

بررسی بیان ژن‌های خودبازسازی Tbx3، Tc11، Esrrb و Dppa4 در سرطانهای

کولون، کبد، پروستات و مثانه

صبریه امینی^۱، فردین فتحی^۲، بهرام نیکخو^۳، حشمت الله صوفی مجیدپور^۴، جعفر مبلنی^۵

۱- استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج، سنندج، ایران

۲- دانشیار گروه علوم تشریح، مرکز تحقیقات علوم سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران (مؤلف مسؤول)،

تلفن ۰۸۷۱-۶۱۳۱۳۷ farfath@gmail.com

۳- استادیار گروه پاتولوژی، مرکز تحقیقات علوم سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران

۴- دانشیار گروه اورولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران

۵- استادیار گروه جراحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران

چکیده

زمینه و هدف: بیان ژنهای خودبازسازی Tbx3، Tc11، Esrrb، Dppa4 در رده‌های سلولی سرطانی کولون (Caco2 و HT-29)، کبد (HepG2)، پروستات (LN-Cap)، مثانه (HT-1376) و در نمونه‌های تومور انسانی کولون، مثانه و پروستات مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی: سلول‌های Caco2، HT-29، HT 1376، Ln Cap و HepG2 در فلاسکهای T25 کشت داده شدند. همچنین نمونه‌های تومور انسانی تحت نظارت مستقیم پزشک متخصص و با توجه به علائم بالینی و یافته‌های آزمایشگاهی جمع‌آوری شدند. سپس بیان ژن‌های خودبازسازی Tbx3، Tc11، Esrrb، Dppa4 با استفاده از تکنیک Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) در سلول‌های مذکور و در نمونه‌های تومور انسانی مورد ارزیابی قرار گرفت. برای اطمینان از صحت آزمایش‌های انجام شده، نمونه‌های کنترل منفی و بیان ژن کنترل داخلی نیز مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج ارزیابی‌های RT-PCR نشان داد که در دودمان‌های سلولی سرطانی و در نمونه‌های توموری مورد مطالعه، ژن‌های خودبازسازی Tbx3، Tc11، Esrrb، Dppa4 بیان می‌شوند.

نتیجه‌گیری: سلول‌های سرطانی کولون، کبد، پروستات و مثانه بیان ژن‌های Tbx3، Tc11، Esrrb، Dppa4 را که از مارکرهای اختصاصی سلول‌های بنیادی می‌باشند، بیان می‌کنند که این مسئله نشان می‌دهد در جمعیت سلول‌های سرطانی مذکور، تعدادی از سلول‌ها، ویژگی سلول‌های بنیادی را دارند و در تکثیر سلول‌های سرطانی نقش اصلی را بر عهده دارند.

کلیدواژه‌ها: سلول‌های بنیادی سرطانی، ژنهای خودبازسازی، سرطان کولون، سرطان کبد، سرطان پروستات، سرطان مثانه

وصول مقاله: ۸۹/۷/۲۲ اصلاحیه نهایی: ۸۹/۱۰/۲۷ پذیرش مقاله: ۸۹/۱۱/۷

مقدمه

(cancer) بسیاری از تومورها از سلول‌های بنیادی بافت‌های تمایز یافته منشأ می‌گیرند (۵ و ۴). در هر توده توموری، تعداد اندکی از سلول‌ها، به سلول‌های بنیادی شباهت دارند. این سلول‌ها، دارای توانایی مقاومت در برابر عوامل القاء کننده آپوپتوزیس و شیمی درمانی

سرطان‌های کولون، کبد، مثانه و پروستات از مهمترین عوامل مرگ و میر ناشی از سرطان در جهان می‌باشند (۱-۳). بر اساس نظریه جدید اشتقاق سلولهای سرطانی از سلولهای بنیادی (Stem cell origin of

می‌باشند و پیشنهاد می‌شود یکی از عوامل بازگشت سرطان پس از انهدام تومورهای اولیه باشند (۷ و ۶). حضور بن‌یاخته‌های سرطانی اولین بار در سرطان خون شناسایی شد (۹ و ۸) و پس از آن در چندین سرطان از جمله سینه، مغز، پروستات، کبد، ریه، ملانوما و کولون نیز شناسایی شد (۱۵-۱۰). دو گروه مختلف از ژنها *Nanog/oct4/sox2* و *Tbx3/Tcl1/Esrrb/Dppa4* تنظیم‌کننده اصلی حفظ فرآیند خودتجدیدی در سلول‌های بنیادی جنینی می‌باشند و باعث مهار فرآیند تمایز در طی تکوین جنین می‌شوند. افزایش بیان هر کدام از آنها خاصیت پرتوانی را هم در سلول‌های بنیادی موش و هم در انسان افزایش می‌دهد (۱۷ و ۱۶). شبکه تنظیمی ژنهای *Oct4*، *Nanog* و *Sox2* باعث تنظیم ژنهای *Tbx3*، *Tcl1*، *Esrrb* و *Dppa4* می‌شوند و هر دو مسیر با همکاری متقابل در تنظیم خودتجدیدی و مهار تمایز سلولهای بنیادی جنینی نقش اساسی ایفا می‌کنند. مثلاً در صورت کاهش بیان ژنهای *Tcl1*، *Tbx3* و *Esrrb* بیان ژن *Nanog* به شدت افزایش می‌یابد تا فرآیند خودتجدیدی و تمایز سلولهای بنیادی دچار اختلال نشود (۱۷). *Oct4*، *Nanog* و *Sox2* به صورت یک شبکه مرکزی در تکثیر و خودتجدیدی سلول‌های بنیادی جنینی، نقش اساسی ایفا می‌کنند و باعث مهار فرایند تمایز در طی تکوین جنین می‌شوند (۱۸). بیان این سه ژن در تعدادی از تومورها و دودمان‌های سلولی سرطانی نیز نشان داده شده است (۲۰ و ۱۹). ژن *Tcl1* در هموستازی پوست و فولیکول مو نقش اساسی دارد. افزایش بیان این ژن، تکثیر سلولهای بنیادی جنینی را افزایش می‌دهد و مهار آن باعث کاهش فرایند خودتجدیدی در سلولهای بنیادی جنینی می‌شود (۲۱ و ۲۲). ژن *Oct4* به پروموتور ژن *Tcl1* متصل می‌شود

