

ORIGINAL RESEARCH

Investigation the Ability to Produce Induced Pluripotent Cells from Human Pancreatic Cancer Xenografts

Reyhaneh Khoshchehreh^{1,2} , Mehdi Totonchi¹ , Hossein Baharvand^{1,2} , Marzieh Ebrahimi¹ 

1. Department of Stem Cells and Developmental Biology, Cell Science Research Center, Jahad Daneshgahi Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran.

2. Department of Genetics, Reproductive Medicine Research Center, Jahad Daneshgahi Institute for Reproductive Biology and Medical Sciences, ACECR, Tehran, Iran.

ARTICLE INFORMATION

Article history

Received: 24 December 2018

Accepted: 26 January 2019

Published online: 18 August 2019

Keywords

iPS cells

Pancreatic cancer cells

Patient derived xenograft

* Corresponding Author:

Marzieh Ebrahimi; P.O. Box 19395-644, Department of Stem Cells and Developmental Biology, Jahad Daneshgahi Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran.

Fax: +98 21 2356 2507

Email: mebrahimi@royaninstitute.org

ABSTRACT

Background and Aim: There is increasing evidence that cancer cells in addition to multiple genetic mutations, also acquire epigenetic abnormalities during development, maintenance, and progression. By utilizing the reprogramming technology as a tool to introduce the 'pressure' to alter epigenetic regulations, we might be able to clarify the epigenetic behavior that is unique to cancer cells. So far, iPSCs have been generated from normal primary cells, but it is unclear whether human primary cancer cell can be reprogrammed. We investigated the production of the iPS cells from the pancreatic adenocarcinoma cells using defined transcription factors.

Materials and Methods: We sought to reprogram patient derived xenograft from human PDAC, by introducing lentiviral mediated induction of Yamanaka Factors (OSKM) and characterized of induced cells by Alkaline Phosphatase staining, Real-Time PCR and immunostaining.

Ethical Considerations: This study with research ethics code EC/93/1025 has been approved by research ethics committee at Royan Institute.

Findings: Alkaline Phosphatase staining, Real-Time PCR and immunostaining showed that induction with the OSKM results in generating iPS cell line from fibroblast cells but not from PDAC PDX cells. We showed that, PDAC cells could not fully reprogrammed by the expression of 4 transcription factors.

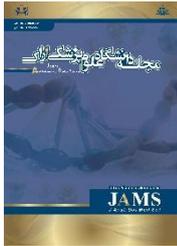
Conclusion: This study demonstrated that the PDAC-PDX cancer cells were distinct from PDAC induced cells with regard to their epigenetic modifier genes expression pattern, although the expression of pluripotency genes did not increased significantly in the induced PDAC cells.

© Copyright (2019) Arak University of Medical Sciences

Use your device to scan and read this article online:



Khoshchehreh R., Totonchi M., Baharvand H., et al. Investigation the Ability to Produce Induced Pluripotent Cells from Human Pancreatic Cancer Xenografts. J Arak Uni Med Sci. 2019; 22(3): 45-58.



JAMS

مجله دانشگاه علوم پزشکی اراک

دوره بیست و دو، شماره سه، مرداد و شهریور ۱۳۹۸

journal homepage: <http://jams.arakmu.ac.ir>



مقاله پژوهشی

بررسی قابلیت تولید سلول‌های پرتوان القایی از نمونه‌های زونگرفت سرطان پانکراس انسان

ریحانه خوش چهره^۱، مهدی توتونچی^۱، حسین بهاروند^۱، مرضیه ابراهیمی^{۱*}

۱. گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، پژوهشکده زیست‌شناسی و فن‌آوری سلول‌های بنیادی جهاد دانشگاهی، پژوهشگاه رویان، تهران، ایران.

۲. گروه ژنتیک، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، پژوهشکده زیست‌شناسی و علوم پزشکی تولید مثل جهاد دانشگاهی، پژوهشگاه رویان، تهران، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: شواهدی وجود دارد که سلول‌های سرطانی در طی فرآیند شکل‌گیری و پیشرفت سرطان، ناهنجاری‌های اپی‌ژنتیکی را نیز علاوه بر جهش‌های ژنتیکی چندگانه متحمل می‌شوند. استفاده از فن‌آوری بازبرنامه‌ریزی به عنوان ابزاری برای اعمال «فشار» و ایجاد تغییرات در تنظیم‌کننده‌های اپی‌ژنتیکی، می‌تواند به روشن کردن رفتار اپی‌ژنتیکی منحصر به سلول‌های سرطانی منجر شود. تاکنون، سلول‌های iPS از سلول‌های پرایمری نرمال تولید شده‌اند، اما مشخص نیست که آیا سلول سرطانی اولیه انسانی نیز می‌تواند به سلول iPS بازبرنامه‌ریزی شود یا خیر. در این مطالعه، تولید سلول‌های iPS از سلول‌های آدنوکارسینومای پانکراس با استفاده از عوامل رونویسی مورد بررسی قرار دادیم.

مواد و روش‌ها: سلول‌های حاصل از نمونه‌های زونگرفت PDAC انسانی، با لنتی ویروس حاوی عوامل Yamanaka (OSKM) القا شده و در ادامه سلول‌های القا شده توسط رنگ‌آمیزی آلکالین فسفاتاز، Real-Time PCR و ایمونوسیتوشیمی تعیین هویت شدند.

ملاحظات اخلاقی: مطالعه حاضر با کد اخلاقی EC/93/1025 در کمیته اخلاق پزشکی پژوهشگاه رویان پذیرفته شده است.

یافته‌ها: رنگ‌آمیزی آلکالین فسفاتاز، Real-Time PCR و ایمونوسیتوشیمی نشان داد که القاء با عوامل رونویسی OSKM منجر به تولید سلول‌های iPS از سلول‌های فیبروبلاستی می‌شود، اما نه از سلول‌های PDAC PDX. سلول‌های PDAC نمی‌توانند به‌طور کامل با بیان چهار عامل رونویسی مجدد برنامه‌ریزی شوند.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که سلول‌های سرطانی PDAC-PDX، با توجه به الگوی بیان ژن‌های اصلاح‌کننده اپی‌ژنتیکی آن‌ها، از سلول‌های القا شده PDAC متفاوت بودند، هر چند بیان ژن‌های تکامل یافته در سلول‌های PDAC القا شده به‌طور قابل توجهی افزایش نیافت.

اطلاعات مقاله

تاریخ دریافت: ۹۷/۱۰/۰۳

تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۱/۰۶

تاریخ انتشار: ۹۸/۰۵/۲۷

واژگان کلیدی

زونگرفت حاصل از نمونه بیمار سلول‌های iPS سلول‌های سرطانی پانکراس

* نویسنده مسئول:

مرضیه ابراهیمی

آدرس پستی: ایران، تهران، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست‌شناسی و فن‌آوری سلول‌های بنیادی، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی، گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی. کدپستی: ۶۴۴-۱۹۳۹۵.

نمابر: +98 21 2356 2507

Email: mehrahimi@royaninstitute.org

۱. مقدمه

می‌باشد. مطالعات نشان داده است که در سرطان پانکراس مانند بسیاری از سرطان‌ها، نقص در تنظیمات اپی‌ژنتیکی ژن‌های تنظیم‌کننده چرخه سلولی، ترمیم DNA، اتصالات سلولی و مسیرهای پیام‌رسانی سلولی منجر به ایجاد تومور، پیشرفت آن و مقاومت در برابر دارو می‌گردد (۵). اختلالات اپی‌ژنتیکی در مراحل اولیه ایجاد سرطان پانکراس بر اختلالات ژنتیکی غلبه می‌کند.

