سلول‌های بنیادی چندتوان القا شده در پژوهش و درمان بیماری‌ها: *مقاله مروری*

محمدرضا نوری دلویی *
آرش سلمانی‌نژاد
مینا تبریزی

گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

دریافت: ۱۳۹۳/۰۲/۲۹ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۴/۰۱ آنلاین: ۱۳۹۳/۰۷/۱۵

چکیده

سلول‌های تمایزیافته می‌توانند با برنامه‌ریزی دوباره به سلول‌های بنیادی تبدیل شوند. تولید سلول‌های بنیادی چندتوان القا شده (iPSCs) انقلابی در حوزه پزشکی باززاینده (Regenerative medicine) و پزشکی انفرادی (Personalized medicine) ایجاد کرده است. iPSCs توانایی خود نوزایی دارند و به‌شمار زیادی از رده‌های سلولی تمایز پیدا می‌کنند. این سلول‌ها منبع پایان‌ناپذیری را برای تمایز هدف‌دار معرفی می‌کنند. iPSCs می‌توانند از انواع متفاوت سلول‌های جنینی و بالغ، به‌واسطه بیان مجموعه‌ای از عامل‌های رونویسی ایجاد شوند، این فناوری پژوهشگران را قادر ساخت تا سلول‌های تمایزیافته را از فرد خاصی گرفته و به رده‌های سلولی دیگر برای آن شخص تبدیل کنند. از آن‌جا که سلول‌های iPS از جهات مولکولی و عملکردی به سلول‌های بنیادی جنینی (Embryonic Stem Cell, ESC) شباهت دارند، منبعی برای الگوسازی بیماری به‌حساب می‌آیند، به‌ویژه که بسیاری از چالش‌های مربوط به ایمنی، کارآمدی و اخلاق زیستی آنها مرتفع شده است. سلول‌های iPS ساخته‌شده از سلول‌های سوماتیک بیمار، یک منبع مفید برای کشف و غربالگری دارو و نیز درمان با واسطه پیوند سلولی را معرفی می‌کند. این مقاله‌ی مروری، نحوه‌ی ایجاد این سلول‌ها و نیز عامل‌ها و ژن‌های لازم برای چندتوانی و نیز پیشرفت‌های جاری در تولید iPSCs را با استفاده از ده‌ها منبع معتبر و به‌روز مورد بحث قرار داده است.

کلمات کلیدی: سلول‌های بنیادی چندتوان (Pluripotent) القا شده، برنامه‌ریزی دوباره هسته‌ای، تمایززدایی، درمان.

* نویسنده مسئول: تهران، بلوار کشاورز، خیابان قدس، خیابان پورسینا، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، گروه ژنتیک پزشکی تلفن: ۸۸۹۵۳۰۰۵-۰۲۱
E-mail: nooridaloii@sina.tums.ac.ir

مقدمه

در سال ۲۰۰۶ گروه Yamanaka نشان داد که سلول‌های فیبروبلاست موش می‌توانند با برنامه‌ریزی دوباره (Reprogramming) به سلول‌های چندتوان تبدیل شوند. سلول‌های تمایزیافته می‌توانند تحت برنامه‌ریزی دوباره با انتقال محتویات هسته‌ای به تخمک یا به واسطه ادغام با سلول‌های بنیادی جنینی (ESC)، به‌حالت شبه‌جنینی در آیند. این کار برای نخستین‌بار به‌وسیله انتقال رتروویروسی (Retroviral transduction) ژن‌های POU5F1 (OCT4)، SOX2، KLF4 و c-MYC انجام گرفت. Yamanaka از این فناوری با نام "سلول‌های بنیادی چندتوان القاشده" (Induced Pluripotent Stem Cells, iPSCs) یاد کرد. این سلول‌ها از لحاظ ویژگی‌های شکل‌شناسی، تکثیر و رشد، آنتی‌ژن‌های سطحی، بیان ژن، وضعیت اپی‌ژنتیکی و فعالیت تلومرازی شبیه سلول‌های ES هستند و ژن‌های نشانگر آن را بیان می‌کنند. پیوند زیرجلدی سلول‌های iPS به موش‌هایی که از لحاظ سیستم ایمنی ضعیف شده باشند (موش‌های برهنه، Nude mice) منجر به ایجاد تومورهای حاوی انواع بافت‌ها از هر سه لایه زایا می‌شود و تزریق این سلول‌ها به بلاستوسیت موش نیز در توسعه جنینی نقش دارد.[1و2] کارهای تکمیلی البته نشان داده است که MYC برای این امر ضروری نیست و تنها در افزایش کارایی و سرعت برنامه‌ریزی دوباره نقش

دارد بدین‌معنی که در صورت نبود MYC این سرعت به نصف کاهش می‌یابد.[۳]

پژوهش‌های مربوط به این موضوع با فهرست ۲۴ تایی از ژن‌هایی شروع شد که با مطالعه بر روی سلول‌های بنیادی موش نشان دادند که این ژن‌ها نسبت به سلول‌های غیر چندتوان افزایش بیان دارند. در ابتدا این ژن‌ها به‌عنوان نامزد برای القای چندتوانی معرفی شدند.[۴] در نهایت، در سال ۲۰۰۷-۲۰۰۶ Yamanaka و همکاران به‌ترتیب موفق به برنامه‌ریزی دوباره سلول‌های تمایزیافته موشی و سپس انسانی با همان چهار عامل شدند. همچنین با اندکی تغییر در ترکیب این عامل‌ها و برای نمونه، استفاده از OCT4، SOX2، NANOG و پروتیین‌های متصل‌شونده به RNA (LIN28) نشان داده شد که می‌توان برنامه‌ریزی دوباره را به جریان انداخت.[۵] در پی آن معلوم گردید که تنها OCT4، SOX2 در حضور مواد شیمیایی مهارکننده هیستون داستیلاز (مانند والپوریک اسید) می‌توانند به برنامه‌ریزی دوباره فیبروبلاست‌های انسانی منجر شوند.[۶] این مشاهدات نشان داد که جرح و تعدیل (Modification) کروماتین نقش مهمی در برنامه‌ریزی دوباره سلولی ایفا می‌کند.[۷]

hiPSCs در ابتدا از سلول‌های جنینی و فیبروبلاستی و سپس از انواع دیگر هم تولید شدند. این سلول‌ها در شرایط آزمایشگاهی (In vitro)، نیز می‌توانند به انواع سلول از سه لایه زایا تبدیل شوند. بنابراین، موفقیت در برنامه‌ریزی دوباره سلول‌های تمایزیافته انسانی و تبدیل آنها به‌حالت چندتوان، امکان ایجاد سلول‌های بنیادی بیمار و نیز ویژه‌ی بیماری را فراهم آورد.[۲] پیشرفت‌های اخیر در فناوری iPSCs موجب شده است تا سلول‌های انسانی مورد نیاز در درمان انواعی از بیماری‌ها در دسترس باشد.[۸] به‌خاطر این دستاوردهای ارزشمند و افزایش مقاله‌های معتبر به‌چاپ رسیده در سال ۲۰۱۲ به Yamanaka جایزه نوبل در رشته پزشکی اعطا شد.

سلول‌های ES بنیادی جنینی که از توده سلولی درونی بلاستوسیست‌های پستانداران مشتق شده باشد، توانایی رشد نامحدود دارند و در حالی‌که بس توانی (Totipotency) خود را حفظ می‌کنند، می‌توانند به سلول‌های هر سه لایه زایا تمایز یابند.[۹-۱۱] سلول‌های بنیادی جنینی انسانی می‌توانند برای درمان شمار زیادی از بیماری‌ها مانند پارکینسون، آسیب نخاعی و دیابت استفاده شود.[۱۲] با این حال، مشکلات اخلاقی مربوط به استفاده از جنین انسان و همچنین مشکل رد بافت پس از پیوند در بیماران وجود دارد. یک راه برای غلبه به این چالش‌ها، تولید سلول‌های چندتوان به‌طور مستقیم از سلول‌های فرد بیمار است. سلول‌های سوماتیک می‌توانند با انتقال محتویات هسته‌ای آنها به تخمک بدون هسته[۱۳] یا با همیوغی این سلول‌ها با سلول‌های ES[۱۴-۱۶] تحت برنامه‌ریزی دوباره قرار گیرند. این مطالعات نشان داده است که تخمک بارور نشده و سلول‌های ES شامل عامل‌هایی است که می‌تواند بس توانی و چندتوانی را به سلول‌های سوماتیک اعطا کند. این عامل‌ها که درونی و بیرونی می‌باشند، مهم هستند و موجب حفظ چندتوانی، خودزایی و سرکوب تمایز می‌شوند.[۱۷]

