

줄기세포와 생식세포에서 리프로그래밍 인자에 대한 최근 연구 동향과 전망

서유미·이경아[†]

차의과학대학교 의생명과학과

Current Progress and Prospects of Reprogramming Factors - Stem Cells vs Germ Cells -

You-Mi Seo and Kyung-Ah Lee[†]

Dept. of Biomedical Science, College of Life Science, CHA University, Seoul 135-081, Korea

ABSTRACT : Recently induced pluripotent stem (iPS) cells are derived from somatic cells by ectopic expression of several transcription factors (reprogramming factors) using technology of somatic cell reprogramming. iPS cells are able to self-renew and differentiate into all type of cells in the body similarly to embryonic stem cells. Because iPS cells have advantages that can avoid immune rejection after transplantation and ethical issues unlike embryonic stem cells, research on iPS has made significant progress since the first report by Yamanaka in 2006. Nevertheless of many advantages of iPS, safer methods to introduce reprogramming factors into somatic cells must be developed due to safety concerns regarding viral vectors, and safer reprogramming factors to substitute the oncogenes should be evaluated for clinical application of iPS. Here we discuss the recent progress in reprogramming factors in embryonic stem cells, oocytes, and embryos, and discuss further research for finding new, more reliable and safer reprogramming factors.

Key words : Reprogramming factor, Embryonic stem cell, Oocyte, Embryo.

요약 : 최근에 체세포 리프로그래밍 기법을 사용하여 체세포에 몇 가지 전사인자(리프로그래밍 인자)를 넣어줌으로써 유도만능줄기세포(induced pluripotent stem cell, iPS)를 만드는데 성공하였다. 유도만능줄기세포는 배아줄기세포와 유사하게 자가재생 할 수 있는 능력이 있으며, 신체의 모든 타입의 세포로 분화할 수 있는 특징을 가지고 있다. 배아줄기세포와는 달리 면역 거부반응이 없다는 점과 윤리적인 문제로부터 자유롭다는 장점이 있어 2006년 Yamanaka 팀이 유도만능줄기세포에 관해 처음 보고한 이후로 이 분야 연구의 급속한 발전이 이루어지고 있다. 하지만 안전성의 문제점 때문에 세포 치료제로 사용되기 위해서는 리프로그래밍 인자의 도입 방법 및 새로운 리프로그래밍 인자의 발굴 등 몇 가지 해결해야 할 점들이 남아 있다. 본 중설에서는 유도만능줄기세포를 만드는데 사용된 몇 가지 리프로그래밍 인자에 대해 보고된 연구 내용을 리프로그래밍 인자가 존재하는 세포인 배아줄기세포 및 난자와 배아에서 정리하고자 하며, 리프로그래밍 인자의 연구에 관한 방향에 대해 논의하고자 한다.

서론

줄기세포는 무한히 자가재생을 할 수 있으면서 신체의 모든 조직의 세포로 분화할 수 있는 미분화 세포이다. 따라서 줄기세포 연구는 재생의학, 신약 개발과 같은 세포치료제의

개발, 인체 질환의 발병 원인 및 치료, 그리고 인체의 발생과정을 연구하는 중요한 대상으로 각광받고 있는 연구 분야이다.

줄기세포 중 배아줄기세포는 착상 전 배아의 내세포괴(inner cell mass)로부터 만들어지며(Evans & Kaufman, 1981), 적절한 환경 하에서 200가지 이상의 세포로 분화할 수 있고, 심지어 기관 전체를 만들 수도 있다(Nagy et al., 1990). 하지만 세포치료제로써 배아줄기세포는 난자를 사용

[†] 교신저자: 서울특별시 강남구 역삼1동 606-13 차의과학대학교 의생명과학과. (우) 135-081, (전) 02-557-3937, (팩) 02-563-2038, E-mail: leeka@ovary.co.kr

해서 만들어야 하고, 배아를 파괴해야 얻을 수 있다는 윤리적인 문제를 갖고 있으며, 또한 임상에 사용하기 위해서는 면역거부반응이 있다는 것 등과 같은 여러 문제점을 갖고 있다. 그 중 면역거부반응을 피할 수 있는 방법으로 시도되고 있는 것이 체세포 리프로그래밍 기법을 사용하는 것이다.