به‌طور کلی، اعتقاد بر این است که سرطان از طریق تجمع جهش‌های ژنتیکی متعدد ایجاد می‌شود، اما شواهد در حال افزایشی وجود دارد که سلول‌های سرطانی نیز در طی شکل‌گیری، نگهداری و پیشرفت سرطان، دستخوش ناهنجاری‌های اپی‌ژنتیکی می‌شوند (۶). علاوه بر این، تعاملات متقابل بین جهش‌های ژنتیکی و تغییرات اپی‌ژنتیکی هنوز مشخص نیست. فن‌آوری بازبرنامه‌ریزی سلولی (Cell reprogramming technology) در حال حاضر به علت پتانسیل‌های آن در پزشکی ترمیمی و مدل‌سازی بیماری بسیار مورد توجه محققین قرار گرفته است که به عنوان ابزاری مفید برای القای تغییرات اپی‌ژنتیکی سرتاسری در ژنوم سلول سرطانی در نظر گرفته می‌شود. باید به این نکته توجه شود که فرآیند بازبرنامه‌ریزی نیازی به تغییر در توالی ژنومی نداشته و به‌طور فعالانه وضعیت اپی‌ژنتیکی ژنوم سلول را بدون تاثیر بر ژنتیک سلول تغییر می‌دهد، بنابراین مشخص می‌شود که تغییر در اصلاحات اپی‌ژنتیکی نقشی مرکزی را در این فرآیند ایفا می‌کند (۷-۹). از این‌رو کاربرد فن‌آوری‌های بازبرنامه‌ریزی در سلول‌های سرطانی ممکن است در راستای روشن شدن نقش تنظیمات اپی‌ژنتیکی در سلول‌های سرطانی مفید باشد. این سوال که چگونه می‌توان تومورها را بازبرنامه‌ریزی کرد و تعیین این‌که چطور یک سلول سرطانی می‌تواند به فنوتیپ یک سلول نرمال بازبرنامه‌ریزی شود، برای درک مسیرهای مولکولی دخیل در بیماری‌ها و هم‌چنین برای مداخلات درمانی و تشخیصی حائز اهمیت می‌باشد.

روش‌های کلیدی در بازبرنامه‌ریزی سلولی شامل روش انتقال هسته به سیتوپلاسم اووسیت فاقد هسته یا استفاده از عصاره

آدنوکارسینوما مجاری پانکراس (Pancreatic ductal adenocarcinoma)، کشنده‌ترین سرطان جامد و در حال حاضر چهارمین علت شایع مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در ایالات متحده است. PDAC به دلیل فقدان علائم در مراحل اولیه سرطان، متاستاز گسترده و مقاومت بالا به شیمی‌درمانی و پرتودرمانی، تشخیص دیر هنگامی دارد. در طی دهه‌های گذشته علی‌رغم گسترش تحقیقات در زمینه سرطان پانکراس، پیشرفت‌های درمانی کمی در این زمینه صورت گرفته است (۱). در واقع، علی‌رغم روند کاهشی که برای اکثر سرطان‌ها وجود دارد، بروز و میزان مرگ و میر ناشی از PDAC همچنان رو به افزایش است، پیش‌بینی می‌شود که تا سال ۲۰۳۰، سرطان پانکراس دومین علت شایع مرگ ناشی از سرطان در جوامع غربی باشد (۲).

میزان ابتلا به انواع سرطان پانکراس (که ۸۵ درصد آن‌ها از نوع آدنوکارسینوما است) بین ۱ تا ۱۰ مورد در هر ۱۰۰,۰۰۰ نفر در سراسر جهان گزارش شده و شیوع بیشتری در میان مردان دارد (۳). این سرطان به‌ندرت در افراد بالای ۴۰ سال تشخیص داده می‌شود و متوسط سن تشخیص آن ۷۱ سال است. به‌طوری‌که این بیماری هشتمین علت مرگ و میر ناشی از سرطان در مردان و نهمین علت مرگ و میر ناشی از سرطان در زنان است (۴). در ایران شیوع این سرطان پایین‌تر از اروپا و آمریکا بوده و طبق آخرین گزارش کشوری ثبت سرطان منتشرشده از سوی وزارت بهداشت، در ایران، در سال ۱۳۸۸ تعداد کل سرطان پانکراس ۲۹۳ مورد است که ۱۱۴ مورد در زنان و ۱۷۹ مورد در مردان است و تخمین زده می‌شود این تعداد در سال ۱۳۹۰ به ۴۵۷ نفر برسد. بیشتر افراد مبتلا در زمان تشخیص دارای متاستاز هستند که به همین علت، جراحی و یا مداخلات شیمی‌درمانی حداقل اثربخشی را در این بیماران دارد.

یکی از موانع زیربنایی چالش‌های بالینی در درمان سرطان پانکراس، شناخت محدود ما از مکانیزم‌های مولکولی پیشرفت PDAC است. در حقیقت بروز نقص در مسیرهای اپی‌ژنتیک یکی از مکانیزم‌های کلیدی دخیل در پیدایش این نوع سرطان

اگرچه در این زمینه پیشرفت‌های زیادی صورت گرفته است، اما مطالعات قبلی به‌طور مستقیم به این سوال مهم جواب نداده‌اند که آیا سلول‌های سرطانی اولیه انسانی می‌توانند سلول‌های پرتوان القایی بازبرنامه‌ریزی شده و به طبع آن کاهش همزمان خاصیت تومورزایی را نشان دهند؟ از این‌رو در این پژوهش برآن شدیم تا امکان تنظیم مجدد برنامه اپی‌ژنتیک سلول‌های سرطانی اولیه PDAC را با استفاده از ابزار فن‌آوری تولید سلول‌های پرتوان القایی مورد بررسی قرار دهیم.

۲. مواد و روش‌ها

کشت سلول

در ابتدای مطالعه و به منظور تهیه سلول‌های سرطانی اولیه انسانی PDAC، از نمونه‌های زونگرفت (Pateint derived xenograft (PDX) PDAC انسانی که از مرکز ملی تحقیقات سرطان (CNIO) در ماریدید، اسپانیا تهیه شده بود، استفاده شد. این سلول‌ها که به‌صورت پیوندهای سریالی (Serial Transplantation) نمونه‌های سرطانی انسان در موش‌های NOD/SCID Gama تهیه شده‌اند، در شرایط درون‌آزمایشگاهی به‌صورت کشت تک‌لایه در محیط کشت RPMI 1640 که به آن ۱۰ درصد سرم جنین گاو اضافه می‌گردد، نگهداری شدند. این سلول‌ها شامل سه گروه PDAC- 253، PDAC- 215 و PDAC- 354 بودند. هم‌چنین از رده سلولی PANC-1 که یک رده استاندارد سلول‌های سرطانی پانکراس انسان است، به منظور مقایسه قابلیت بازبرنامه‌ریزی رده سلول سرطانی با نمونه‌های اولیه سرطان استفاده شد. علاوه بر این، سلول‌های فیبروبلاست انسانی HDF، HFF-5 و HFF-5 نیز به عنوان گروه‌های کنترل بازبرنامه‌ریزی در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند.

رده سلولی PANC-1 نیز به عنوان تنها رده سلولی سرطان PDAC در این مطالعه در شرایط محیط کشت مشابه نگهداری شد. علاوه بر این، سلول‌های فیبروبلاست انسانی HDF، HFF-5 و HFF-5 نیز در محیط کشت DMEM با ۱۰ درصد FBS کشت داده شدند. در ادامه، فیبروبلاست‌های جنینی موش

سلول اووسیت و روش القای سلول پرتوان القایی iPS (Induced Pluripotent Stem Cell) است (۱۰، ۱۱). اما علی‌رغم وجود گزارشاتی مبنی بر کارآمد بودن بازبرنامه‌ریزی به روش انتقال هسته، این روش نیازمند مهارت بالا و تجهیزات ویژه است. در مقابل، کشف فن‌آوری تولید iPS روشی ساده و تکرارپذیر برای برنامه‌ریزی مجدد سلول‌های تمایز یافته به سلول‌های بنیادی پرتوان را فراهم آورده و می‌تواند به راحتی بر روی سلول‌های سرطانی انسانی که دارای نقص‌های اپی‌ژنتیکی هستند به کار رود (۱۱). با این حال، بازبرنامه‌ریزی سلول‌های سرطانی چالش‌برانگیز به نظر می‌رسد. این مشکل ممکن است به دلیل نقص‌های ژنتیکی یا اپی‌ژنتیکی که در سلول‌های سرطانی تجمع پیدا کرده‌اند باشد و ممکن است با فرآیند بازبرنامه‌ریزی تداخل پیدا کند.