برای نمونه پیام‌دهی به‌وسیله سایتوکین LIF منجر به فعال‌شدن عامل‌های رونویسی STAT3 می‌شود که می‌تواند سبب تنظیم بیان شماری ژن‌های لازم برای ایجاد سلول‌های ES شود.[۱۸] بنابراین، این عامل‌ها نقش بسیار حیاتی در حفظ و القای چندتوانی دارند و شناسایی آنها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است، مشخص شده است که چند عامل رونویسی از جمله: OCT3/4،[۱۹] SOX،[۲۰] NANOG[۲۱] و Rex1 در این امر نقش دارند. همچنین ESCهای مشتق‌شده از انسان، مارکرهای چندتوانی ویژه‌ای را مانند TRA-1-60، TRA-1-81، SSEA4، TERT، Rex1 بیان می‌کنند.[۶و۲۲] POU5F1، (CRIPTO)TDGF1، SALL4، LECT1 و BUB1 نیز ژن‌های دیگر مرتبط با خودزایی، تمایز و چندتوانی هستند.[۲۳] ژن‌هایی، مانند: STAT3،[۲۴] E-RAS،[۴] C-MYC،[۲۵] KLF4[۲۶] و b-catenin[۲۷] که اغلب در تومورها افزایش بیان نشان می‌دهند برای حفظ درازمدت فنوتیپ سلول‌های ES و تکثیر سریع آنها در محیط کشت نقش دارند. پس از القای عامل‌های اصلی برنامه‌ریزی دوباره (عامل‌های Yamanaka) به سلول‌ها، چندتوانی سلول‌ها از طریق بیان القا شده ژن‌های OCT4، SOX2 و نیز با توانایی این سلول‌ها در تشکیل تراتوم و بیان Fbx15 که یک مارکر بیانی ویژه برای سلول‌های بنیادی جنینی است، تایید می‌شود. لازم به ذکر است که ژن‌های داخلی OCT4 و NANOG پروموتر متیله دارند و در سطح پایینی بیان می‌شوند.[۶] همچنین برای ایجاد سلول‌های iPS از برخی رده‌های سلولی، حضور چهار عامل اصلی ذکر شده به‌تنهایی کافی نیست. برای نمونه افزایش بیان ژن C/EBPα یا از کار انداختن ژن PAX5 در ایجاد سلول‌های iPS از سلول‌های B بالغ موش مورد نیاز است.[۲۸]

با توجه به اهمیت مطلب، مواردی از ویژگی‌های ژن‌های مهم و مرسوم که ثابت شده است به‌صورت غالب می‌توانند سبب القای

چندتوانی، به سلول بالغ و تمایز یافته شوند در زیر مورد تاکید قرار گرفته است.

POU5F1: POU5F1 (که OCT3/4، OCT3، octamer-binding transcription factor 4, OCT4 نیز نامیده می‌شود) یک عامل رونویسی داری قلمرو POU (Domain) است که توسط ژن POU5F1 کد می‌شود. این ژن دارای نقش بسیار اساسی در سلول‌های ES و نیز در جنین موش دارد به‌طوری که در غیاب این عامل رونویسی، توده‌ی سلولی درونی تخریب‌شده و اندودرم جنینی قادر به بقا نیست. بنابراین، سلول‌های ES از موش‌های دارای جهش در این ژن حاصل نمی‌شود. این ژن در مراحل اولیه تکامل زیستی موش در مقایسه با مراحل انتهایی، نقش متفاوتی دارد.[۲۹] با این حال، POU5F1 برای خودزایی سلول‌های بنیادی سوماتیکی در طیف گسترده‌ای از اندام‌ها مورد نیاز نمی‌باشد. اگرچه POU5F1 سلول‌های بالغ سوماتیک را قادر می‌سازد تا بتوانند به‌حالت شبه-ES برگردند، و به‌نظر نمی‌رسد که برای خودزایی سلول‌های بنیادی سوماتیک لازم باشد.[۳۰] POU5F1 موجب جلوگیری از تمایز بیش از حد می‌شود. این ژن در جنین مهره‌داران و نیز سلول‌های بنیادی و چندتوان افزایش بیان دارد و نیز در تومورهای سلول‌های زایا و تعداد اندکی از تومورهای سوماتیکی بیان قابل‌ملاحظه نشان می‌دهد.[۳۱]

برای تولید سلول iPS، ژن OCT4 را نمی‌توان با دیگر اعضای خانواده این ژن مانند OCT1 یا OCT6 جایگزین کرد. چند کمک عامل (Cofactor) کلیدی که همراه با OCT4 در سلول‌های ES عمل می‌کنند، شناخته شده است. این ژن به‌همراه SOX2 و NANOG در هسته شبکه عامل رونویسی تنظیم‌کننده چندتوانی، در سلول‌های ES عمل می‌کند. این سه ژن به‌صورت عناصر تقویت‌کننده، بیان ژن‌های لازم برای چندتوانی را با همکاری هم افزایش می‌دهند و سبب سرکوب ژن‌های مورد نیاز برای تمایز می‌شوند.[۳۲] OCT4 و SOX2 به اهداف رونویسی خود در یک مجموعه سه‌تایی پروتیین-DNA متصل شده و موجب افزایش بیان خود و همچنین NANOG در سلول‌های ES می‌شوند.[۳۳و۳۴]

SOX2: عامل رونویسی SOX2 دارای جعبه SRY است. این خانواده پروتیینی دارای یک قلمرو مشترک بسیار حفاظت‌شده متصل‌شونده به DNA است که به قلمرو High Mobility Group (HMG) معروف است و دارای ۸۰ اسیدآمینه می‌باشد. از این پروتیین به‌مقدار زیاد برای فعالیت برنامه‌ریزی دوباره استفاده می‌شود و به‌عنوان کمک‌عامل با OCT4 عمل می‌کند. جهش‌یافته‌های دارای جهش در SOX2 فنوتیپ مشابه با جهش‌یافته‌های OCT4 نشان می‌دهند. بنابراین جهش در ژن SOX2 در مراحل اولیه رویانی کشنده بوده و از این‌رو، وجود این ژن بسیار ضروری است. با این حال ژن SOX2 را می‌توان با Sox1 جایگزین کرد. پیشنهاد شده است که پروتیین SOX2 مادری در جهت‌گیری‌های اولیه دودمان سلولی نقش دارد.[۳۵] مشابه با OCT4، پروتیین SOX2 نیز برای حفظ چندتوانی و خودنوزایی در سلول‌های ES ضروری است. سلول‌های ES از جنین‌هایی که دارای جهش در SOX2 هستند مشتق نمی‌شود.[۲۰] نیاز به SOX2 در رده‌های سلولی ES مورد تاکید قرار گرفته است به‌طوری که کاهش سطح SOX2 در رده سلولی ES منجر به تشکیل سلول‌های شبه‌تروفوبلاست می‌شود. نقش اصلی SOX2 افزایش بیان OCT4 است که همراه با این ژن بیان خود را نیز افزایش می‌دهد. با این وجود دایمر شدن این دو عامل برای فعال‌سازی شبکه ژن‌های مورد نیاز برای چندتوانی ضروری نیست، شایان ذکر است که بیان بیش از حد SOX2 بیان خود این ژن و نیز بیان چهار ژن هدف دیگر یعنی OCT3/4، NANOG، FGF4 و UTF1 را کاهش می‌دهد.