리프로그래밍이란 일반 수정란에서처럼 배아 발달 및 발육에 적응하는 과정이며, 핵이식란에서도 일반 수정란과 같은 과정과 현상을 보인다. 이것이 바로 체세포 복제에서도 자연수정과 마찬가지로 과정을 거친다는 증거가 되며, 그 과정을 리프로그래밍이라 한다. 이와 같이 핵이식 수정란은 리프로그래밍에 의해 공여자 핵의 생물학적 시계를 되돌리게 된다. 리프로그래밍 기법의 종류에는 핵치환법, 배아줄기세포와의 융합법, 또는 배아줄기세포 분비물 처리법 등이 있다 (Jaenisch & Young, 2008). 포유동물에서 핵치환 방법을 사용하여 성공한 한 예는 1996년 돌리라는 복제양의 경우이다 (Wilmut et al., 1997). 돌리의 복제는 분화세포인 유선세포의 핵을, 원래의 핵이 제거된 난자 속에 치환하여 넣음으로써 만들어졌는데, 이 사실은 난자 안에 존재하고 있던 리프로그래밍 유도인자들에 의해 유선세포 핵의 유전체가 미분화 상태로 되돌려졌음을 의미한다. 또한 2005년 인간 배아줄기세포와 인간 섬유아세포를 융합시켰을 때 섬유아세포의 유전체가 배아줄기세포 내의 인자들에 의해 리프로그래밍됨이 보고되었다(Cowan et al., 2005). 이와 더불어 같은 해에 배아줄기세포나 embryonic carcinoma 세포의 추출액을 처리하여 293T 세포를 리프로그래밍 시킬 수 있음이 보고되었다(Taranger et al., 2005). 이러한 결과들은 난자뿐만 아니라 배아줄기세포 내에도 리프로그래밍 인자들이 존재하고 있다는 것을 시사해 주고 있다.

2006년 Yamanaka 그룹에서 4개의 리프로그래밍 인자를 발견함으로써 시작된 유도만능줄기세포의 제작과 그 분화에 대한 연구는 최근 줄기세포 분야에서 가장 각광을 받으며 급속적인 발전을 이루고 있는 분야가 되었다(Takahashi & Yamanaka, 2006). 이 유도만능줄기세포는 Oct4, Sox2, c-Myc, 그리고 Klf4를 바이러스 시스템을 사용하여 생쥐의 배아섬유세포에 도입함으로써 배아줄기세포와 유사한 상태로 리프로그래밍시켜 만들어졌다. 유도만능줄기세포는 그 유전자의 발현과 염색체 변형 패턴, 배아줄기세포와 같은 마커들의 발현, teratoma 형성 능력 및 만능분화능(pluripotency) 보유 등에 있어서 배아줄기세포와 유사한 성질을 보여주고 있다. 또한

난자나 배아를 사용하지 않고도 만들 수 있기 때문에 배아줄기세포 연구의 단점인 종교적, 생명윤리적 논쟁을 잠재울 수 있다는 점과 환자 면역 적합형 세포치료제를 개발할 수 있다는 장점을 가지고 있다. 하지만 배아줄기세포와 마찬가지로 분화 후 이식했을 때 암 유발 가능성이 존재한다. 리프로그래밍에 사용되는 유전자 중 c-Myc과 Klf4는 원형발암유전자로, 이들 유전자가 염색체로 끼어 들어가 발현되지 않은 채로 존재하다가 어떤 자극에 의해서든 다시 활성화되어 발현하여 암을 유발할 가능성이 있기 때문이다. 또 다른 문제점으로는 리프로그래밍 인자의 도입 방법으로 바이러스를 사용하기 때문에 염색체 내에 바이러스가 끼어 들어감으로써 예상치 못한 문제점도 야기될 수 있다. 때문에 유도만능줄기세포를 환자의 세포치료용으로 사용하기 위해서는 안전성의 문제를 해결해야 하는데, 대안으로는 바이러스를 사용하여 유전자를 전달하는 것이 아니라 리프로그래밍 인자 자체를 단백질이나 소분자의 형태로 도입하는 방법과 더 안전한 리프로그래밍 인자의 발견 등이 있다. 리프로그래밍 인자 자체를 단백질로 발현하여 이를 이용하여 사람의 유도만능줄기세포를 제작하는데 성공함으로써 보다 안정적인 유도만능줄기세포 제작이 이루어지고 있으므로(Kim et al., 2009), 앞으로는 리프로그래밍 인자가 존재하는 세포인 난자로부터의 더 안전한 리프로그래밍 인자를 찾아내는 것이 또 다른 한 가지 대안이 될 것이다.