با در نظر گرفتن مزیت روش بازبرنامه‌ریزی با استفاده از عوامل رونویسی، تلاش‌هایی در زمینه بازبرنامه‌ریزی سلول‌های سرطانی به کمک عوامل رونویسی OCT4، SOX2، KLF4، C-MYC صورت گرفته است (۱۵-۱۲). در کلیه این مطالعات، تنها بر روی رده‌های سلول‌های سرطانی مطالعه شده است، اما ضروری است که این روش روی سلول‌های سرطانی اولیه انسانی (Human Primary Cancer Cells) نیز بررسی شده و عوامل و جمعیت‌های سلولی که در زمینه القای سلول پرتوان القایی دخیل هستند مورد مطالعه قرار گیرند.

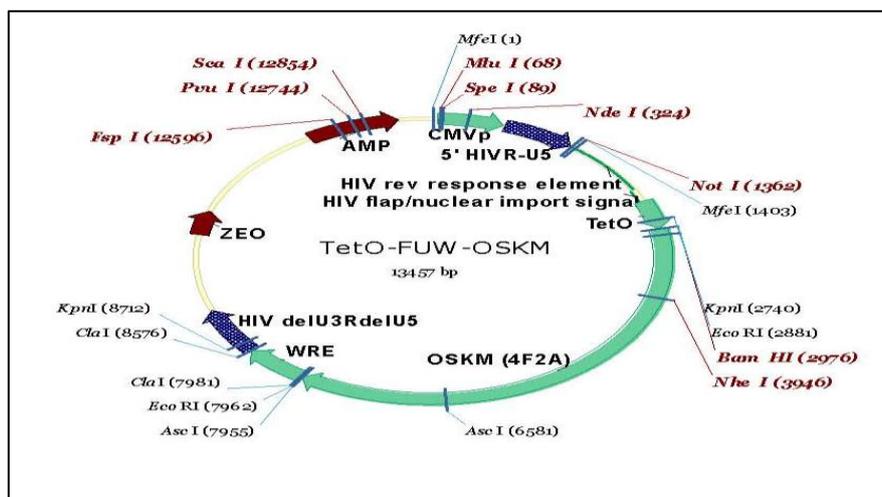
اگرچه چندین گروه توانسته‌اند سلول‌های سرطانی انسانی را بازبرنامه‌ریزی کرده و سلول‌های پرتوان القایی (iPS) از رده‌های سلولی مشتق از سرطان خون، ملانوما، سارکوما، سرطان دستگاه گوارش و گلیوبلاستما تولید کنند، اما تولید سلول‌های پرتوان القایی از سلول‌های سرطانی اولیه انسانی به شدت چالش‌برانگیز به نظر می‌رسد. علاوه بر این، بازده بازبرنامه‌ریزی سلول‌های سرطانی، اعم از رده‌های سلول سرطانی و هم‌چنین سلول‌های سرطانی مشتق از بافت بیمار یا همان سلول‌های سرطانی اولیه، به شدت پایین می‌باشد که نشان می‌دهد برخی از خصوصیات سلول‌های سرطانی از بازبرنامه‌ریزی آن‌ها جلوگیری می‌کنند.

سلول‌های 293T به‌طور جداگانه به ظرف‌های ۱۰ سانتی‌متری که با ژلاتین پوشیده شده بود کشت داده شدند. در روز بعد ترانسفکشن سلول‌ها بر اساس پروتکل شرکت تولیدکننده انجام شد. به‌طور خلاصه، محیط کشت سلولی با ۵ میلی‌لیتر محیط کشت کامل و ۲ درصد FBS و بدون آنتی بیوتیک تغییر یافت. در دو لوله ۵ میلی‌لیتری به‌طور جداگانه ۱/۵ میلی‌لیتر محیط پایه DMEM و ۳۶ میلی‌لیتر لیپوفکتامین افزوده شد. به لوله اول ۱۲ میکروگرم از packaging وکتور و به لوله دوم وکتور TetO-FUW-OSKM افزوده شد. پس از یک انکوباسیون ۵ دقیقه‌ای، محتوای لوله‌ها ترکیب شده و برای ۲۰ دقیقه دیگر مجاز به انکوباسیون می‌شوند. سپس مخلوط ۳ میلی‌لیتر محیط هردو لوله به‌صورت قطره قطره و به آرامی به ظروف کشت حاوی سلول‌های 293T اضافه شد. روز بعد، محیط کشت سلول‌ها با محیط کامل حاوی ۱۰ درصد FBS تعویض شده و پس از ۴۸ ساعت، توسط فیلتر ۰/۴۵ میکرومتری فیلتر شد. در ادامه محیط کشت به‌دست آمده با سرعت ۲۰,۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. پس از آن پلت حاصل در ۳۰۰ میلی لیتر PBS، حل شده و در غلظت‌های ۵۰۰ میکرولیتری در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

(MEFs) از جنین‌های C57BL/6 در روز دوازده و نیم جنینی جهت تهیه سلول‌های فیدر استخراج شدند. تمام موش‌هایی که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفتند بر اساس اصول اخلاقی کمیته تحقیقات حیوانات در پژوهشگاه رویان (شماره EC/93/1025) کشت داده شدند. سلول‌های MEF در محیط کشت DMEM با ۱۰ درصد FBS و سلول‌های بازبرنامه‌ریزی شده نیز با استفاده از محیط کشت DMEM: F12 با ۲۰ درصد KOSR، ۱ درصد NEAA، گلوتامین ۲ میلی‌مولار، ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر bFGF و بتامرکارتوانول ۰/۱ میلی‌مولار کشت داده شدند. ظروف کشتی که برای این سلول‌ها مورد استفاده قرار گرفت با Matrigel و یک لایه سلول MEF به عنوان فیدر که قبلاً تحت تیمار با میتومایسین C قرار گرفته بود پوشش داده شدند.

القای سلول‌ها با استفاده از لنتی ویروس پلی سیسترونی TetO-FUW-OSKM

به منظور القای سلول‌ها با وکتورهای موردنظر، ابتدا وکتورها استخراج و خالص‌سازی شدند. پلاسمید مربوطه در شکل ۱ نمایش داده شده است. تولید لنتی ویروس پلی سیسترونی TetO-FUW-OSKM، بر اساس پروتکل شرکت تولیدکننده انجام شد. یک روز قبل از ترانسفکشن، تعداد $10^6 \times 5$ از



شکل ۱. وکتور مورد استفاده در این مطالعه. وکتور TetO-FUW-OSKM

پروتئین NANOG و TRA-1-60 با استفاده از رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسنت.

رنگ‌آمیزی آلکالین فسفاتاز

بدین منظور از کیت آلکالین فسفاتاز شرکت SIGMA (با شماره کاتالوگ 86-R) استفاده شد. رنگ‌آمیزی سلول‌ها بر اساس دستورالعمل کیت انجام گرفت و سپس با دوربین دیجیتالی متصل به میکروسکوپ عکس‌برداری انجام شد.

رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسنت

برای انجام این تست سلول‌های بازبرنامه‌ریزی‌شده در ظروف کشت ۱۲ خانه که قبلاً با ماتریژل پوشانده شده بود، کشت داده شدند. برای اجرای ایمونوسیتوشیمی، ابتدا سلول‌ها توسط پارافرمالدهید ۴ درصد به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تثبیت شدند و پس از ۲ بار شستشو توسط ۰/۰۵ درصد PBS/tween، با استفاده از ۰/۵ درصد Triton X100 نفوذپذیر شدند. پس از دوبار شستشوی سلول‌ها با ۰/۰۵ درصد PBS/tween، با افزودن سرم میزبان آنتی بادی ثانویه و یا ۳ درصد BSA در PBST به منظور بلاکینگ، سلول‌ها به مدت ۱ ساعت در دمای آزمایشگاه نگهداری شده و سپس آنتی بادی اولیه برای پروتئین NANOG به چاهک‌ها افزوده شد و به مدت ۱ شبانه‌روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در ادامه شستشوی سلول‌ها با ۰/۰۵ درصد PBS/tween صورت گرفت و پس از افزودن آنتی بادی ثانویه، نمونه در تاریکی به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه نگهداری شد. هسته‌ی سلول‌ها توسط DAPI رنگ شد و یافته‌ها توسط میکروسکوپ فلورسنت Olympus مدل ۷۲ DP بررسی گردید.

رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسنت برای سلول‌های زنده

به منظور رنگ‌آمیزی سلول‌های زنده از آنتی بادی TRA-1-60 Antibody (DyLight™ 488) مربوط به شرکت Stemgent به شماره کاتالوگ 09-0068 استفاده شد. سلول‌های پرتوان بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با آنتی بادی انکوبه شده و سپس سلول‌ها با استفاده از محیط PSB- شستشو شدند.

