9a- هیستون متیل ترانسفراز است و می‌تواند جایگزین Oct4 در تولید iPS از سلول‌های پیش‌ساز عصبی شود [۵۷]؛ اگرچه بازده کار کاهش می‌یابد.

به‌نظر می‌رسد هنوز راه درازی بر سر کاربرد بالینی بازبرنامه‌ریزی وجود دارد. ما در میانه راه ایستاده‌ایم اما بازبرنامه‌ریزی کردن سلول‌ها به طرق مختلف حداقل می‌تواند ما را در پی‌بردن به مکانسیم‌های کنترلی ژنوم و سلول یاری کند.

Klf4 نیز بسته به شرایط سلول می‌تواند به‌عنوان یک انکوژن عمل کند [۵۵]. همچنین، استفاده از ناقلین رتروویروسی خطر جهش‌های ناشی از ورود ویروس به ژنوم را دارد و ممکن است برخی ژن‌ها را از کار بیندازد یا برخی انکوژن‌ها را فعال سازد. بنابراین برای فایق آمدن بر این موانع تکنیکی به‌منظور کاربردهای بالینی این روش می‌بایست به مسیرهای مولکولی بازبرنامه‌ریزی پی برد. این امر، ابداع روش‌های جایگزین برای بازبرنامه‌ریزی در شرایط محیط آزمایشگاه را میسر می‌کند؛ روش‌هایی که نیازمند استفاده از عوامل زیان‌بار مثل فاکتورهای رونویسی و رتروویروس نباشند. تلاش‌های مداوم نوید به‌کارگیری مولکول‌های شیمیایی کوچک به جای فاکتورهای رونویسی را می‌دهند. در یک تحقیق دانشمندان به‌دنبال استفاده از مولکول‌هایی بودند که می‌توانند باعث دگرگونی کروماتینی

۹- منابع

- [1] Fathi F, Kermani AJ, Pirmoradi L, Mowla SJ, Asahara T. Characterizing endothelial cells derived from the murine embryonic stem cell line CCE. *Rejuvenation Res* 2008; 11(2): 371-8.
- [2] Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997; 385(6619): 810-3.
- [3] Gan Q, Yoshida T, McDonald OG, Owens GK. Concise review: epigenetic mechanisms contribute to pluripotency and cell lineage determination of embryonic stem cells. *Stem Cells* 2007; 25(1): 2-9.
- [4] Surani MA, Hayashi K, Hajkova P. Genetic and epigenetic regulators of pluripotency. *Cell* 2007; 128(4): 747-62.
- [5] Eggan K, Akutsu H, Loring J, Jackson-Grusby L, Klemm M, Rideout WM 3rd, Yanagimachi R, Jaenisch R. Hybrid vigor, fetal overgrowth, and viability of mice derived by nuclear cloning and tetraploid embryo complementation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(11): 6209-14.
- [6] Nagy A, Gocza E, Diaz EM, Prideaux VR, Ivanyi E, Markkula M, Rossant J. Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse. *Development* 1990; 110(3): 815-21.
- [7] Yang X, Smith SL, Tian XC, Lewin HA, Renard JP, Wakayama T. Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning. *Nat Genet* 2007; 39(3): 295-302.
- [8] Hochedlinger K, Rideout WM, Kyba M, Daley GQ, Blelloch R, Jaenisch R. Nuclear transplantation, embryonic stem cells, and the potential for cell therapy. *Hematol* 2004; 5(suppl 3): S114-7.
- [9] Solter D. From teratocarcinomas to embryonic stem cells and beyond: a history of embryonic stem cell research. *Nat Rev Genet* 2006; 7(4): 319-27.
- [10] Zwaka TP, Thomson JA. A germ cell origin