این احتمال را که بیان بالای SOX2 در سلول‌های ES می‌تواند موجب آغاز تمایز آن شود، تقویت کرد. Kopp و همکاران نشان دادند که افزایش اندک (دو برابر یا کمتر) در پروتیین SOX2 می‌تواند سبب آغاز تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به طیف گسترده‌ای از انواع سلول‌های تمایز یافته، مانند نورواکتودرم، مزودرم و تروفواکتودرم اما نه آندودرم شود. همچنین، افزایش سریع سطح SOX2 موجب کاهش تنظیم بیان چندین ژن موثر در تکامل زیستی، از جمله NANOG و OCT3/4 و ژن تازه شناسایی‌شده LEFTY1 می‌شود. با عنایت به این یافته‌ها، می‌توان استدلال کرد که خودنوزایی سلول‌های ES مستلزم آن است که سطح SOX2 در محدوده‌های اندک نگه‌داری شود. بنابراین، به‌نظر می‌رسد که SOX2 به‌عنوان یک دستگاه تنظیم جریان‌های متغیر مولکولی مطرح است که بیان مجموعه‌ای مهم از ژن‌های جنینی و نیز خودنوزایی و تمایز سلول‌های بنیادی جنینی را کنترل می‌کند.[۳۶]

NANOG: این پروتیین، یک عامل رونویسی همئوباکس است که دارای ۳۰۵ اسیدامینه می‌باشد و در برنامه‌ریزی دوباره سلول‌های انسانی دارای نقش اساسی است.[۵] پروتیین NANOG انسانی دارای انتهایی آمینی و کربوکسیلی می‌باشد که انتهای آمینی غنی از اسید آمینه‌های پرولین،

ترئونین و سرین و انتهای کربوکسیلی دارای تکرار اسید آمینه‌های تریپتوفان است. این عامل همراه با دو عامل مورد اشاره موجب حفظ چندتوانی می‌شود و حضور آن برای خودزایی ضروری نیست. بیان غیرطبیعی یک ژن مانند NANOG، NAT1، GRB2، APC سبب مقاومت سلول‌های ES به تمایز می‌شود.[۳۷و۴] افزایش بیان NANOG در سلول‌های ES موشی در غیاب عامل‌های اساسی خودزایی مانند سایتوکین LIF می‌تواند از تمایز جلوگیری کند.[۲۱] این پروتیین به‌عنوان یک فعال‌کننده رونویسی در پروموتر ژن REX1 (ZFP42) اثر می‌کند و در حفظ بیان این ژن نقش کلیدی دارد. ژن REX1 به‌عنوان یک نشانگر در سلول‌های ES و سلول‌های تراتوکارسینوما مطرح است، از کار انداختن ژن NANOG در سلول‌های ES به کاهش بیان ژن REX1 منجر می‌شود.[۳۸]

KLF4: KLF4 متعلق به خانواده بزرگ شبیه Krupple است. این خانواده جز عامل‌های رونویسی بوده و دارای قلمرو انگشت روی می‌باشد.[۳۹] از دست رفتن KLF4 به مرگ جنین منجر نمی‌شود اما نقص چندین دودمان پس از تولد مانند سلول‌های پوست و گوبلت در روده بزرگ را در پی دارد. همچنین کاهش KLF4 در سلول‌های ES موجب کاهش توانایی خودنوزایی یا توسعه و تکوین نمی‌گردد.[۳۹و۴۰] با این حال، دو عامل KLF دیگر (KLF2 و KLF5) در سلول‌های ES همزمان با KLF4 بیان می‌شوند.[۴۰] ثابت شده است که با کاهش یکایک عامل‌های KLF بیان شده در سلول‌های ES و نیز کاهش ترکیب دوتایی آنها در خودنوزایی این سلول‌ها اختلالی ایجاد نمی‌شود، اگرچه از دست رفتن همزمان هر سه عامل KLF موجب تمایز و کاهش میزان تکثیر می‌شود.[۴۰] افزایش بیان KLF4 می‌تواند به کاهش تمایز سلول‌های ES بیانجامد.[۴۱]

افزون بر این آنالیز گسترده ژنوم مشخص کرده است که عامل‌های KLF به عناصر تنظیمی مشخصی از OCT4، SOX2، NANOG و بسیاری از ژن‌های دخیل در چندتوانی متصل می‌شود. بنابراین KLF می‌تواند در تنظیم شبکه چندتوانی شرکت کند. یک سازوکار پیشنهادی برای حفظ خودنوزایی در سلول‌های ES با واسطه KLF5، درگیر کردن مسیر TCL1-AKT است، به‌نحوی که در غیاب KLF 5 در سلول‌های ES سطح Akt و نیز Tcl1 فسفریله کاهش می‌یابد. این مشاهدات نشان می‌دهد که عامل KLF ممکن است. خودنوزایی را از طریق علامت‌دهی Akt تنظیم کند. همچنین، KLF4 از طریق سرکوب بیان p53 قادر است در خلال برنامه‌ریزی دوباره، موجب افزایش بیان NANOG شود.[۳و۴۲]

MYC: MYC، یک ژن تنظیم‌کننده است که یک عامل رونویسی با قلمرو زیپ لوسین/ حلقه پیچ حلقه Helix-Loop-Helix/ Leucine Zipper (bHLH/LZ) را کد می‌کند. این ژن، در ژنوم انسان روی کرومزوم هشت قرار گرفته است و از طریق اتصال به توالی مورد توافق Enhancer box sequences (توالی جعبه افزایش‌دهنده) و در اختیار گرفتن Histone Acetyltransferases (HATs) در تنظیم بیان ۱۵٪ از کل ژن‌ها نقش دارد.[۴۳و۴۴] این ژن برای برنامه‌ریزی دوباره و نیز اختصاصی‌شدن اولیه دودمان سلولی ضروری به‌نظر نمی‌رسد. با این وجود، در صورتی که این ژن در جنین، از کار افتاده باشد در روز ۹ یا ۱۰ جنینی با یک فنوتیپی که مشخص‌کننده عدم رشد و تکثیر نامناسب اندام‌ها است، منجر به مرگ می‌شود.[۴۵]

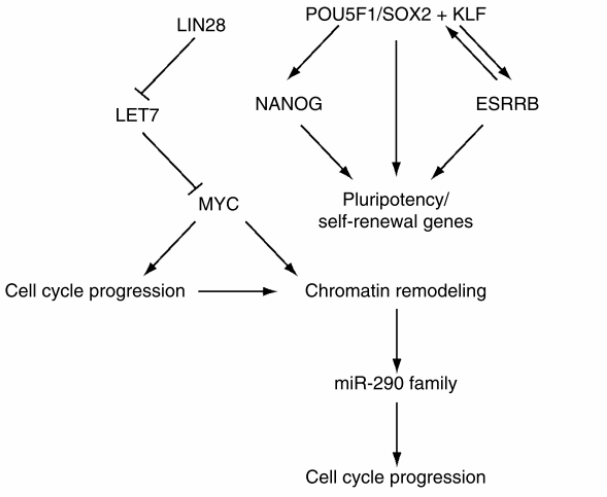
وجود MYC برای تمایز، تنظیم و خودنوزایی سلول‌های بنیادی اریتروبلاست و هماتوپویتیک تا حدودی به عملکرد این ژن بستگی دارد.[۴۶] جهش در این ژن موجب بیان تنظیم‌نشده بسیاری از ژن‌ها می‌شود، که اکثر آنها سبب افزایش تکثیر و در نتیجه سرطان می‌شوند. به‌همین دلیل شکل جهش‌یافته MYC در طیف وسیعی از سرطان‌ها دیده می‌شود. بنابراین به‌عنوان هدف دارویی در درمان سرطان مطرح است. این ژن به عنوان عامل رونویسی سرکوب‌کننده نیز مطرح است، به‌طوری که با اتصال به عامل رونویسی Miz1 و جابه‌جایی کمک فعال‌کننده p300 به ممانعت از بیان ژن‌های هدف Miz1 منجر می‌شود.