القای مستقیم سلول‌ها (سلول‌های HDF، HFeF، HFF-1، PANC-1، PDAC-235، PDAC-PDX 215 و ۳۵۴ (PDAC-) با ویروس OKSM و M2rtTA-mcherry انجام شد. در روز دوم، Doxycycline اضافه شده و سلول‌ها ۵ روز در محیط ۱۰ درصد RPMI + FBS کشت می‌شوند. سپس سلول‌ها تریپسینه شده و در ظروف کشت پوشیده شده با MEF و ماتریژل با ۱۰ درصد RPMI + FBS کشت داده شدند. بعد از ۷۲ ساعت، محیط کشت سلول‌ها به محیط نگهداری سلول‌های پرتوان تغییر داده شد و هر روز تعویض محیط سلول‌ها انجام شد.

جداسازی سلول‌ها با استفاده از دستگاه FACS

سلول‌های mCherry مثبت پس از القای سلول‌های فیبروبلاست و هم‌چنین سلول‌های سرطانی توسط دستگاه BD influx FACS sorter جداسازی شدند. بافر مورد استفاده برای جداسازی سلول‌ها با این دستگاه شامل PBS، ۳ میلی‌مولار EDTA، ۳ درصد FCS و DAPI (۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بود. سلول‌های ترنسدیوس نشده به عنوان کنترل مورد استفاده قرار گرفتند. سلول‌های DAPI مثبت به عنوان سلول‌های مرده در نظر گرفته شدند. داده‌های FACS با استفاده از Flowjo نسخه ۹ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

تعیین هویت سلول‌های پرتوان القایی

در ادامه، کلونی‌های به‌دست‌آمده برای بررسی خصوصیات سلول‌های iPS مورد مطالعه قرار گرفت. سلول‌ها تا این مرحله با داشتن ویژگی‌های مورفولوژیکی به عنوان سلول‌های پرتوان در نظر گرفته شدند که از این ویژگی‌ها می‌توان به نسبت اندازه هسته به سیتوپلاسم، سرعت تقسیم سلول‌ها و ایجاد کلونی‌هایی با حاشیه مشخص اشاره کرد، اما با وجود این که این ویژگی‌ها لازم هستند، اما کافی نیستند. بنابراین به منظور اثبات هویت این سلول‌ها به روش‌های زیر عمل شد: بررسی ظاهر کلونی‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری. بررسی بیان آنزیم آلکالین فسفاتاز. بررسی بیان ژن‌های پرتوانی و تنظیم‌کننده‌های اپی ژنتیکی با استفاده از روش Real-Time PCR. بررسی بیان

زمانی-گرمایی دستگاه در سه مرحله انجام شد. ترکیبات هر واکنش شامل ۴۰ میکرولیتر مخلوط اصلی واکنش بود. جدول ۱ توالی پرایم‌هایی که در این مطالعه استفاده شده‌اند را نشان می‌دهد. ژن GAPDH و ACTB به عنوان کنترل داخلی برای یکسان‌سازی سطح RNAها استفاده شد و میزان بیان ژن‌های هدف نسبت به نمونه کنترل (به عنوان کالیبراتور) مورد ارزیابی قرار گرفت.

در ادامه با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت Olympus مدل DP ۷۲ عکس‌برداری از سلول‌ها انجام شد.

qRT-PCR

RNA توسط ترايزول (USA-NY-Ambion) و مطابق با دستورالعمل شرکت تولیدکننده استخراج شد. cDNA با استفاده از کیت (H RevertAid Minus first cDNA Fermentase-MA-USA) ساخته شد. در این مطالعه از دستگاه Real-Time PCR مدل ABI استفاده شد. برنامه

جدول ۱. ژن‌ها و توالی پرایم‌های استفاده شده در این مطالعه

نام پرایم	توالی	نام پرایم	توالی
GAPDH	F: 5'GAAATCCCATCACCATCTTCC3' R: 5'GGCTGTTGTCATACTTCTCAT3'	REX1	F: 5'- CGTCCTCAAGGTGCCATCC-3' R: 5'- GCAGCCCGACAGAAAAATGA-3'
ACTB	F: 5'CTTCCTTCTGGGCATG-3' R: 5'GTCTTTGCGGATGTCCAC-3'	NANOG	F: 5'- AGCCAACAACCCACTGTA-3' R: 5'- CTGACATTCTCCCAACCTAC-3'
POU5F1	F: 5'CCATGTGCTGGTGTGTAAC-3' R: 5'CCTTCTGAAGTGCAGTCCGC-3'	TET2	F: 5'- AATCACAGCGCCTTACC-3' R: 5'- GGCACAGGTGCTCTCCA-3'
SOX2	F: 5'- GCCATGAAGAAGTCCATTG -3' R: 5'- AGCGACCACCAAGAATTG-3'	DOT1L	F: 5'- TAATCGGAGAGCAACTTCA-3' R: 5'- TGTAGTAATCAGCGGAGTAA-3'
KLF4	F: 5'- GTGGGTGGTGACAAATTC-3' R: 5'-GGTCAATGGGATAGTCTTCAGC-3'	SIRT1	F: 5'-TGGAAGTACTGTGCCTGCTG-3' R: 5'-TGCATGTTGTTGGTGACCTT-3'
C-MYC	F: 5'-TTCGGGTCCTTCGTGGACA-3' R: 5'- ACTGGTTGGAGTTGTTGGTCA-3'	SIRT7	F: 5'-AGCCTTGGACAAAAACACTAGC-3' R: 5'-TCAGATACTGAGTCGTCTGGG-3'

به منظور بررسی امکان تولید سلول پرتوان القایی (iPS) از سلول‌های سرطانی PDAC-PDX، بازبرنامه‌ریزی سلول‌ها با استفاده از لنتی ویروس TetO-FUW-OSKM که توسط داکسی سایکلین القا شده و حاوی توالی ژن‌های OCT4، SOX2، KLF4 و c-MYC است، بر روی سلول‌های سرطانی PDAC-PDX شامل (PDAC- 215، PDAC- 253 و PDAC- 354)، رده سلولی سلول‌های سرطانی پانکراس PANC-1 و سلول‌های فیبروبلاست انسانی (HFF-5، HDF، HFeF) و HFF-5 به عنوان گروه کنترل انجام شد.

تشکیل کلونی‌های شبه iPS که کلونی‌هایی دارای حاشیه مشخص هستند، از ۱۲ تا ۶۰ روز متغیر بود. در واقع، شکل‌گیری کلونی‌های شبه iPS، تنها ۱۴ روز پس از القای ویروسی در سلول‌های فیبروبلاست‌های انسانی مشاهده شد (شکل ۲)، در حالی که شکل‌گیری این کلونی‌ها در رده سلولی PANC-1 حدود ۳۰ روز و در سلول‌های سرطانی PDAC- 215،

تحلیل آماری

آنالیز مقایسه‌ای با آزمون‌های تی تست، آنوای یک‌طرفه و من ویتنی انجام شد. کلیه آنالیزها با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism 6 انجام شد و $p < 0.05$ از لحاظ آماری معنی‌دار تلقی گردید. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه شده است.