아직 정확한 기전이 알려져 있지 않은 리프로그래밍 인자의 작용기전이나 제작된 유도만능줄기세포의 성질 등에 대한 연구 분석을 위해서는 현재 알려져 있는 리프로그래밍 인자가 난자와 배아줄기세포에서 어떤 역할과 조절기전을 갖고 있는지에 대한 비교 분석이 필요하다. 따라서 본 논문에서는 현재까지 잘 알려진 Yamanaka 그룹이 발견한 4개 (Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4) 및 그 이후 Daley 등에 의해 사용된 두 개의 다른 인자(Nanog, Lin28)를 포함한 6개의 리프로그래밍 인자들에 대하여 배아줄기세포 및 난자나 배아에서 지금까지 보고되어 있는 연구 결과들을 정리하고자 한다 (Takahashi & Yamanaka, 2006; Park et al., 2008).

1. 리프로그래밍 인자의 발견

2006년 Takahashi와 Yamanaka는 생쥐 배아, 배아줄기세포와 carcinoma 세포에서 많이 발현되는 24개의 전사인자를 선택하여 이 인자들의 다양한 조합의 스크리닝을 통해 배아

섬유세포를 효과적으로 리프로그래밍 시키는 4개의 인자, Oct4, Sox2, c-Myc와 Klf4를 발견하여 발표하였다(Takahashi & Yamanaka, 2006). 이후 이 4개의 인자를 Yamanaka factor라 부르게 되었다. 단, 4개의 유전자를 이용하여 분화하였던 세포를 다시 줄기세포로 만들 수 있다는 이 놀라운 결과는 2007, 2008년에 보고된 세 편의 논문들에 의해 다시 한 번 확인되었다(Hanna et al., 2007; Maherali et al., 2007; Lowry et al., 2008). 하지만, 인간 배아줄기세포와 생쥐 배아줄기세포 사이에는 자기증식과 만능분화능에 관여하는 기전에 상당한 차이가 있을 것으로 생각되고 있었고, 따라서 생쥐와 인간의 분화된 세포를 역분화 시키는 기전과 방법이 다를 것이며, 이를 밝혀 인간세포의 리프로그래밍 인자를 발굴하기까지 많은 시간이 걸릴 것이라는 것이 많은 전문가들의 예상이었다. 하지만 이러한 예측 또한 Yamanaka와 Thomson 팀에 의해 깨지게 되었다. Yamanaka 팀은 생쥐세포의 역분화에 사용되었던 4가지 인자의 조합을 그대로 사용하였으며, Thomson 팀은 Oct4, Sox2, Nanog와 Lin28을 사용하여 인간세포를 역분화 시켜서 유도만능줄기세포를 만드는데 성공하였다. 두 그룹의 리프로그래밍 인자들의 분석은 우리에게 체세포 리프로그래밍의 분자적 기전을 이해하는데 큰 도움을 줄 것이다.

2. 배아줄기세포에서 리프로그래밍 인자

1) Oct4

Pou5f1이라고도 불리는 POU 전사인자, Oct4는 배아줄기세포의 자가재생(self-renewal)과 분화에 중요한 역할을 한다. Oct4의 발현 수준은 배아줄기세포의 특성을 유지하기 위해 조절된다. Oct4의 발현이 50% 정도 감소하면 영양막배엽(trophoblast)으로 분화되며(Niwa et al., 2000; Shimozaki et al., 2003), 반대로 50% 증가하면 중배엽과 내배엽으로 분화된다(Nichols et al., 1998). 하지만, Oct4는 다양한 기관의 신체줄기세포의 자가재생에는 필요하지 않다(Lengner et al., 2007). 따라서 Oct4의 발현 수준은 배아줄기세포 운명의 중요한 결정자이다.

배아줄기세포에서 작용하는 Oct4의 몇 가지 중요한 공동인자가 알려져 있다. 배아줄기세포에서 만능분화능을 조절하는데, 전사인자의 네트워크, 즉 Oct4와 Sox2, Nanog가 함께 작용한다. 이 세 단백질들은 유전자의 증강인자

(enhancer)에 함께 결합함으로써 만능분화능을 촉진하고 분화를 억제하는데 관여한다(Boyer et al., 2005; Loh et al., 2006).