همچنین، MYC نقش مستقیمی در کنترل همانندسازی DNA دارد.[۴۷] MYC توسط علایم گوناگون مانند Wnt, Shh و Egf (از طریق مسیر MAPK/ERK) می‌تواند فعال شود. این ژن دارای اثرات متعددی مشتمل بر ظرفیت هدایت تکثیر سلولی (با تنظیم افزایشی سیکلین‌ها و تنظیم کاهشی p21)، تنظیم رشد سلولی (با تنظیم افزایشی RNA ی ریبوزومی و پروتیین‌ها)، آپوپتوز (با بیان کاهشی BCL2)، تمایز و نیز خودنوزایی سلول‌های بنیادی نقش بسیار مهمی ایفا می‌کند. اگرچه می‌توان این ژن را از برنامه‌ریزی دوباره حذف کرد اما حضور آن سبب افزایش کارایی این برنامه‌ریزی دوباره می‌شود.[۴۸] از آنجا که MYC یک پروتوانکوژن بسیار قوی نیز هست عدم استفاده از آن در برنامه‌ریزی دوباره ایمن‌تر است و ثابت شده که در بسیاری از سرطان‌ها بیان افزایشی نشان می‌دهد.[۱۰و۱۱و۴۹و۵۰]

علاوه بر این ژن‌ها، ریز RNA ها (microRNA) نیز در برنامه‌ریزی

دوباره و خودنوزایی نقش عمده و ضروری دارند. برنامه‌ریزی دوباره با میانجگری ریز RNA ها: نقش ریز RNA ها (miRNA) در مسیر برنامه‌ریزی دوباره ژنتیکی فیبروبلاست‌ها در تبدیل شدن به سلول‌های چندتوان به تفصیل مطالعه شده است. یکی از این مطالعات، miRNA هایی را که در مسیر پردازش پروتیین LIN28 وجود دارند، شناسایی کرده است. این پروتیین همراه با OCT4، SOX2 و NANOG برای برنامه‌ریزی دوباره فیبروبلاست‌ها کافی است.[۵] در مطالعه‌ی دیگری که توسط Judson و همکاران انجام گرفت، زیرمجموعه‌ای از miRNA ها شناسایی شدند که در ترکیب با عامل‌های OCT4، SOX2 و KLF4 به بهبود کارایی برنامه‌ریزی دوباره در سلول‌های فیبروبلاست موش منجر می‌شوند. این miRNA ها شامل اعضای خانواده miR-290 هستند که به افزایش کلونی‌های iPS منتهی می‌شوند (شکل ۱).[۵۴-۵۱]

با آنکه هر دو مسیر در یک سطح متفاوت پروتیین MYC را درگیر می‌کنند، اعضای خانواده miR-290 به‌طور معمول در سلول‌های ES بیان می‌شوند که از این بین miRNA های 291-3p، ۲۹۴ و ۲۹۵ از همه بیشتر در سلول‌های ES بیان دارند و در طول تمایز میزان آنها کاهش می‌یابد، این miRNA ها نقش مهمی در تنظیم چرخه سلولی و نیز خودنوزایی سلول‌های ES ایفا می‌کنند.[۵۵و۵۶] افزون بر این، خانواده

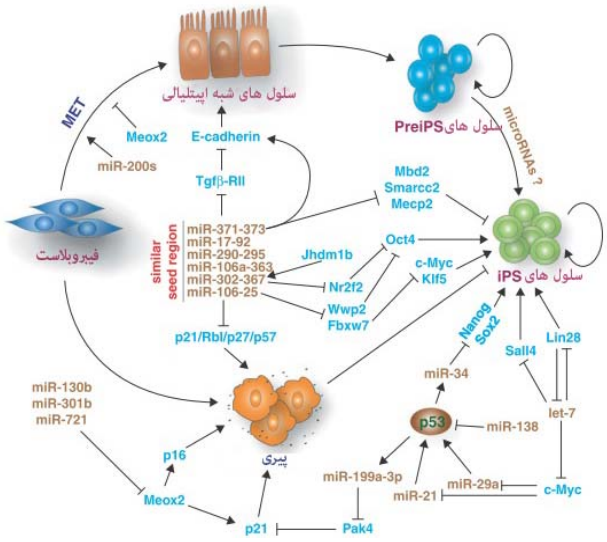


شکل ۱: الگویی از فعالیت عامل‌های مهم در برنامه‌ریزی دوباره

تغییر ساختار کروماتین به‌شکل مستقیم و غیرمستقیم توسط MYC میانجگری می‌شود. miRNAs پایداری MYC را می‌توانند تغییر دهند.

و خوشه‌های miRNA های 92-17، 106a-363 ،b 302-367 جز miRNA های تنظیم‌کننده چرخه سلولی اختصاصی ES Cell-Specific Cell Cycle (ESCC) سلول‌های بنیادی جنینی هستند، که با افزایش انتقال G1/S حالت تکثیری سریع سلول‌های بنیادی جنینی را حفظ می‌کنند.[۵۵و۵۷] miRNA های ESCC نقش‌های خود را با هدف قرار دادن مستقیم چندین تنظیم‌کننده چرخه سلولی مانند p21 و گیرنده دو عامل تغییردهنده رشد (transforming growth factor-β receptor 2, Tgfβ-Rll) ایفا می‌کنند. در خلال برنامه‌ریزی دوباره، TGF-B-Rll با مهار E-cadherin سبب تبدیل سلول‌های مزانشیمی به اپیتلیالی (Mesenchymal-to-Epithelial Transition, MET) می‌شود.[۵۸] همچنین این miRNA ها به‌شکل غیرمستقیم موجب تقویت سطح بیان عامل‌های رونویسی متعددی می‌شوند که در روند برنامه‌ریزی دوباره موثرند.[۵۹و۶۰]

مطالعات تکمیلی نشان داده است که miRNA های ۳۰۲ و ۳۷۲ که ارتولوگ miRNA های ESCC هستند، با تاثیر بر روی تنظیم‌کننده‌های چرخه سلولی (مانند p21/Rbl/p27/p5) و تعدیل‌کننده‌های اپی‌ژنتیکی (مانند MECP2 و MBD2) و تنظیم‌کننده‌های MET (مانند TGF-B-Rll و RhoC) سرعت برنامه‌ریزی دوباره فیبروبلاست‌ها را افزایش می‌دهند، شکل ۲ تاثیر و ارتباطات miRNA ها با عامل‌های موثر بر برنامه‌ریزی دوباره را نشان می‌دهد.[۶۱]



شکل ۲: اهمیت تنظیم برنامه‌ریزی دوباره توسط microRNA ها و ارتباطات بین آنها همراه با هدف‌های ویژه هر یک

میزان تغییرات در سطح بیان microRNA در سلول‌های iPS/ES می‌تواند پیش‌بینی‌کننده توان تمایز باشد. مطالعات انجام‌یافته در سال‌های ۲۰۱۱ و ۲۰۱۳ نشان داده است که miRNA ها بدون حضور عامل‌های رونویسی بیرونی و به‌تنهایی می‌توانند به برنامه‌ریزی دوباره بیانجامند.[۶۲و۶۳]

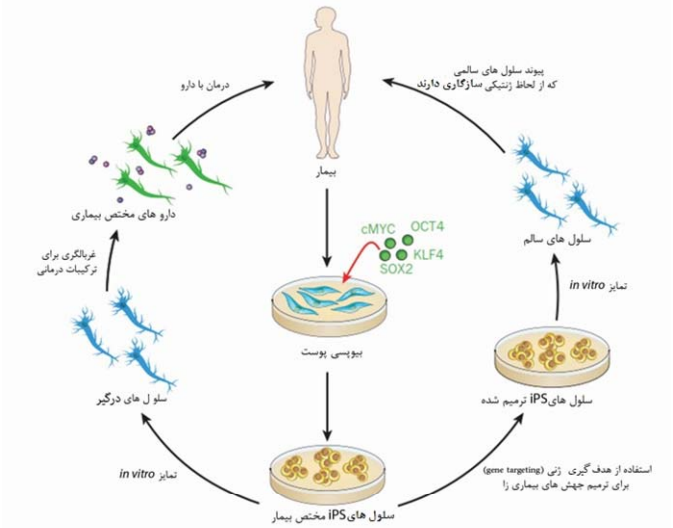
برنامه‌ریزی دوباره مستقیم: از میان انواع روش‌های تولید سلول‌های بنیادی چندتوان به برنامه‌ریزی دوباره مستقیم اشاره می‌شود که از همه مهمتر است. سلول‌های سوماتیک با اضافه کردن عامل‌های رونویسی ویژه‌ای برنامه‌ریزی دوباره شده‌اند. عامل‌های رونویسی، نقش مستقل اما به هم وابسته در تغییر بیان ژن دارند که با تاثیر بر وضعیت موضعی کروماتین در خلال برنامه‌ریزی دوباره، عمل می‌کنند.[۶۵] این عامل‌ها مشتمل بر OCT4، SOX2، c-MYC، KLF4، FBX15، CDX2 و NANOG به‌تنهایی یا به‌شکل ترکیبی و مستقیم از طریق ناقلان ویروسی یا غیرویروسی به سلول‌های سوماتیک عرضه شده و موجب تبدیل آنها به سلول چندتوان می‌شوند. پژوهش‌های گسترده نشان داده است که OCT4، SOX2 و KLF4 در ترکیب با هم کنترل و مهار شماری از ژن‌ها را برای حفظ وضعیت چندتوانی یک سلول القا می‌کنند.