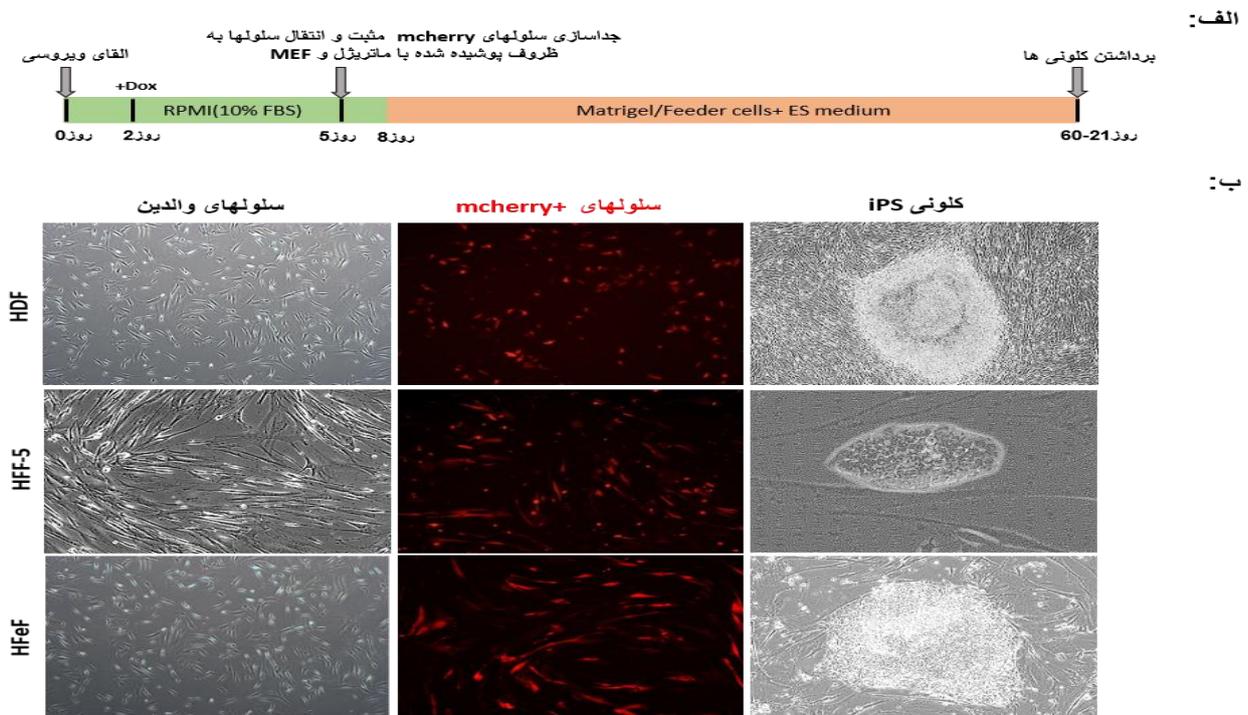
۳. ملاحظات اخلاقی

مطالعه حاضر با کد اخلاقی EC/93/1025 در کمیته اخلاق پزشکی پژوهشگاه رویان پذیرفته شده است.

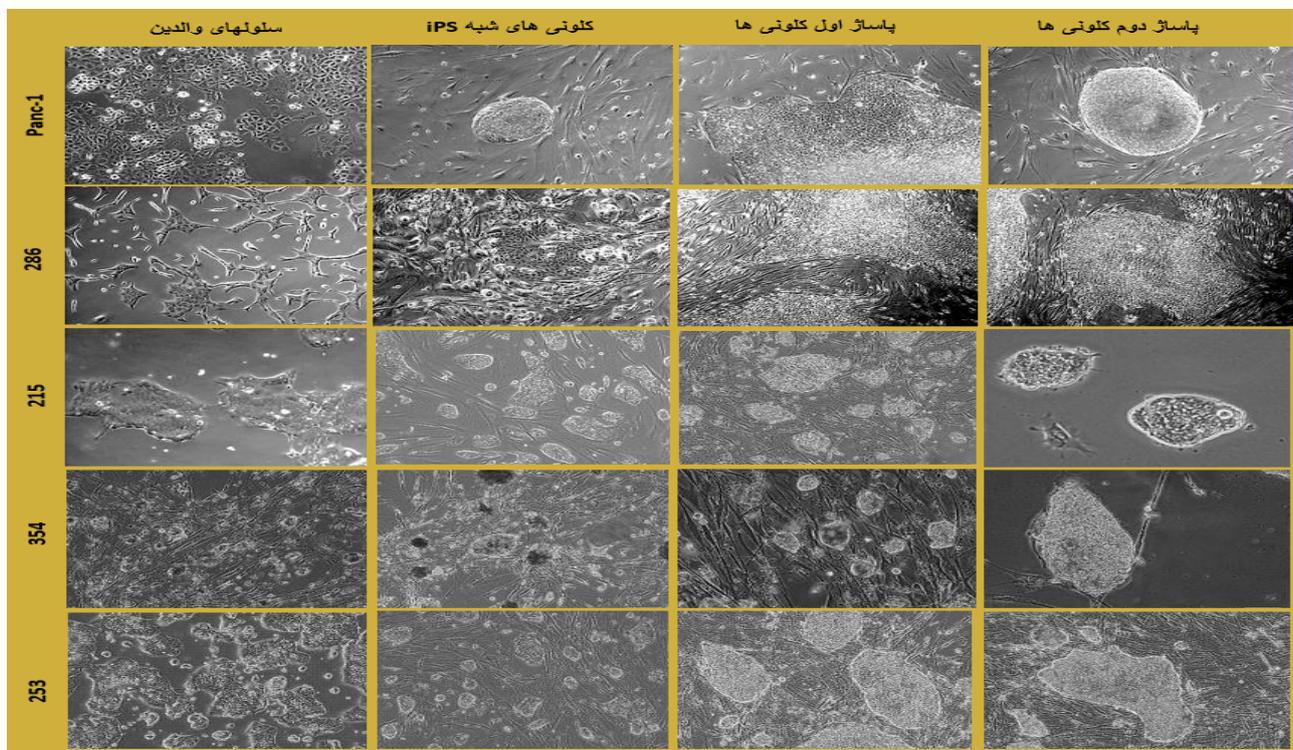
۴. یافته‌ها

بررسی قابلیت تولید سلول پرتوان القایی از سلول‌های PDAC-PDX با استفاده از ویروس TetO-FUW-OSKM

PDAC- 253 و PDAC- 354، حداکثر ۶۰ روز پس از القای سلول ها مشاهده گردید (شکل ۳).



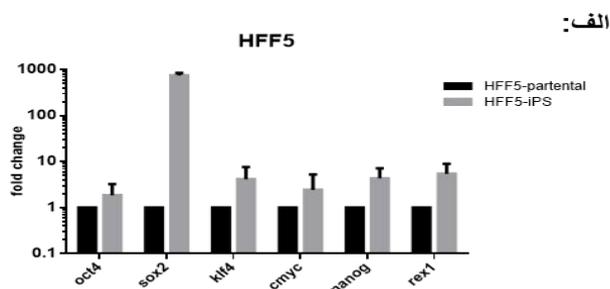
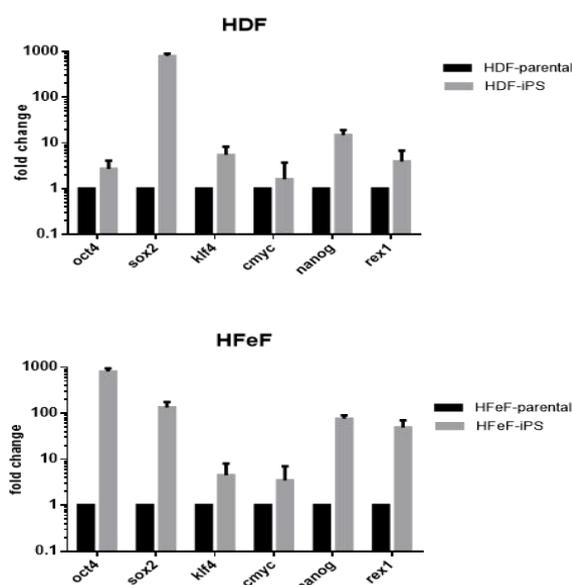
شکل ۲. تولید iPS از سلولهای فیبروبلاستی با استفاده از فاکتورهای رونویسی OSKM. (الف) شکل شماتیک پروتکل مورد استفاده در این مطالعه به منظور تنظیم مجدد برنامه ای ژنتیکی گروههای موجود در مطالعه. (ب) مورفولوژی سلولهای والدین و سلولهای بازبرنامه ریزی شده ۳ هفته بعد از القای سلولها. مورفولوژی مورد ارجاع به عنوان کلونی های iPS توسط سلولهای القا شده فیبروبلاستی نمایش داده شده است. نواحی قرمز رنگ سلولهای mCherry+ را نشان می دهد. خط مقیاس: ۱۰۰ میکرومتر.



شکل ۳. بازبرنامه ریزی سلولهای PDAC با استفاده از فاکتورهای رونویسی OSKM. مورفولوژی سلولهای والدین و سلولهای بازبرنامه ریزی شده ۴ تا ۸ هفته بعد از القای سلولها. انواع مختلفی از کلونی ها با اشکال مختلف در مقایسه سلولهای القا شده با سلولهای والدین آن ها مشاهده شد. خط مقیاس: ۱۰۰ میکرومتر.