2) Sox2

Sox2는 Sox(SRY-related HMG-box) family 전사인자에 속한다. 생쥐 배아줄기세포에서 conditional knock-out이나 RNAi를 이용한 Sox2의 제거는 세포의 빠른 분화를 유도한다(Ivanova et al., 2006; Masui et al., 2007). 이러한 결과는 Sox2가 배아줄기세포에서 만능분화능의 유지에 필요하다는 것을 의미한다. 배아줄기세포에서 Sox2 발현의 감소는 Oct4 발현 감소와 유사하게 영양막배엽과 유사한 세포를 형성한다(Li et al., 2007; Masui et al., 2007). 이는 Oct4와 Sox2가 서로의 공동인자로서 배아줄기세포에서 영양막배엽의 형성을 함께 조절함을 시사한다. 이와 더불어 Oct4의 과발현은 배아줄기세포에서 Sox2 결핍의 효과를 보정해 준다고 알려져 있다(Masui et al., 2007).

3) c-Myc

c-Myc은 파트너 단백질인 Max와 결합하는 helix-loop-helix/leucine zipper 전사인자이다(Adhikary & Eilers, 2005). c-Myc은 Stat3에 의해 조절되며, 생쥐 배아줄기세포에서 자가재생과 만능분화능 유지에 중요한 역할을 한다(Cartwright et al., 2005). 생쥐 배아줄기세포를 배양할 때에 LIF가 없는 상태에서 c-Myc의 안정적인 발현은 배아줄기세포의 자가재생을 유도하는 반면, LIF가 있다고 하더라도 c-Myc의 dominant-negative한 형태의 발현은 세포의 분화를 유도한다. 따라서 c-Myc은 LIF 신호 경로의 표적이다(Cartwright et al., 2005). c-Myc은 게놈상에 많은 단백질의 결합부위를 가지고 있으면서(Fernandez et al., 2003; Li et al., 2003; Cawley et al., 2004) 크로마틴 구조를 변화시키며(Knoepfler et al., 2006), 여러 유전자의 발현을 조절하며 micro-RNA(miRNA)의 발현을 활성화시킨다(O'Donnell et al., 2005).

4) Klf4

Klf4는 tumour suppressor로 발견된 Kruppel-like 전사인자로 세포주기, 전사조절, DNA repair, 세포사멸, 분화, 세포 운명의 결정에 중요한 역할을 하고 있다. Klf4 활성의 표적

은 세포주기 억제인자인 p21(Zhang et al., 2000)과 keratin (Chen et al., 2003)이나 alkaline phosphatase(Hinnebusch et al., 2004)와 같은 분화 관련 유전자들이 있다. Klf4는 미분화된 배아줄기세포에서 높은 수준으로 발현되며, 생쥐 배아줄기세포에서 Klf4는 자가재생에 영향을 미치기도 한다(Li et al., 2005).

5) Nanog

Nanog는 만능분화능을 가진 세포에서 발현하는 호메오박스(homeobox) 단백질이다. Nanog가 결핍된 배아줄기세포는 LIF가 존재함에도 불구하고 배외내배엽계로 분화된다. RNAi를 사용한 Nanog의 knockdown은 생쥐(Hough et al., 2006; Ivanova et al., 2006)와 인간(Hyslop et al., 2005; Zaehres et al., 2005) 배아줄기세포의 분화를 이끈다. 이와 유사하게 인간 배아줄기세포에 Nanog의 과발현은 feeder cell 없이도 성장할 수 있다(Darr et al., 2006).

6) Lin28

Lin28은 *C. elegans* 발달 시기의 주요한 조절자로(Moss et al., 1997) 진화적으로 보존되어 있는 RNA-binding protein이다. 인간과 생쥐 배아줄기세포에서 Lin28은 높은 수준으로 발현되며, 세포 분화 동안에는 그 발현이 감소한다(Richards et al., 2004; Darr et al., 2006). Lin28은 생쥐 배아줄기세포에서 miRNA let7의 RNA processing을 억제하는데 필수적이며(Viswanathan et al., 2008), let7을 조절함으로써 let7에 의해 조절되는 c-Myc(Koscianska et al., 2007)의 발현을 조절할 수 있는 듯하다. 이는 인간 배아줄기세포의 리프로그래밍 동안 Lin28이 c-Myc을 대체할 수 있음과 일치한다. 인간 배아줄기세포에서 Lin28은 또 다른 리프로그래밍 인자인 Oct4의 전사 후 조절에 관여한다(Qiu et al., 2009).