همچنین، پروتیین c-MYC می‌تواند ساختار کروماتین سلول سوماتیک را باز کند. بنابراین قادر است سلول‌ها را به ویژگی‌های شبیه سلول‌های بنیادی تبدیل کند.[۶۶] این ساختار اجازه می‌دهد تا OCT4 و SOX2 به ژن هدف خود متصل شوند. اضافه شدن KLF4 نیز به آنها کمک می‌کند تا یک مجموعه کلیدی از ژن‌های سلول‌های ES در سلول‌های سوماتیک بیان شود. در پی آن، OCT4 و SOX2 یک حلقه خودتنظیم ایجاد می‌کنند که وضعیت چندتوانی را در سلول‌های سوماتیک حفظ می‌کند.[۶۷]

برنامه‌ریزی موفقیت‌آمیز دوباره، به برنامه‌ریزی دوباره هسته سلول سوماتیک بستگی دارد. برای برنامه‌ریزی دوباره کامل، متیله شدن DNA، مواد متصل به هیستون‌ها و ساختار کروماتین باید به حالتی شبیه به حالت جنینی تبدیل شود.[۶۸] برنامه‌ریزی دوباره هسته‌ای مستلزم تغییر بیان هسته‌ای، با هدف فراهم کردن یک تغییر بنیادی، در وضعیت تمایز یک سلول تخصصی شده است. بنابراین این برنامه‌ریزی، شیوه‌های جدیدی را برای درمان بیماری و ایجاد الگوهای انسانی بیماری‌ها پیشنهاد می‌کند. سلول درمانی اورتولوگ می‌تواند توسط برنامه‌ریزی دوباره روی سلول‌های گرفته شده از بیمار انجام شود. از این رو این سلول‌ها می‌توانند با اصلاح ژن معیوب، به سلول طبیعی تبدیل شوند. بدین‌منظور لازم است سلول‌هایی مانند فیبروبلاست‌های پوست و سلول‌های خونی که به‌راحتی در دسترس هستند از بیمار جدا گشته و سپس در محیط کشت برای تغییر وضعیت تمایزیابی سلول دستورزی (Manipulate) شوند. همچنین، از این سلول‌ها می‌توان به‌منظور غربالگری داروها و انتخاب مناسب‌ترین آنها استفاده کرد.[۶۹] در شکل ۳ کاربردهای بالینی سلول‌های iPS نشان داده شده است.

برنامه‌ریزی دوباره مستقیم از آنجا که احتمال ایجاد سلول برنامه‌ریزی دوباره شده را با القای یک سری ژن‌های شناخته شده ممکن می‌سازد، به‌طور گسترده‌ای مورد مطالعه قرار گرفته است. با این حال در اکثر مطالعات برای القا این ژن‌ها از رتروویروس‌ها استفاده کرده‌اند که ممکن است به شکل تصادفی به درون ژنوم میزبان وارد شوند و مشکلاتی در این روند ایجاد کنند. در سال ۲۰۱۲ پژوهشگران برای دستیابی به روش‌های مناسب‌تر، مطالعات وسیعی را انجام داده‌اند تا با خطر کمتر و کارایی بیشتری برنامه‌ریزی مستقیم را به انجام برسانند. جدول ۱ به‌طور جامع نوع و ویژگی‌های مهمترین این روش‌های جدید را با ناقلان مورد استفاده توضیح داده است.[۷۰]

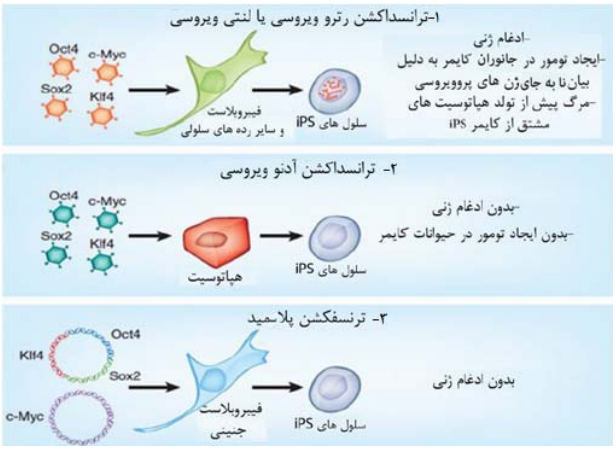
اشاره می‌شود که در ابتدا روش اصلی القا iPSC، استفاده از ناقلان رتروویروسی برای بیان ترانس‌ژنیک بود که اکثر iPSC مختص



شکل ۳: کاربردهای پزشکی سلول‌های iPS

جدول ۱: انواع ناقلان، مزایا و معایب هر یک در تولید سلول‌های iPS

معایب	مزایا	کارایی (٪)	عامل‌ها	انواع سلول	ناقل	نوع ناقل
ادغام ژنی، مهار ناکامل پرووبروسی و کینتیک آهسته	به‌طور معقولی کارامد	~۰/۰۰۱–۱	OSKM, OSK, OSK + VPA, or OS + VPA	فیبروبلاست سلول‌های بنیادی عصبی، سلول‌های معده، کبد، کراتینوسیت‌ها، سلول‌های خونی آمنیوتیک، چربی	رتروویروس	ادغام شونده
ادغام ژنی و مهار ناکامل پرووبروسی	کارآیی مناسب و توانایی آلوده کردن سلول‌های تقسیم‌شونده و غیر تقسیم‌شونده	~۰/۱–۱/۱	OSKM or miR302/367 cluster + VPA	فیبروبلاست، کراتینوسیت	لنتی ویروس	
ادغام ژنی و نیاز برای بیان فعال‌کننده ترانس	کارآیی مناسب و اجازه به بیان کنترل‌شده عامل‌ها	~۰/۱–۲	OSKM or OSKMN	فیبروبلاست، کراتینوسیت‌ها، سلول‌های خونی و ملانوسیت‌ها	لنتی ویروسی القا شونده	
غربالگری طاقت‌فرسای رشته‌های قطع‌شده	کارآیی مناسب و بدون ادغام ژنی	~۰/۱	OSKM	فیبروبلاست‌ها	ترنسپوزون	قابل برش
غربالگری طاقت‌فرسای رشته‌های قطع‌شده و ناحیه‌های LoxP حفظ‌شده در ژنوم	کارآیی مناسب و بدون ادغام ژنی	~۰/۱–۱	OSK	فیبروبلاست‌ها	رتوویروسی دارای توالی‌های کناری LoxP	
کارایی پایین	بدون ادغام ژنی	~۰/۰۰۱	OSKM	فیبروبلاست‌ها و سلول‌های کبدی	آدنو ویروسی	غیر ادغام‌شونده
کارایی پایین و ادغام ژنی وابسته به موقعیت وکتور	ادغام ژنی به‌ندرت	~۰/۰۰۱	OSNL	فیبروبلاست	پلاسمید	
همانند سازی حساس به توالی RNA و سختی خالص‌کردن سلول‌های دارای ویروس در حال همانند سازی	بدون ادغام ژنی	~۱	OSKM	فیبروبلاست	ویروس سندای	بدون DNA
کارایی پایین، نیمه عمر کوتاه، نیاز به مقدار زیادی از پروتین خالص و کاربردهای متعدد پروتین	بدون ادغام ژنی، تحویل مستقیم عامل‌های رونویسی و بدون سختی‌های مربوط به وجود DNA	~۰/۰۰۱	OS	فیبروبلاست	پروتیین	
نیاز به دفعات متعدد ترانسفکشن	بدون ادغام ژنی، فرار از پاسخ ذاتی ضد ویروسی، کینتیک برنامه‌ریزی مجدد سریع، قابل کنترل و کارآمدی بال	~۱–۴/۴	OSKM OSKML + VPA	فیبروبلاست	mRNA اصلاح‌شده	
کارآمدی پایین‌تر از روش‌های معمول مورد استفاده	کارآمد، کینتیک برنامه‌ریزی دوباره سریع‌تر از ناقلان لنتی ویروسی، بدون وجود عامل‌های رونویسی بیرونی و خطر	~۰/۱	miR-200c, miR-302s or miR-369s	سلول‌های چربی استرومال و فیبروبلاستی پوستی	MicroRNA	



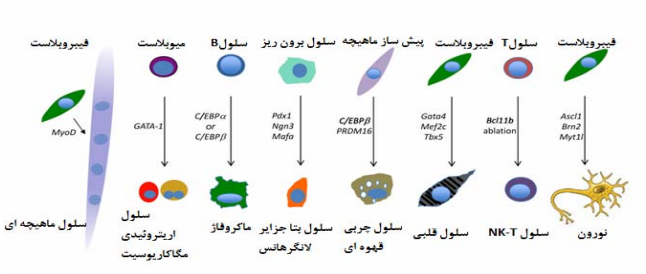
شکل ٤: سه روش متفاوت از برنامه‌ریزی دوباره مستقیم برای تولید سلول‌های iPS

بیماری با ناقلان رتروویروسی شکل گرفت. با این وجود، iPSC های مشتق شده با رتروویروس‌ها، ادغام‌های متعدد ترانس‌ژنی در ژنوم نشان می‌دهند، زیرا این ناقلان به‌شکل تصادفی وارد ژنوم موجب بیان نامناسب شده و شبکه عامل‌های رونویسی را مختل کرده و به عدم موفقیت تمایز مناسب منجر شوند.