ایجاد کلونی‌هایی با حاشیه مشخص اشاره کرد. علاوه بر این، از آنجایی که سلول‌های پرتوان میزان بالایی از بیان آنزیم آلکالین فسفاتاز را در غشای سلولی خود دارند، حضور این آنزیم می‌تواند معرف پرتوانی سلول‌های موردنظر باشد. بنابراین، افزایش فعالیت آلکالین فسفاتازی در این سلول‌ها با استفاده از رنگ‌آمیزی برای آلکالین فسفاتاز به تأیید رسید (شکل ۴).

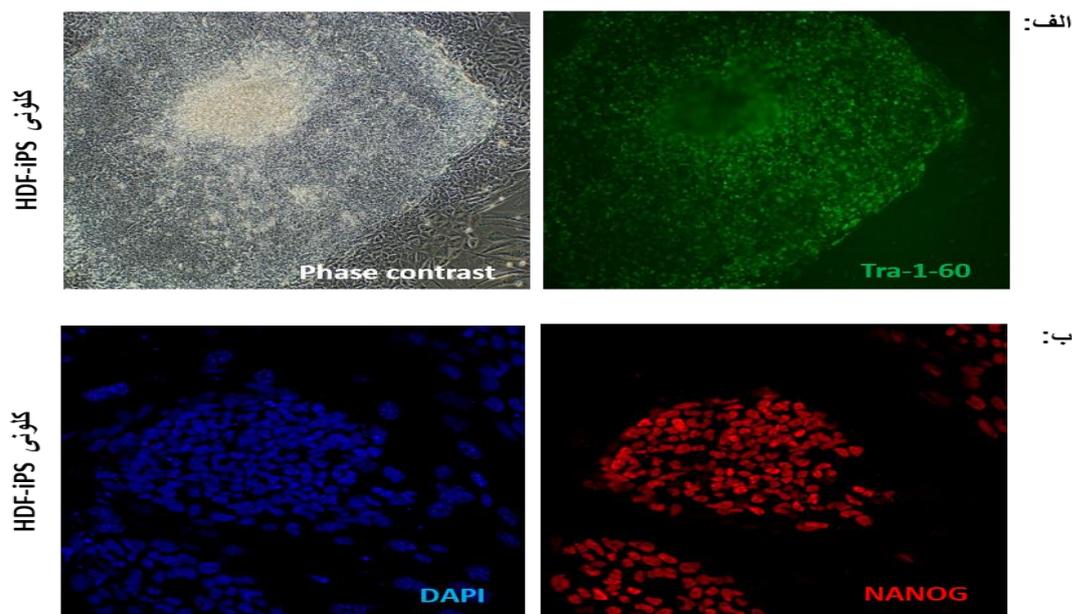
تعیین هویت سلول‌های القا شده با استفاده از بررسی فعالیت آلکالین فسفاتازی، بیان ژن و ایمونوسیتوشیمی سلول‌های القا شدهی HDF، HFeF، HFF-5 و HFF-5 با داشتن یک سری از ویژگی‌های مورفولوژیکی خاص به عنوان سلول‌های پرتوان القایی در نظر گرفته شدند که از این ویژگی‌ها می‌توان به نسبت اندازه هسته به سیتوپلاسم، سرعت تقسیم سلول‌ها و



شکل ۴. تعیین هویت سلول‌های فیبروبلاست القا شده با استفاده از روش Real-Time PCR و رنگ‌آمیزی آلکالین فسفاتاز. (الف) بررسی الگوی بیان ژن‌های شاخص پرتوانی در سلول‌های فیبروبلاستی القا شده. داده‌ها حاصل سه تکرار بیولوژیک است. سطح بیان نسبی با $\Delta\Delta Ct$ در مقایسه‌ی سلول‌های بازبرنامه‌ریزی شده با سلول‌های والدین در هر گروه انجام شد. (ب) رنگ‌آمیزی آلکالین فسفاتاز سلول‌های بازبرنامه‌ریزی شده HDF. از روش $\Delta\Delta Ct$ در مقایسه‌ی سلول‌های بازبرنامه‌ریزی شده با سلول‌های والدین در هر گروه انجام شد. (ب) رنگ‌آمیزی آلکالین فسفاتاز سلول‌های بازبرنامه‌ریزی شده HDF. کلونی‌های سلول‌های پرتوان در حضور سوبسترای این آنزیم قرمز رنگ می‌شوند.

رنگ‌آمیزی سلول‌های زنده برای پروتئین TRA-1-60 در این سلول‌ها به تأیید رسید (شکل ۵). بر اساس مشاهدات فوق، نتیجه گرفته شد که سلول‌های حاصل از القای HDF، HFeF و HFF-5 با استفاده از ویروس OSKM، به سلول‌های پرتوان القایی بازبرنامه‌ریزی شده‌اند.

در ادامه، بررسی بیان ژن با روش Real-Time PCR، در سلول‌های HDF، HFeF، HFF-5 و القای ژن‌های مرتبط با پرتوانی مانند NANOG و REX1 که هدف پایین دست NANOG است مورد تأیید قرار گرفت (شکل ۴) و این نتایج توسط تکنیک ایمونوسیتوشیمی برای پروتئین NANOG در سلول‌های بازبرنامه‌ریزی شدهی فیبروبلاستی و همچنین



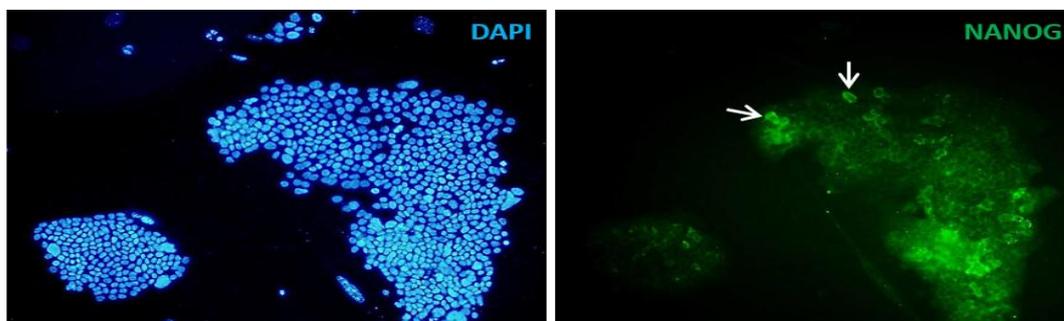
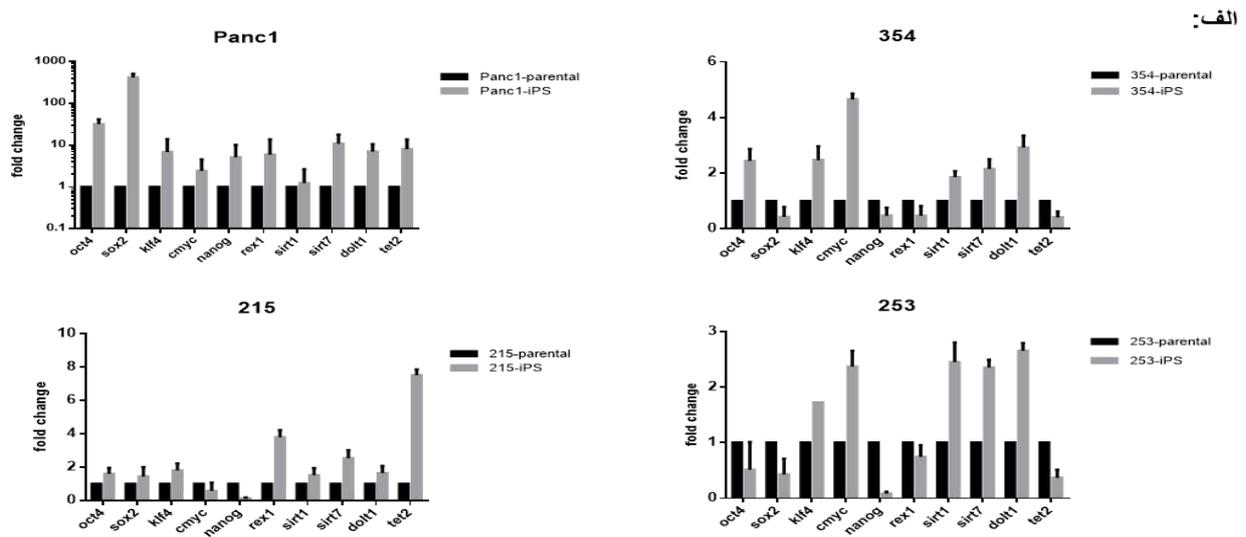
شکل ۵. تعیین هویت سلول‌های فیروبلاست القا شده با استفاده از رنگ آمیزی ایمونوسیتوشیمی. (الف) بررسی بیان شاخص پرتوانی TRA-1-60 در سطح پروتئین در سلول‌های فیروبلاستی با استفاده از روش رنگ آمیزی ایمونوفلورسنت برای سلول‌های زنده. (ب) رنگ آمیزی ایمونوفلورسنت برای پروتئین NANOG به عنوان شاخصی سلول‌های پرتوان در سلول‌های HDF القا شده. رنگ DAPI برای رنگ آمیزی هسته استفاده شده است. خط مقیاس: ۵۰ میکرومتر.