- of embryonic stem cells? *Development* 2005; 132(2): 227-33.
- [11] Do JT, Scholer HR. Nuclei of embryonic stem cells reprogram somatic cells. *Stem Cells* 2004; 22(6): 941-9.
- [12] Matsumura H, Tada M, Otsuji T, Yasuchika K, Nakatsuji N, Surani A, Tada T. Targeted chromosome elimination from ES-somatic hybrid cells. *Nat. Methods* 2007; 4(1): 23-5.
- [13] Taranger CK, Noer A, Sorensen AL, Hakelien AM, Boquest AC, Collas P. Induction of dedifferentiation, genomewide transcriptional programming, and epigenetic reprogramming by extracts of carcinoma and embryonic stem cells. *Mol Biol Cell* 2005; 16(12): 5719-35.
- [14] Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Lee J, Yoshimoto M, Ogonuki N, Miki H, Baba S, Kato T, Kazuki Y, Toyokuni S, Toyoshima M, Niwa O, Oshimura M, Heike T, Nakahata T, Ishino F, Ogura A, Shinohara T. Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell* 2004; 119(7): 1001-12.
- [15] Guan K, Nayernia K, Maier LS, Wagner S, Dressel R, Lee JH, Nolte J, Wolf F, Li M, Engel W, Hasenfuss G. Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature* 2006; 440(7088): 1199-203.
- [16] Anjamrooz SH, Movahedin M, Tiraihi T, Mowla SJ. In vitro effects of epidermal growth factor, follicle stimulating hormone and testosterone on mouse spermatogonial cell colony formation. *Reprod Fertil Dev* 2006; 18(6): 709-20.
- [17] 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.
- [18] Yaghoobi MM, Mowla SJ, Tiraihi T. Nucleostemin, a coordinator of self-renewal, is expressed in rat marrow stromal cells and turns off after induction of neural differentiation. *Neurosci Lett* 2005; 390(2): 81-6.
- [19] Atlasi Y, Mowla SJ, Ziaee SA, Gokhale PJ, Andrews PW. OCT4 spliced variants are differentially expressed in human pluripotent and non-pluripotent cells. *Stem Cells* 2008; [Epub ahead of print]
- [20] Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* 2000; 24(4): 372-6.
- [21] Masui S, Nakatake Y, Toyooka Y, Shimosato D, Yagi R, Takahashi K, Okochi H, Okuda A, Matoba R, Sharov AA, Ko MS, Niwa H. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol* 2007; 9(6): 625-35.
- [22] Zhang W, Geiman DE, Shields JM, Dang DT, Mahatan CS, Kaestner KH, Biggs JR, Kraft AS, Yang VW. The gut-enriched Kruppel-like factor (Kruppel-like factor 4) mediates the transactivating effect of p53 on the p21WAF1/Cip1 promoter. *J Biol Chem* 2000; 275(24): 18391-8.
- [23] Yoon HS, Chen X, Yang VW. Kruppel-like factor 4 mediates p53-dependent G1/S cell cycle arrest in response to DNA damage. *J Biol Chem* 2003; 278(4): 2101-5.
- [24] Shields JM, Christy RJ, Yang VW. Identification and characterization of a gene encoding a gut-enriched Kruppel-like factor expressed during growth arrest. *J Biol Chem* 1996; 271(33): 20009-17.
- [25] Ghaleb AM, McConnell BB, Nandan MO, Katz JP, Kaestner KH, Yang VW. Haploinsufficiency of Kruppel-like factor 4