نیاز به سلول‌های در حال تکثیر برای ایجاد آلودگی، تحویل ضعیف در بدن موجود زنده و کارایی پایین، دشواری ذخیره‌سازی و کنترل کیفیت رتروویروس‌ها، ادغام ترانس‌ژنی و خطر تومورزایی پس از لانه‌گزینی از جمله معایب دیگر رتروویروس‌ها است.[۱۰و۱۱] بنابراین روش‌های دیگری مبنی بر وارد کردن عامل‌های برنامه‌ریزی دوباره به سلول‌های سوماتیک طراحی شده است.[۷۱]

به‌دلیل آنکه لنتی ویروس‌ها هم می‌توانند سلول‌های تکثیرشونده و هم غیرتکثیرشونده را آلوده کنند به‌عنوان یک ناقل انتقال‌دهنده ژن، مورد استفاده قرار گرفته‌اند. این ویروس‌ها می‌تواند با موفقیت در کروموزوم سلول‌های هدف ادغام شوند. اگرچه که دارای ظرفیت پایین در حمل ژن بیگانه (درمانگر) هستند، بنابراین در ذخیره کردن و کنترل کیفیت آن مشکل به‌وجود می‌آید. ایراد دیگر این ویروس‌ها ایجاد پاسخ ایمنی در بدن است.

بنابراین از این ناقل بیشتر در مطالعات جانوری استفاده شده و دارای کاربرد بالینی نیست. اگر چه که از آن در مطالعات برنامه‌ریزی مستقیم بسیار استفاده شده است. آدنوویروس‌ها و نیز پلاسمیدها از آنجا در ژنوم



شکل ٥: نمونه‌هایی از عامل‌های رونویسی که سبب تمایزیابی ترانس می‌شوند (شکل‌ها از چپ به راست به‌ترتیب زمانی شناسایی عامل‌ها قرار داده شده است)

ادغام نمی‌شوند، برای وارد کردن ژن بیگانه مفید هستند (شکل ٤).[۷۲و۷۳]

عامل‌های رونویسی القا کننده تمایزیابی ترانس: عامل‌های رونویسی در خلال نمو جنینی نقش محوری در تخصصی شدن سرنوشت سلولی دارند. همچنین سبب حفظ هویت سلولی در بافت‌های تمایز یافته گوناگون می‌شوند. آنها توالی‌های اختصاصی را در مولکول DNA شناسایی کرده و به آن متصل می‌شوند و به‌دنبال آن می‌توانند سبب فعال شدن یا سرکوب عمل رونویسی شوند، بدین‌ترتیب سبب تنظیم بیان صدها ژن می‌شوند. ژنوم انسان به‌طور تقریبی ۱٤۰۰ عامل رونویسی کد می‌کند که حدود ۵۰۰ عدد از آنها در یک بافت تمایز یافته خاص و یک‌سوم این مقدار در اکثر بافت‌ها بیان دارد.[۷٤]

مطالعات نشان داده است که تعداد کمتری از عامل‌های رونویسی برای تخصصی شدن و هویت دادن به سلول کافی می‌باشد، مطالعات تکمیلی برنامه‌ریزی دوباره نشان داد که حتی یک عامل رونویسی خاص می‌تواند نقش حیاتی و برجسته در تعیین سرنوشت سلولی داشته باشد. برای نمونه، بیان نابه‌جای عامل رونویسی اختصاصی عضله یعنی MyoD سبب تبدیل سلول فیبروبلاست به سلول ماهیچه‌ای می‌شود.[۷۵و۷۶]

در واقع، با برنامه‌ریزی دوباره می‌توان انواع رده‌های سلولی سوماتیک را به حالت پلوری پوتنت در آورد و سپس با تمایزیابی ترانس به رده سلولی مورد نیاز تبدیل کرد، بنابراین تبدیل رده‌های سلولی متفاوت به یکدیگر با ادغام این روش‌ها امکان‌پذیر است. شکل ۵ نمونه‌هایی از عامل‌های رونویسی را نشان می‌دهد که سبب تحریک تمایزیابی ترانس به انواع رده‌های سلولی متفاوت می‌شود.

آیا سلول‌های iPS متفاوت از سلول‌های ES هستند؟ یکی از مهمترین پرسش‌های مطرح در زمینه iPSCs آن است که آیا این سلول‌ها از ESCs متفاوت هستند یا نه؟ و اگر پاسخ مثبت است، تفاوت‌ها چیست؟ در خلال سال‌های ابتدایی که این پیشرفت انجام گرفته بود پژوهشگران تفاوتی را مشاهده نکردند تا اینکه از سال ۲۰۰۹، تفاوت‌هایی بین این دو نوع سلول گزارش شد. با استفاده از روش‌های ریز آرایه، تفاوت‌هایی در بیان چندین ژن مشخص شد.[۷۸] Deng و همکاران اولین گروهی بودند که در مطالعه‌ای با استفاده از روش توالی‌یابی بی‌سولفیت گزارش کردند که بین این دو نوع سلول در متیله شدن DNA تفاوت‌هایی وجود دارد.[۷۹]

همچنین، گزارش شد که متیله شدن متفاوت در برخی ژن‌ها مانند BMP3 نیز وجود دارد. به‌علاوه سه مطالعه دیگر تفاوت‌هایی در حافظه اپی‌ژنتیکی و توانایی تمایز سلول‌های دهنده گزارش کردند. از جمله نشان داده شد که iPSCها بیان ژن‌های ویژه‌ای از سلول‌های والدی را حفظ می‌کنند و منشا سلول می‌تواند روی ایمنی و عملکرد iPSC ها اثر داشته باشد. بنابراین، شناسایی منبع سلول‌هایی که به‌منظور ساخت hiPSC ها مورد استفاده قرار می‌گیرند، از اهمیت محوری برخوردار است.

یک منبع ایده‌آل برای جدا کردن سلول‌ها و استفاده به‌منظور برنامه‌ریزی دوباره دارای ویژگی‌هایی از جمله دسترسی آسان با فرایندهای خطر کم، وجود تعداد کافی، کارایی به‌نسبت بالا برای برنامه‌ریزی دوباره و سرعت مشتق شدن iPSC بالا می‌باشد.[۸۰–۸۲] با این وجود برخی مطالعات، گزارش کرده‌اند که تمایز بین iPSCs و ESCs با بررسی بیان ژن و متیله شدن DNA، دشوار و در برخی موارد حتی قابل تمیز نیست، زیرا تفاوت‌ها بسیار ریز و اندک بوده یا اساسا وجود ندارند.[۸۳–۸۵]

بحث

سلول‌های iPS در ویژگی‌های پلوریپوتنسی به لحاظ عملکردی معادل با سلول‌های ES به‌نظر می‌رسند، اگرچه که نگرانی‌های اخلاقی مربوط به پژوهش بر روی سلول‌های ES انسانی را ندارند، بنابراین، پژوهش‌ها بر روی سلول‌های iPS به سرعت در حال پیشرفت است. توانایی ساخت سلول‌های iPS مختص به یک بیمار و همچنین یک بیماری خاص و فراهم کردن امکان تمایزیابی آنها به‌صورت سلول‌های سوماتیک تاثیرگذار بر بهبود بیماری از ارزش بالایی برخوردار است. در مورد بسیاری از نابهنجاری‌های مهم، بافت‌ها و سلول‌های مبتلا به‌راحتی در دسترس نیستند، سلول‌های iPS این مشکل را نیز حل کرده است. تمایزیابی سلول‌های iPS مختص به بیماری، در آینده‌ای نزدیک سلول‌های انسانی زنده را برای مطالعه بیماری‌شناسی در دسترس قرار خواهد داد.