بازبرنامه‌ریزی نشده بودند. علاوه بر این، بیان پروتئین NANOG در این سلول‌ها مورد بررسی قرار گرفت که بیان این شاخص پرتوانی تنها در سلول‌های PDAC-253 و به صورت سیتوپلاسمی در برخی از سلول‌های درون کلونی مشاهده گردید.

نتایج بررسی بیان ژن در کلونی‌های حاصل از بازبرنامه‌ریزی سلول‌های PDAC-PDX، افزایش بیان ژن تنظیم‌کننده اپی ژنتیکی TET2 و DOT1L، SIRT1 و SIRT7 را در سلول‌های PANC-1 و PDAC-PDX 215 و کاهش بیان ژن‌های TET2 را در سلول‌های PDAC-253 و PDAC-354 در مقایسه با سلول‌های والدین آن‌ها نشان داد (شکل ۶). بر اساس داده‌های بالا، سلول‌های سرطانی PDAC-PDX، بازبرنامه‌ریزی به سمت سلول‌های پرتوان القایی را به طور کامل انجام نمی‌دهند و در عین حال تغییرات قابل توجهی را نسبت به ویژگی‌های والدین خود نشان می‌دهند.

همچنین رده سلولی PANC-1 حدود ۳۰ روز پس از القا با ویروس، کلونی‌های اپیتلیالی را دارای مرز مشخص (که از ویژگی‌های کلونی‌های شبه iPS است) تولید کرد. همچنین به علت مورفولوژی اپیتلیالی سلول‌های ۳۵۴، ۲۵۳، PDAC-۲۱۵، القای فرآیند بازبرنامه‌ریزی در این سلول‌ها تنها با تکیه بر مورفولوژی آن‌ها قابل تشخیص نبود (شکل ۳). بنابراین به منظور بررسی تغییرات در سطح بیان ژن، بیان یک مجموعه از ژن‌های مرتبط با پرتوانی و اصلاح‌کننده‌های اپی ژنتیکی (Epigenetic modifiers) توسط روش Real-Time PCR مورد بررسی قرار گرفت.

داده‌های ما نشان داد که بازبرنامه‌ریزی مجدد از طریق فاکتورهای رونویسی OSKM به تنظیم مجدد ژن‌های مرتبط با پرتوانی مانند NANOG و OCT4 در سلول‌های PANC-1 و PDAC-215، PDAC-253 و PDAC-354 در مقایسه با سلول‌های والدین آن‌ها منجر نمی‌شود (شکل ۶) که این نشان می‌دهد این سلول‌های PDAC پس از القا به درستی



شکل ۶. تعیین هویت سلول‌های فیبروبلاست القاء شده با استفاده از روش Real-Time PCR و رنگ آمیزی ایمونوسیتوشیمی. (الف) بررسی بیان ژنهای پرتوانی و ژنهای اصلاح کننده اپی ژنتیکی در سلول‌های بازبرنامه‌ریزی شده PDAC و سلول‌های والدین آن‌ها توسط Real-Time PCR. داده‌ها حاصل سه تکرار بیولوژیک است. سطح بیان نسبی با housekeeping ژن bACTIN نرمالایز شده است و آنالیز داده‌ها با استفاده از روش $\Delta\Delta Ct$ در مقایسه‌ی سلول‌های بازبرنامه‌ریزی شده با سلول‌های والدین در هر گروه انجام شد. (ب) رنگ آمیزی ایمونوفلورسنت برای پروتئین NANOG به عنوان شاخصی سلول‌های پرتوان در سلول‌های PDAC-253 القاء شده. رنگ DAPI برای رنگ آمیزی هسته استفاده شده است. خط مقیاس: ۵۰ میکرومتر.

۵. بحث

رده سلول فیبروبلاستی، موفق به تولید رده سلول پرتوان القایی از نمونه‌های PDAC-PDX موجود در مطالعه نشدیم. در این مطالعه نشان داده شد که می‌توان با استفاده از فاکتورهای رونویسی OSKM فیبروبلاست‌های انسانی را مجدداً برنامه‌ریزی کرد، اما بازبرنامه‌ریزی سلول‌های سرطانی به‌طور کامل صورت نگرفت. ممکن است وجود جهش‌های معینی سلول‌های سرطانی را نسبت به برنامه‌ریزی مجدد مقاوم کنند، به‌طوری‌که این سلول‌ها به راحتی پذیرای تنظیم مجدد اپی ژنوم خود نیستند. با توجه به این‌که بسیاری از بیماران سرطانی قبل از عمل جراحی تحت شیمی درمانی و پرتودرمانی قرار می‌گیرند، چنین درمان‌هایی نیز ممکن است از برنامه مجدد این سلول‌ها جلوگیری کنند (۱۸). در این مطالعه، سلول‌های

مطالعات متعددی نشان داده است که پیشرفت سرطان می‌تواند به واسطه تغییرات اپی ژنتیکی برگشت‌پذیر و جهش‌های غیرقابل برگشت در انکوژن‌ها و ژن‌های سرکوب‌گر تومور ایجاد شود (۱۶). علی‌رغم این‌که گزارشاتی مبنی بر مقاومت هسته سلول‌های سرطانی نسبت به فرآیند بازبرنامه‌ریزی وجود دارد، چندین گروه موفق به تولید سلول‌های iPS از انواع مختلف بدخیمی‌ها شده‌اند (۱۴، ۱۵، ۱۷)، با این حال، بازده بازبرنامه‌ریزی در این سلول‌ها بسیار کم بوده و تنها زیرمجموعه‌ای از سرطان‌ها قابل برنامه‌ریزی مجدد هستند. به همین ترتیب، ما نیز در این مطالعه با وجود تولید iPS از سه

موردنیاز است (۲۱). سلول‌های سرطانی القاشده‌ی ما نیز نمی‌توانستند پرتوانی خود را حفظ کنند که این پدیده می‌تواند از طریق افزایش بیان SIRT1 در این سلول‌ها توضیح داده شود. نشان داده شده است که اصلاح‌کننده اپی ژنتیکی DOT1L نیز تنها در مراحل اولیه بازبرنامه‌ریزی نقش ایفا می‌کند که افزایش سطح بیان DOT1L در سلول‌های بازبرنامه‌ریزی‌شده‌ی سرطانی نشان‌دهنده باقی‌ماندن سلول‌ها در مراحل اولیه بازبرنامه‌ریزی است (۲۲).

۶. نتیجه‌گیری

در نهایت، برنامه‌ریزی سلولی می‌تواند یک مدل برای بررسی این‌که چگونه اختلالات اپی ژنتیک ممکن است به بروز سرطان منجر شود و این‌که آیا بازبرنامه‌ریزی ممکن است در شکل‌گیری یک زیرجمعیت کلیدی از سلول‌های سرطانی نقش داشته باشد، ارائه دهد. از این رو، هدف قرار دادن این تغییرات اپی ژنتیکی روش‌های درمانی برای درمان موثر PDAC را فراهم خواهد کرد و در مطالعات آینده دنبال خواهد شد. درک عمیق‌تر مکانیسم‌های مولکولی بازبرنامه‌ریزی PDAC و علل مقاومت این سلول‌ها به فرآیند بازبرنامه‌ریزی مستلزم کار و مطالعه بیشتر است.