3. 난자와 배아발달과정 동안 리프로그래밍 인자

1) Oct4

Oct4는 초기 배아와 생식세포, 그리고 성숙 중이거나 성숙한 생식소에서 발현된다(Rosner et al., 1990; Scholer et al., 1990; Yeom et al., 1996; Pesce et al., 1998). Oct4가 제거된 배아는 발달을 끝내지 못하고, peri-implantation 시기에

죽는다. 이러한 배아는 배반포 단계까지 산다고 하더라도 포배의 내세포괴를 *in vitro*에서 키우면 단지 영양포(trophoblast)까지만 진행된다(Nichols et al., 1998). 이는 Oct4가 내세포괴의 만능분화능에 필요하다는 사실을 뒷받침한다. 생식세포에서 Oct4의 불활성화는 생식세포의 분화가 아닌 세포사멸을 유도함으로써 생식세포의 생존에 필요하다는 것을 알 수 있다(Kehler et al., 2004).

2) Sox2

Sox2는 초기 배아와 생식세포에서 발현된다(Koopman et al., 2004). Sox2가 제거된 배아는 낭배의 외피 발달에 문제가 생겨 죽는다(Avilion et al., 2003). Mutant 형태의 Sox2를 발현하는 배반포는 외관적 모양은 정상이나 배반포를 *in vitro*에서 배양할 때 세포증식이 제대로 일어나지 않는다(Avilion et al., 2003). Sox2는 Oct4의 공동인자로써, Sox2 mutant는 Oct4의 표현형과 유사할 것으로 기대되나, Sox2 mutant는 Oct4 mutant보다 배아발달의 더 이후 단계에서 죽는다(Avilion et al., 2003). 이는 Sox2가 초기 배아에서 만능분화능을 유지하는데 중요함을 시사한다.

3) c-Myc

2 세포기의 배아에 c-Myc의 antisense oligomer를 주입하면 농도에 따라 2세포기 혹은 8 세포기/상실배 시기에 배아 발달이 멈춘다. 이러한 결과는 c-Myc은 배아발달과정의 8 세포기/상실배 시기에 작용하여 착상 전 발달에 중요한 역할을 함을 보여준다(Paria et al., 1992).

난자에서 c-Myc의 발현은 핵에서 관찰되며, 주로 pre-mRNA의 스플라이싱을 조절하는 nuclear speckle에서 관찰된다. c-Myc을 포함하고 있는 nuclear speckle의 수는 난자 성장 동안에 감소되지만 크기는 증가되며, 수정 후 전핵 시기에 감소되었다가 2세포기에 다시 나타난다(Suzuki et al., 2009). 이는 c-Myc이 난자 성장과 preimplantation 발달과정에 중요한 역할을 함을 시사한다.

4) Klf4

Klf4는 착상 전 생쥐 배아에서 발현되며, Klf4 knock-out 생쥐는 배아시기에 죽지는 않지만 피부 보호막 기능의 상실로 태어난 후 곧 죽는다(Segre et al., 1999). 그러나 그 이상의 연구가 보고되어 있지 않다.

5) Nanog

Nanog는 배아의 배반포 시기의 내세포괴에서만 발현되며 (Chambers et al., 2003), Nanog가 결핍된 배반포는 외관상 정상이지만, 배반포를 체외에서 배양했을 때 외피에서 유래된 세포가 아닌 내배엽과 유사한 세포를 만들어낸다. 또한 Nanog가 knock-out된 배아의 낭배는 외피와 외배엽을 식별할 수 없다(Mitsui et al., 2003).

6) Lin28

Lin28은 생쥐 배아발달과정 동안 발현되고 있으며, 이는 배아발달과정을 조절하는데 중요한 역할을 하는 유전자임을 시사한다(Yang & Moss, 2003). 그러나 그 이상의 다른 연구가 보고되어 있지 않다.

고 찰

본 종설에서는 체세포의 리프로그래밍의 방법과 그 의미, 또한 리프로그래밍을 통한 유도만능줄기세포를 만들 수 있는 리프로그래밍 인자들에 관한 현재까지의 연구 보고 내용들을 난자와 배아, 그리고 배아줄기세포로 나누어 정리하였다.