در این صورت بر روی آنها مطالعات با ابعاد گسترده انجام خواهد گرفت و علت بیماری به‌طور دقیق مشخص خواهد شد، در واقع چشم‌اندازی که ابداع این روش، پیش روی دانشمندان برای درمان بیماری‌ها ایجاد کرده بسیار امیدوارکننده بوده و برای اکثر بیماری‌ها و اختلالات موثر است. با این وجود، درمان‌های بر اساس iPSCs هنوز در اول راه هستند و موانع بسیاری است که باید به آنها چیره شد تا این کاربردها به واقعیت تبدیل شوند. به‌عبارت دیگر آینده درمان‌های انفرادی به‌وسیله سلول‌های چندتوان به توانایی ما در جداسازی سلول‌های شخص بیمار، اصلاح و تصحیح آلل‌های معیوب و همچنین به توانایی برگرداندن سلول‌های سالم به فرد مورد نظر در یک قالب صحیح فیزیولوژیکی و ژنتیکی بستگی دارد.

References

1. 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.
2. 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.
3. Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 2008;26(1):101-6.
4. Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, et al. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 2003;113(5):631-42.
5. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007;318(5858):1917-20.

6. Huangfu D1, Osafune K, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, Chen S, et al. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat Biotechnol* 2008;26(11): 1269-75.
7. Feng B, Jiang J, Kraus P, Ng JH, Heng JC, Chan YS, et al. Reprogramming of fibroblasts into induced pluripotent stem cells with orphan nuclear receptor Esrrb. *Nat Cell Biol* 2009;11(2):197-203.
8. Chun YS, Byun K, Lee B. Induced pluripotent stem cells and personalized medicine: current progress and future perspectives. *Anat Cell Biol* 2011;44(4):245-55.
9. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981;292(5819):154-6.
10. Noori-Daloii MR, Medical Molecular Genetics in The Third Millennium. Tehran: Tehran: Samer Publishing; 2009 and 2012. [Persian]
11. Noori-Daloii MR, Emery's Elements of Medical genetics. Tehran: Jame-e-Negar and Salemi Publishing; 2009 and 2013. [Persian]
12. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;282(5391):1145-7.
13. Schnieke AE, Kind AJ, Ritchie WA, Mycock K, Scott AR, Ritchie M, et al. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science* 1997;278(5346): 2130-3.
14. Cowan CA, Atienza J, Melton DA, Eggan K. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science* 2005;309(5739):1369-73.
15. Tada M, Takahama Y, Abe K, Nakatsuji N, Tada T. Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Curr Biol* 2001;11(19):1553-8.
16. Noori-Daloii MR, Haji Ebrahimi Z. Stem cells and molecular medicine, importance and perspective. *Teb-o-Tazkie J* 2005;58(3): 61-74.
17. Ralston A, Rossant J. The genetics of induced pluripotency. *Reproduction* 2010;139(1):35-44.
18. Chen X, Xu H, Yuan P, Fang F, Huss M, Vega VB, et al. Integration of external signaling pathways with the core transcriptional network in embryonic stem cells. *Cell* 2008;133(6):1106-17.
19. 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.
20. Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev* 2003;17(1):126-40.
21. Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, et al. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 2003;113(5):643-55.
22. Kim D, Kim C-H, Moon J-I, Chung Y-G, Chang M-Y, Han B-S, et al. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell* 2009;4(6):472-6.
23. Yang S, Lin G, Tan YQ, Deng LY, Yuan D, Lu GX. Differences between karyotypically normal and abnormal human embryonic stem cells. *Cell Prolif* 2010;43(3):195-206.
24. Matsuda T, Nakamura T, Nakao K, Arai T, Katsuki M, Heike T, et al. STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *EMBO J* 1999;18(15):4261-9.
25. Cartwright P, McLean C, Sheppard A, Rivett D, Jones K, Dalton S. LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development* 2005;132(5):885-96.
26. Li Y, McClintick J, Zhong L, Edenberg HJ, Yoder MC, Chan RJ. Murine embryonic stem cell differentiation is promoted by SOCS-3 and inhibited by the zinc finger transcription factor Klf4. *Blood* 2005;105(2):635-7.
27. Kielman MF, Rindapää M, Gaspar C, van Poppel N, Breukel C, van Leeuwen S, et al. Apc modulates embryonic stem-cell differentiation by controlling the dosage of β-catenin signaling. *Nat Genet* 2002;32(4):594-605.
28. Hanna J, Markoulaki S, Schorderet P, Carey BW, Beard C, Wernig M, et al. Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. *Cell* 2008;133(2):250-64.
29. Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, et al. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 1998;95(3):379-91.
30. 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.
31. 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.
32. Loh YH, Wu Q, Chew JL, Vega VB, Zhang W, Chen X, et al. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat Genet* 2006;38(4):431-40.
33. Masui S1, Nakatake Y, Toyooka Y, Shimosato D, Yagi R, Takahashi K, et al. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol* 2007;9(6):625-35.
34. 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.
35. Kim JB, Sebastiano V, Wu G, Araúzo-Bravo MJ, Sasse P, Gentile L, et al. Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell* 2009;136(3):411-9.
36. Kopp JL, Ormsbee BD, Desler M, Rizzino A. Small increases in the level of Sox2 trigger the differentiation of mouse embryonic stem cells. *Stem Cells* 2008;26(4):903-11.
37. Yamanaka S. A fresh look at iPS cells. Cell 2009;137(1):13-7.
38. Shi W, Wang H, Pan G, Geng Y, Guo Y, Pei D. Regulation of the pluripotency marker Rex-1 by Nanog and Sox2. *J Biol Chem* 2006;281(33):23319-25.
39. Katz JP, Perreault N, Goldstein BG, Lee CS, Labosky PA, Yang VW, et al. The zinc-finger transcription factor Klf4 is required for terminal differentiation of goblet cells in the colon. *Development* 2002;129(11):2619-28.
40. Jiang J, Chan Y-S, Loh Y-H, Cai J, Tong G-Q, Lim C-A, et al. A core Klf circuitry regulates self-renewal of embryonic stem cells. *Nat Cell Biol* 2008;10(3):353-60.
41. Guo G, Yang J, Nichols J, Hall JS, Eyres I, Mansfield W, et al. Klf4 reverts developmentally programmed restriction of ground state pluripotency. *Development* 2009;136(7):1063-9.
42. Rowland BD, Bernards R, Peeper DS. The KLF4 tumour suppressor is a transcriptional repressor of p53 that acts as a context-dependent oncogene. *Nat Cell Biol* 2005;7(11):1074-82.
43. Gearhart J, Pashos EE, Prasad MK. Pluripotency redux: Advances in stem-cell research. *N Engl J Med* 2007;357(15):1469-72.
44. Cotterman R, Jin VX, Krig SR, Lemen JM, Wey A, Farnham PJ, et al. N-Myc regulates a widespread euchromatic program in the human genome partially independent of its role as a classical transcription factor. *Cancer Res* 2008;68(23):9654-62.
45. Davis AC, Wims M, Spotts GD, Hann SR, Bradley A. A null c-myc mutation causes lethality before 10.5 days of gestation in homozygotes and reduced fertility in heterozygous female mice. *Genes Dev* 1993;7(4):671-82.
46. Dubois NC, Adolphe C, Ehninger A, Wang RA, Robertson EJ, Trumpp A. Placental rescue reveals a sole requirement for c-Myc in embryonic erythroblast survival and hematopoietic stem cell function. *Development* 2008;135(14):2455-65.
47. Dominguez-Sola D1, Ying CY, Grandori C, Ruggiero L, Chen B, Li M, et al. Non-transcriptional control of DNA replication by c-Myc. *Nature* 2007;448(7152):445-51.
48. Nakagawa M, Yamanaka S. Function of myc for generation of induced pluripotent stem cells. In: Hayat MA, Editor. Stem Cells and Cancer Stem Cells. Vol. 6. Netherlands: Springer; 2012. p. 79-85.
49. Calado DP, Sasaki Y, Godinho SA, Pellerin A, Köchert K, Sleckman BP, et al. The cell-cycle regulator c-Myc is essential for the