۷. تقدیر و تشکر

این مطالعه با حمایت مالی پژوهشگاه رویان انجام گرفته است (گرنه شماره ۹۱۰۰۰۴۱۳). نویسندگان مراتب قدردانی خود را از پژوهشگاه رویان، دانشگاه علم و فرهنگ و تمامی عزیزانی که در انجام این مطالعه مساعدت داشتند اعلام می‌نمایند.

۸. سهم نویسندگان

تمامی نویسندگان معیارهای استاندارد نویسندگی بر اساس پیشنهادات کمیته بین‌المللی ناشران مجلات پزشکی را دارا بودند.

۹. تضاد منافع

بدین‌وسیله نویسندگان تصریح می‌نمایند که هیچ‌گونه تضاد منافی در خصوص پژوهش حاضر وجود ندارد.

PDAC-PDX که دارای جهش KRAS G12V هستند، پتانسیل تشکیل تومور خود را در طی روند برنامه‌ریزی مجدد از دست دادند. جالب توجه است که در این سلول‌ها، OCT4 افزایش بیان پیدا نکرد. این موضوع می‌تواند نشان‌گر این مطلب باشد که این سلول‌های توموری احتمالاً حاوی موانعی برای فعال شدن مجدد OCT4 هستند که ممکن است مانع رسیدن به یک وضعیت پرتوانی پایدار شود. ما نشان دادیم که بیان تعدادی از ژن‌های اصلاح‌کننده‌ی اپی ژنتیکی مانند TET2، SIRT1، DOT1L و SIRT7 در مقایسه با سلول‌های والدین PDAC-PDX افزایش می‌یابد و در عین حال در سلول‌های PDAC- 354 و PDAC- 253، ژن تنظیم‌کننده اپی ژنتیکی TET1 کاهش بیان را نشان می‌دهد. سلول‌های بازبرنامه‌ریزی‌شده PDAC- 253 نیز افزایش بیان NANOG را در سطح پروتئین تنها در برخی از سلول‌های درون کلونی و به‌صورت سیتوپلاسمی و نه درون هسته‌ای نشان دادند. بنابراین با توجه به عدم بیان ژن‌های مرتبط با پرتوانی در کلونی‌های سلول‌های بازبرنامه‌ریزی‌شده‌ی ما و در عین حال افزایش بیان تنظیم‌کننده‌های اپی ژنتیکی، احتمالاً این سلول‌ها تنها دستخوش بازبرنامه‌ریزی ناقص (Partially reprogrammed) شده‌اند (۱۹). با توجه به سطح بیان تعدادی از اصلاح‌کننده‌های کروماتین، یک تغییر شدید در الگوی بیان ژن وجود دارد. این نشان می‌دهد که سلول‌های برنامه‌ریزی‌شده دارای مشخصات معکوس اصلاح‌کننده کروماتین متفاوت نسبت به سلول‌های والدین هستند. خانواده SIRT نقش مهمی در رشد سرطان، تومورزایی و متاستاز بازی می‌کند و به‌طور ویژه فعالیت آنزیم deacetylase در این فرآیندها نقش کلیدی ایفا می‌کند. بنابراین، اعضای خانواده SIRT فرآیند EMT را از طریق دو روش مختلف تسهیل می‌کنند، یکی به عنوان خواننده عامل رونویسی دخیل در فرآیند EMT یعنی SNAIL و دیگری از طریق سرکوب TET1 که خود به عنوان سرکوب‌کننده مسیر EMT شناخته شده است (۲۰). هم‌چنین گزارش شده است که SIRT1 فرآیند بازبرنامه‌ریزی را تسهیل کرده و برای elongation تلومر پس از بازبرنامه‌ریزی و حفظ پرتوانی

References

1. Hermann, P.C., S.L. Huber, T. Herrler, A. Aicher, J.W. Ellwart, M. Guba, et al., Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell*. 2007; 1(3): 313-23.
2. Zagorac, S., S. Alcalá, G. Fernández Bayon, T. Bou Kheir, M. Schoenhals, A. González-Neira, et al., DNMT1 Inhibition Reprograms Pancreatic Cancer Stem Cells via Upregulation of the miR-17-92 Cluster. *Cancer Res*. 2016; 76(15): 4546-58.
3. Jemal, A., R.L. Siegel, J. Ma, F. Islami, C. DeSantis, A. Goding Sauer, et al., Inequalities in premature death from colorectal cancer by state. *J Clin Oncol*. 2015; 33(8): 829-35.
4. Siegel, D.A., J. King, E. Tai, N. Buchanan, U.A. Ajani and J. Li, Cancer incidence rates and trends among children and adolescents in the United States, 2001-2009. *Pediatrics*. 2014; 134(4): e945-55.
5. Sadikovic, B., K. Al-Romaih, J.A. Squire and M. Zielenska, Cause and consequences of genetic and epigenetic alterations in human cancer. *Curr Genomics*. 2008; 9(6): 394-408.
6. Yamada, Y., H. Haga and Y. Yamada, Concise review: dedifferentiation meets cancer development: proof of concept for epigenetic cancer. *Stem Cells Transl Med*. 2014; 3(10): 1182-7.
7. Feinberg, A.P. and B. Tycko, The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer*. 2004; 4(2): 143-53.
8. Jones, P.A. and S.B. Baylin, The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*. 2002; 3(6): 415-28.
9. Linhart, H.G., H. Lin, Y. Yamada, E. Moran, E.J. Steine, S. Gokhale, et al., Dnmt3b promotes tumorigenesis in vivo by gene-specific de novo methylation and transcriptional silencing. *Genes Dev*. 2007; 21(23): 3110-22.
10. Gurdon, J.B., The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J Embryol Exp Morphol*. 1962; 10: 622-40.
11. 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.
12. Lin, S.L., D.C. Chang, S. Chang-Lin, C.H. Lin, D.T. Wu, D.T. Chen, et al., Mir-302 reprograms human skin cancer cells into a pluripotent ES-cell-like state. *RNA*. 2008; 14(10): 2115-24.
13. Utikal, J., N. Maherali, W. Kulalert and K. Hochedlinger, Sox2 is dispensable for the reprogramming of melanocytes and melanoma cells into induced pluripotent stem cells. *J Cell Sci*. 2009; 122(Pt 19): 3502-10.
14. Miyoshi, N., H. Ishii, K. Nagai, H. Hoshino, K. Mimori, F. Tanaka, et al., Defined factors induce reprogramming of gastrointestinal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107(1): 40-5.
15. Zhang, X., F.D. Cruz, M. Terry, F. Remotti and I. Matushansky, Terminal differentiation and loss of tumorigenicity of human cancers via pluripotency-based reprogramming. *Oncogene*. 2013; 32(18): 2249-60, 2260 e1-21.
16. Kim, J. and K.S. Zaret, Reprogramming of human cancer cells to pluripotency for models of cancer progression. *EMBO J*. 2015; 34(6): 739-47.
17. Kim, J., J.P. Hoffman, R.K. Alpaugh, A.D. Rhim, M. Reichert, B.Z. Stanger, et al., An iPSC line from human pancreatic ductal adenocarcinoma undergoes early to invasive stages of pancreatic cancer progression. *Cell Rep*. 2013; 3(6): 2088-99.
18. Semi, K. and Y. Yamada, Induced pluripotent stem cell technology for dissecting the cancer epigenome. *Cancer Sci*. 2015; 106(10): 1251-6.
19. Schlaeger, T.M., L. Daheron, T.R. Brickler, S. Entwisle, K. Chan, A. Cianci, et al., A comparison of non-integrating reprogramming methods. *Nat Biotechnol*. 2015; 33(1): 58-63.
20. Duan, H., Z. Yan, W. Chen, Y. Wu, J. Han, H. Guo, et al., TET1 inhibits EMT of ovarian cancer cells through activating Wnt/beta-catenin signaling inhibitors DKK1 and SFRP2. *Gynecol Oncol*. 2017; 147(2): 408-417.
21. De Bonis, M.L., S. Ortega and M.A. Blasco, SIRT1 is necessary for proficient telomere elongation and genomic stability of induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports*. 2014; 2(5): 690-706.

22. Chen, C.W., R.P. Koche, A.U. Sinha, A.J. Deshpande, N. Zhu ,R. Eng, et al., DOT1L inhibits SIRT1-mediated epigenetic silencing to maintain leukemic gene expression in MLL-rearranged leukemia. *Nat Med.* 2015; 21(4): 335-43.