유도만능줄기세포는 자신의 체세포를 가지고, 리프로그래밍 인자의 도입을 이용하여 만들 수 있기 때문에 세포 이식 시 면역 거부 반응의 문제를 해결할 수 있다. 또한 자신의 유도만능줄기세포를 만들기 위해 잉여의 배아나 난자가 필요하지 않기 때문에 제작과정에서 나타나는 윤리적인 문제점을 피할 수도 있다. 유도만능줄기세포의 이러한 두 가지 장점은 대체 세포치료제에 더 가까이 갈 수 있는 길을 열어주고 있다. 하지만, 현재의 기술로 만들어진 유도만능줄기세포는 안전성의 문제 때문에 치료에 사용되기에는 아직 적합하지 않으며, 이와 같은 문제점을 해결하기 위하여 앞으로 많은 연구가 집중되어야 할 것이다. 세포치료용으로 유도만능줄기세포를 사용하기 위해 해결해야 할 문제점 중 한 가지는 발암유발유전자와 같은 리프로그래밍 인자의 사용을 피하는 것이다.

더 안전한 새로운 리프로그래밍 인자의 발견은 현재 알려져 있는 리프로그래밍 인자의 작용기전을 연구하고 이해하는 것에서부터 시작되어야 할 것이다. 하지만, 현재 알려진 리프로그래밍 인자에 대한 연구는 배아와 배아줄기세포에서

주로 되어 있으며, 리프로그래밍 인자가 존재하는 또 다른 세포인 난자에서의 연구는 거의 되어 있지 않은 상태이다. 현재 알려진 리프로그래밍 인자들은 배아줄기세포에서는 세포의 자가재생 및 만능분화능에 관여하고 있었으며, 배아에서는 배아발달에 영향을 미치고 있었다.

정상적인 난자의 성장과 성숙은 정상적인 배아발달에 영향을 주며, 난자의 성장과 성숙과정 중에 난자의 competence 즉, 정상적인 수정과 배아발달을 위한 난자의 핵과 세포질 성숙의 특성을 결정하는 것은 결국 매우 정교하게 잘 조절되는 유전자 발현에 의해서라고 할 수 있다. 또한, 난자에서 배아로의 전환은 주로 난자에 존재하고 있는 maternal mRNA에 의해 조절된다. 때문에 난자와 배아발달, 그리고 난자와 배아의 내세포괴로부터 만들어지는 배아줄기세포는 밀접한 연관성을 지니고 있다고 할 수 있겠다. 따라서 난자, 배아 그리고 배아줄기세포에서의 리프로그래밍 인자들의 작용기전의 공통점 혹은 차이점의 비교분석이 반드시 필요하며 이러한 연구는 새로운 리프로그래밍 인자를 발굴하고 이용하도록 하는 연구의 초석이 될 것이다.

감사의 글

본 연구는 한국연구재단 중점연구소지원사업의 연구비 지원으로 수행되었습니다(2009-0093821).

인용문헌

- Adhikary S, Eilers M (2005) Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:635-645.
- Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R (2003) Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev* 17:126-140.
- 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 (2005) Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 122:947-956.