formation and maintenance of germinal centers. *Nat Immunol* 2012; 13(11):1092-100.
50. Noori-Daloii MR, Tabarestani S. Molecular genetics, diagnosis and treatment of breast cancer: Review article. *J Sabzevar Univ Med Sci* 2010;17(2):74-87.
51. Judson RL, Babiarz JE, Venere M, Blelloch R. Embryonic stem cell-specific microRNAs promote induced pluripotency. *Nat Biotechnol* 2009;27(5):459-61.
52. Noori-Daloii MR, Nejatizadeh A. MicroRNA in disease and health: Diagnostic and therapeutic potentials. Gene Therapy Development and Future Perspectives Rijeka, Croatia. *InTech* 2011:93-120. [Persian]
53. Noori Daloii MR, Alvandi E. Micro RNA: Small but full of mystery and use: Review article. *Tehran Univ Med J (TUMJ)* 2006;64 (6):5-18.
54. Noori-Daloii M, Vand Rajabpour F. Roles of miRNAs in gene expression regulation, apoptosis, diagnosis and treatment of cancer. *Med Sci J Islamic Azad Univ Tehran Med Branch* 2011;21(3):151-61.
55. Wang Y, Baskerville S, Shenoy A, Babiarz JE, Baehner L, Blelloch R. Embryonic stem cell-specific microRNAs regulate the G1-S transition and promote rapid proliferation. *Nat Genet* 2008;40(12): 1478-83.
56. Marson A, Levine SS, Cole MF, Frampton GM, Brambrink T, Johnstone S, et al. Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Cell* 2008; 134(3):521-33.
57. Li Z, Yang CS, Nakashima K, Rana TM. Small RNA-mediated regulation of iPS cell generation. *EMBO J* 2011;30(5):823-34.
58. Fazilaty H, Gardaneh M, Bahrami T, Salmaninejad A, Behnam B. Crosstalk between breast cancer stem cells and metastatic niche: emerging molecular metastasis pathway? *Tumour Biol* 2013;34(4): 2019-30.
59. Melton C, Judson RL, Blelloch R. Opposing microRNA families regulate self-renewal in mouse embryonic stem cells. *Nature* 2010; 463(7281):621-6.
60. Liao B, Bao X, Liu L, Feng S, Zovoilis A, Liu W, et al. MicroRNA cluster 302–367 enhances somatic cell reprogramming by accelerating a mesenchymal-to-epithelial transition. *J Biol Chem* 2011;286 (19):17359-64.
61. Subramanyam D, Lamouille S, Judson RL, Liu JY, Bucay N, Derynck R, et al. Multiple targets of miR-302 and miR-372 promote reprogramming of human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 2011;29(5):443-8.
62. Anokye-Danso F, Trivedi CM, Juhr D, Gupta M, Cui Z, Tian Y, et al. Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell* 2011;8(4):376-88.
63. Miyoshi N, Ishii H, Nagano H, Haraguchi N, Dewi DL, Kano Y, et al. Reprogramming of mouse and human cells to pluripotency using mature microRNAs. *Cell Stem Cell* 2011;8(6):633-8.
64. Bao X, Zhu X, Liao B, Benda C, Zhuang Q, Pei D, et al. MicroRNAs in somatic cell reprogramming. *Curr Opin Cell Biol* 2013;25 (2):208-14.
65. Adachi K, Schöler HR. Directing reprogramming to pluripotency by transcription factors. *Curr Opin Genet Dev* 2012;22(5):416-22.
66. 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.
67. Kim JB, Zaehres H, Wu G, Gentile L, Ko K, Sebastiano V, et al. Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature* 2008;454(7204):646-50.
68. Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 2007;448(7151): 313-7.
69. Niwa H, Toyooka Y, Shimosato D, Strumpf D, Takahashi K, Yagi R, et al. Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation. *Cell* 2005;123(5):917-29.
70. Robinton DA, Daley GQ. The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature* 2012;481(7381):295-305.
71. Takayama N, Nishimura S, Nakamura S, Shimizu T, Ohnishi R, Endo H, et al. Transient activation of c-MYC expression is critical for efficient platelet generation from human induced pluripotent stem cells. *J Exp Med* 2010;207(13):2817-30.
72. Lowry WE, Plath K. The many ways to make an iPS cell. *Nat Biotechnol* 2008;26(11):1246-8.
73. Noori-Daloii M, Ebrahimzedeh Vesal R. Telomerase and its inhibition in cancer, prevention and gene therapy in prostate cancer: a review article. *Razi J* 1999;11(2):11-112. [Persian]
74. Vaquerizas JM, Kummerfeld SK, Teichmann SA, Luscombe NM. A census of human transcription factors: function, expression and evolution. *Nat Rev Genet* 2009;10(4):252-63.
75. Graf T, Enver T. Forcing cells to change lineages. *Nature* 2009;462 (7273):587-94.
76. Davis RL, Weintraub H, Lassar AB. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* 1987;51(6): 987-1000.
77. 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.
78. Chin MH, Mason MJ, Xie W, Volinia S, Singer M, Peterson C, et al. Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. *Cell Stem Cell* 2009;5(1): 111-23.
79. Deng J, Shoemaker R, Xie B, Gore A, LeProust EM, Antosiewicz-Bourget J, et al. Targeted bisulfite sequencing reveals changes in DNA methylation associated with nuclear reprogramming. *Nat Biotechnol* 2009;27(4):353-60.
80. Kim K, Zhao R, Doi A, Ng K, Unternaehrer J, Cahan P, et al. Donor cell type can influence the epigenome and differentiation potential of human induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 2011;29(12):1117-9.
81. Lister R, Pelizzola M, Kida YS, Hawkins RD, Nery JR, Hon G, et al. Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature* 2011;471(7336):68-73.
82. 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.
83. Guenther MG, Frampton GM, Soldner F, Hockemeyer D, Mitalipova M, Jaenisch R, et al. Chromatin structure and gene expression programs of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2010;7(2):249-57.
84. Newman AM, Cooper JB. Lab-specific gene expression signatures in pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2010;7(2):258-62.
85. Bock C, Kiskinis E, Verstappen G, Gu H, Boulting G, Smith ZD, et al. Reference maps of human ES and iPS cell variation enable high-throughput characterization of pluripotent cell lines. *Cell* 2011;144 (3):439-52

TUMJ Tehran University Medical Journal, October 2014; Vol. 72, No. 7: 423-434 Review Article

Induced pluripotent stem cells in research and therapy of diseases: *review article*

Mohammad Reza Noori Daloii M.Sc., Ph.D.*
Arash Salmaninejad M.Sc.
Mina Tabrizi M.D., Ph.D.

Department of Medical Genetics, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

* Corresponding author: Dept. of Medical Genetics, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Poursina St., Ghods St., Keshavarz Blvd., Tehran, Iran.
Tel: +98-21-88953005
E-mail: nooridaloii@sina.tums.ac.ir

Abstract

Received: 19 May 2014 Accepted: 22 Jun. 2014 Available online: 07 Oct. 2014

Differentiated cells can change to embryonic stem cells by reprograming. Generation of induced pluripotent stem cells (iPSCs) has revolutionized the field of regenerative and personalized medicine. iPSCs can self-renew and differentiate into many cell types. iPSC cells offer a potentially unlimited source for targeted differentiation. Through the expression of a set of transcription factors, iPSCs can be generated from different kinds of embryonic and adult cells. This technology for the first time enabled the researchers to take differentiated cells from an individual, and convert them to another cell type of interest, which is particularly to that person. When the set of master transcription factors containing OCT4, SOX2, KLF4, and MYC is expressed ectopically in somatic cells, the transcriptional network is propelled to organize itself in such a way as to maintenance a pluripotent state. Since iPSCs are similar to Embryonic Stem Cell (ESC), they can be considered as sources for modeling different diseases. iPSCs which are induced from somatic cells of patient can be useful for screening and drugs selection, and also introduce treatment via grafting the cells. Although this technology has been successful in different fields, the tumorigenesis of viral vectors during induction of reprogramming is a major challenge. Nevertheless, iPSCs are valuable for clinical applications and research. By discovery of these cells many challenges related to the safety, efficacy, and bioethics of ESCs are solved. Pluripotency is defined in two aspect of functional and molecular, by which functional regards the capacity of cell is generate three kinds of embryonic layers and germ line, and molecular aspect regards the identifying of molecules and genes that support functional features. Identification of these genes has been placed at the center of fields related to development and stem cell research. In this review, we discuss the process of generation of these cells, as well as required genes and factors for pluripotency, and also current progress in generation of iPSCs utilizing tens of reliable and new studies.

Keywords: cell transdifferentiation, induced pluripotent stem cells (iPSCs), nuclear reprogramming, treatment.