- promotes adenomatous polyposis coli dependent intestinal tumorigenesis. *Cancer Res* 2007; 67(15): 7147-54.
- [26] Nair SK, Burley SK. X-ray structures of Myc-Max and Mad-Max recognizing DNA. Molecular bases of regulation by proto-oncogenic transcription factors. *Cell* 2003; 112(2): 193-205.
- [27] Dominguez-Sola D, Ying CY, Grandori C, Ruggiero L, Chen B, Li M, Galloway DA, Gu W, Gautier J, Dalla-Favera R. Non-transcriptional control of DNA replication by c-Myc. *Nature* 2007; 448(7152): 445-51.
- [28] Cole MD. The myc oncogene: its role in transformation and differentiation. *Annu Rev Genet* 1986; 20: 361-84.
- [29] Ivanova N, Dobrin R, Lu R, Kotenko I, Levorse J, DeCoste C, Schafer X, Lun Y, Lemischka IR. Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference. *Nature* 2006; 442(7102): 533-8.
- [30] Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Okita K, Mochiduki Y, Takizawa N, Yamanaka S. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 2008; 26(1): 101-6.
- [31] Wernig M, Meissner A, Cassady JP, Jaenisch R. c-Myc is dispensable for direct reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell* 2008; 2(1): 10-2.
- [32] Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007; 318(5858): 1917-20.
- [33] Maherali N, Sridharan R, Xie W, Utikal J, Eminli S, Arnold K, Stadtfeld M, Yachechko R, Tchieu J, Jaenisch R, Plath K, Hochedlinger K. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell* 2007; 1(1): 55-70.
- [34] Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 2007; 448(7151): 313-7.
- [35] Jahner D, Stuhlmann H, Stewart CL, Harbers K, Lohler J, Simon I, Jaenisch R. De Novo methylation and expression of retroviral genomes during mouse embryogenesis. *Nature* 1982; 298(5875): 623-8.
- [36] Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 1999; 99(3): 247-57.
- [37] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131(5): 861-72.
- [38] Brambrink T, Foreman R, Welstead GG, Lengner CJ, Wernig M, Suh H, Jaenisch R. Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. *Cell Stem Cell* 2008; 2(2): 151-9.
- [39] Stadtfeld M, Maherali N, Breault DT, Hochedlinger K. Defining molecular cornerstones during fibroblasts to iPS cell reprogramming in mouse. *Cell stem cell* 2008; 2(3): 230-40.
- [40] Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, Guenther MG, Kumar RM, Murray HL, Jenner RG, Gifford DK, Melton DA, Jaenisch R, Young RA. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 2005; 122(6): 947-56.

- [41] Meissner A, Wernig M, Jaenisch R. Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 2007; 25(10): 1177-81.
- [42] Aoi T, Yae K, Nakagawa M, Ichisaka T, Okita K, Takahashi K, Chiba T, Yamanaka S. Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science* 2008; 321(5889): 699-702.
- [43] Hanna J, Markoulaki S, Schorderet P, Carey BW, Beard C, Wernig M, Creighton MP, Steine EJ, Cassady JP, Foreman R, Lengner CJ, Dausman JA, Jaenisch R. Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. *Cell* 2008; 133(2): 250-64.
- [44] Stadtfeld M, Brennand K, Hochedlinger K. Reprogramming of pancreatic beta cells into induced pluripotent stem cells. *Curr Biol* 2008; 18(12): 890-4.
- [45] Hochedlinger K, Yamada Y, Beard C, Jaenisch R. Ectopic expression of Oct-4 blocks progenitor-cell differentiation and causes dysplasia in epithelial tissues. *Cell* 2005; 121(3): 465-77.
- [46] Atlasi Y, Mowla SJ, Ziaee SA, Bahrami AR. OCT-4, an embryonic stem cell marker, is highly expressed in bladder cancer. *Int J Cancer* 2007; 120(7): 1598-602.
- [47] Bluelloch R, Venere M, Yen J, Ramalho-Santos M. Generation of induced pluripotent stem cells in the absence of drug selection. *Cell Stem Cell* 2007; 1(3): 245-7.
- [48] Park IH, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo H, Ince TA, Lerou PH, Lensch MW, Daley GQ. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 2008; 451(7175): 141-6.
- [49] Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, Sun CW, Meissner A, Cassady JP, Beard C, Brambrink T, Wu LC, Townes TM, Jaenisch R. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science* 2007; 318(5858): 1920-3.
- [50] Wernig M, Zhao JP, Pruszak J, Hedlund E, Fu D, Soldner F, Broccoli V, Constantine-Paton M, Isacson O, Jaenisch R. Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(15): 5856-61.