- Cartwright P, McLean C, Sheppard A, Rivett D, Jones K, Dalton S (2005) LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development* 132:885-896.
- Cawley S, Bekiranov S, Ng H, Kapranov P, Sekinger E, Kampa D, Piccolboni A, Sementchenko V, Cheng J, Williams A (2004) Unbiased mapping of transcription factor binding sites along human chromosomes 21 and 22 points to widespread regulation of noncoding RNAs. *Cell* 116:499-509.
- Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A (2003) Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 113:643-655.
- Chen X, Whitney EM, Gao SY, Yang VW (2003) Transcriptional profiling of Kruppel-like factor 4 reveals a function in cell cycle regulation and epithelial differentiation. *J Mol Biol* 326:665-677.
- Cowan C, Atienza J, Melton D, Eggan K (2005) Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science* 309:1369-1373.
- Darr H, Mayshar Y, Benvenisty N (2006) Overexpression of NANOG in human ES cells enables feeder-free growth while inducing primitive ectoderm features. *Development* 133:1193-1201.
- Evans MJ, Kaufman MH (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292:154-156.
- Fernandez P, Frank S, Wang L, Schroeder M, Liu S, Greene J, Cocito A, Amati B (2003) Genomic targets of the human c-Myc protein. *Genes Dev* 17:1115-1129.
- Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, Sun CW, Meissner A, Cassady JP, Beard C, Brambrink T, Wu LC, Townes TM, Jaenisch R (2007) Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science* 318:1920-1923.
- Hinnebusch BF, Siddique A, Henderson JW, Malo MS, Zhang W, Athaide CP, Abedrapo MA, Chen X, Yang VW, Hodin RA (2004) Enterocyte differentiation marker intestinal alkaline phosphatase is a target gene of the gut-enriched Kruppel-like factor. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 286:G23-30.
- Hough SR, Clements I, Welch PJ, Wiederholt KA (2006) Differentiation of mouse embryonic stem cells after RNA interference-mediated silencing of OCT4 and Nanog. *Stem Cells* 24:1467-1475.
- Hyslop L, Stojkovic M, Armstrong L, Walter T, Stojkovic P, Przyborski S, Herbert M, Murdoch A, Strachan T, Lako M (2005) Downregulation of NANOG induces differentiation of human embryonic stem cells to extraembryonic lineages. *Stem Cells* 23:1035-1043.
- Ivanova N, Dobrin R, Lu R, Kotenko I, Levorse J, DeCoste C, Schafer X, Lun Y, Lemischka IR (2006) Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference. *Nature* 442:533-538.
- Jaenisch R, Young R (2008) Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell* 132:567-582.
- Kehler J, Tolkunova E, Koschorz B, Pesce M, Gentile L, Boiani M, Lomeli H, Nagy A, McLaughlin KJ, Scholer HR, Tomilin A (2004) Oct4 is required for primordial germ cell survival. *EMBO Rep* 5:1078-1083.
- Kim D, Kim CH, Moon JI, Chung YG, Chang MY, Han BS, Ko S, Yang E, Cha KY, Lanza R, Kim KS (2009) Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell* 4:472-476.
- Knoepfler PS, Zhang XY, Cheng PF, Gafken PR, McMahon SB, Eisenman RN (2006) Myc influences global chromatin structure. *EMBO J* 25:2723-2734.
- Koopman P, Schepers G, Brenner S, Venkatesh B (2004) Origin and diversity of the SOX transcription factor gene family: genome-wide analysis in *Fugu rubripes*. *Gene* 328:177-186.
- Koscianska E, Baev V, Skreka K, Oikonomaki K, Rusinov V, Tabler M, Kalantidis K (2007) Prediction and preliminary validation of oncogene regulation by miRNAs. *BMC Mol Biol* 8:79-92.

- Lengner CJ, Camargo FD, Hochedlinger K, Welstead GG, Zaidi S, Gokhale S, Scholer HR, Tomilin A, Jaenisch R (2007) Oct4 expression is not required for mouse somatic stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell* 1:403-415.
- Li J, Pan G, Cui K, Liu Y, Xu S, Pei D (2007) A dominant-negative form of mouse SOX2 induces trophectoderm differentiation and progressive polyploidy in mouse embryonic stem cells. *J Biol Chem* 282:19481-19492.
- Li Y, McClintick J, Zhong L, Edenberg HJ, Yoder MC, Chan RJ (2005) Murine embryonic stem cell differentiation is promoted by SOCS-3 and inhibited by the zinc finger transcription factor Klf4. *Blood* 105:635-637.
- Li Z, Van Calcar S, Qu C, Cavenee W, Zhang M, Ren B (2003) A global transcriptional regulatory role for c-Myc in Burkitt's lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:8164-8169.
- Loh YH, Wu Q, Chew JL, Vega VB, Zhang W, Chen X, Bourque G, George J, Leong B, Liu J, Wong KY, Sung KW, Lee CW, Zhao XD, Chiu KP, Lipovich L, Kuznetsov VA, Robson P, Stanton LW, Wei CL, Ruan Y, Lim B, Ng HH (2006) The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat Genet* 38:431-440.
- Lowry WE, Richter L, Yachechko R, Pyle AD, Tchieu J, Sridharan R, Clark AT, Plath K (2008) Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:2883-2888.
- Maherali N, Sridharan R, Xie W, Utikal J, Eminli S, Arnold K, Stadtfeld M, Yachechko R, Tchieu J, Jaenisch R, Plath K, Hochedlinger K (2007) Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell* 1:55-70.
- Masui S, Nakatake Y, Toyooka Y, Shimosato D, Yagi R, Takahashi K, Okochi H, Okuda A, Matoba R, Sharov AA, Ko MS, Niwa H (2007) Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol* 9:625-635.
- Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, Maruyama M, Maeda M, Yamanaka S (2003) The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 113:631-642.
- Moss EG, Lee RC, Ambros V (1997) The cold shock domain protein LIN-28 controls developmental timing in *C. elegans* and is regulated by the lin-4 RNA. *Cell* 88:637-646.
- Nagy A, Gocza E, Diaz EM, Prideaux VR, Ivanyi E, Markkula M, Rossant J (1990) Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse. *Development* 110:815-821.
- Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, Scholer H, Smith A (1998) Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 95:379-391.
- Niwa H, Miyazaki J, Smith AG (2000) Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* 24:372-376.
- O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT (2005) c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* 435:839-843.
- Paria BC, Dey SK, Andrews GK (1992) Antisense c-myc effects on preimplantation mouse embryo development. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:10051-10055.
- Park IH, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo H, Ince TA, Lerou PH, Lensch MW, Daley GQ (2008) Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 451:141-146.
- Pesce M, Wang X, Wolgemuth DJ, Scholer H (1998) Differential expression of the Oct-4 transcription factor during mouse germ cell differentiation. *Mech Dev* 71:89-98.
- Qiu C, Ma Y, Wang J, Peng S, Huang Y (2009) Lin28-

- mediated post-transcriptional regulation of Oct4 expression in human embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* 38:1240-1248.
- Richards M, Tan SP, Tan JH, Chan WK, Bongso A (2004) The transcriptome profile of human embryonic stem cells as defined by SAGE. *Stem Cells* 22:51-64.
- Rosner MH, Vigano MA, Ozato K, Timmons PM, Poirier F, Rigby PW, Staudt LM (1990) A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. *Nature* 345:686-692.
- Scholer HR, Ruppert S, Suzuki N, Chowdhury K, Gruss P (1990) New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4. *Nature* 344:435-439.
- Segre JA, Bauer C, Fuchs E (1999) Klf4 is a transcription factor required for establishing the barrier function of the skin. *Nat Genet* 22:356-360.
- Shimozaki K, Nakashima K, Niwa H, Taga T (2003) Involvement of Oct3/4 in the enhancement of neuronal differentiation of ES cells in neurogenesis-inducing cultures. *Development* 130:2505-2512.
- Suzuki T, Abe K, Inoue A, Aoki F (2009) Expression of c-MYC in nuclear speckles during mouse oocyte growth and preimplantation development. *J Reprod Dev* 55:491-495.
- Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126:663-676.
- Taranger CK, Noer A, Sorensen AL, Hakelien AM, Boquest AC, Collas P (2005) Induction of dedifferentiation, genomewide transcriptional programming, and epigenetic reprogramming by extracts of carcinoma and embryonic stem cells. *Mol Biol Cell* 16:5719-5735.
- Viswanathan SR, Daley GQ, Gregory RI (2008) Selective blockade of microRNA processing by Lin28. *Science* 320:97-100.
- Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH (1997) Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385:810-813.
- Yang DH, Moss EG (2003) Temporally regulated expression of Lin-28 in diverse tissues of the developing mouse. *Gene Expr Patterns* 3:719-726.
- Yeom YI, Fuhrmann G, Ovitt CE, Brehm A, Ohbo K, Gross M, Hubner K, Scholer HR (1996) Germline regulatory element of Oct-4 specific for the totipotent cycle of embryonal cells. *Development* 122: 881-894.
- Zaehres H, Lensch MW, Daheron L, Stewart SA, Itskovitz-Eldor J, Daley GQ (2005) High-efficiency RNA interference in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 23:299-305.
- Zhang W, Geiman DE, Shields JM, Dang DT, Mahatan CS, Kaestner KH, Biggs JR, Kraft AS, Yang VW (2000) The gut-enriched Kruppel-like factor (Kruppel-like factor 4) mediates the transactivating effect of p53 on the p21WAF1/Cip1 promoter. *J Biol Chem* 275: 18391-18398.

(received 17 February 2010, received in revised form 14 April 2010, accepted 15 April 2010)