و نسخه برداری آن را فعال می‌کند (۲۳). بیان این ژن به طور محدود در تعدادی از سرطانها مانند لمفوما و در سرطان بیضه با منشأ سلولهای جنسی نشان داده شده است (۲۵ و ۲۴). پروموتور ژن *Tcl1* بوسیله ژن *Oct4* بطور مثبت تنظیم می‌شود (۲۶). ژن *Tbx3* فرآیند خودتجدیدی را در سلولهای بنیادی در مراحل تکوین جنینی تنظیم می‌کند (۲۷). بیان ژن *Tbx3* بوسیله مسیر *wnt-β* *catenin* فعال می‌شود و باعث تکثیر و حفظ سلولهای سرطانی می‌شود (۲۸). در انسان موتاسیون در این ژن موجب سندرم UMS (Ulnar-Mammary Syndrome) می‌شود که با هیپوپلازی غده پستان و آنومالی‌های ارثی همراه است که نشان می‌دهد این ژن برای تکوین نرمال پستان ضروری است (۲۹). بیان این ژن در سرطانهای پستان، تخمدان و اندومتریم شناسایی شده است. (۳۰ و ۳۱). ژن *Esrrb* (estrogen related receptorβ) از خانواده ریسپتورهای Orphan می‌باشد که نقش مهمی در تنظیم خودتجدیدی و مهار تمایز سلولهای بنیادی جنینی بر عهده دارد که برای تنظیم دقیق این فرآیندها با ژنهای *Oct4*، *Nanog* و *Sox2* همکاری متقابل دارد و نسخه برداری ژن *Oct4* را فعال می‌کند (۳۲). مهار ژن *Esrrb* باعث پیشبرد فرایند تمایز می‌شود و افزایش بیان آن خودتجدیدی را در سلولهای بنیادی جنینی افزایش می‌دهد و بیان آن در طی تکوین جفت نقش اساسی دارد (۳۳ و ۳۲). ژن *Dppa4* (Developmental pluripotency associated 4) در هسته سلولهای بنیادی جنینی همراه با کروماتین فعال در حال نسخه برداری قرار دارد. آنالیزهای بیوشیمیایی نشان داده است که این ژن هم بطور مستقیم و هم از طریق هیستون H3 می‌تواند به DNA متصل شود و از این راه ساختار کروماتین را تنظیم می‌کند. این ژن در سلولهای بنیادی جنینی به میزان

رضا بهرامی) در اختیار محققان این مطالعه قرار گرفت. رده سلولی NT2 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. برای کشت این سلولها از محیط کشت‌های DMEM (Dulbeccos Modified Eagles Medium) و RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 سرم جنین گاوی (Fetal bovin serum) FBS، به میزان ۱۵٪، اسید آمینه‌های غیر ضروری (Non essential amino acids: NEAA) به میزان یک درصد، پنی سیلین ۱۰۰ml/u، استرپتومایسین ۵۰ml/μg استفاده شد. سلولها در فلاسکهای T25 و در انکوباتور با دمای ۳۷°C و میزان ۵٪ CO2 کشت داده شدند.

نمونه‌گیری از انسان

نمونه‌های انسانی مورد نیاز این تحقیق از بیمارستان امام خمینی تهران، بیمارستان توحید و بیمارستان بعثت سنجید جمع‌آوری شدند. نمونه‌های مورد نظر، تحت نظارت مستقیم پزشک متخصص و با توجه به علائم بالینی و یافته‌های آزمایشگاهی جمع‌آوری شدند. نمونه‌های بیوپسی در میکروتیوب استریل و عاری از RNase و در تانک ازت قرار داده شد و پس از انتقال به آزمایشگاه، نمونه‌ها تا مرحله استخراج RNA در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری می‌شدند. تعداد نمونه‌های مورد مطالعه شامل ۱۰ نمونه تومور مثانه، ۵ نمونه تومور پروستات و ۵ نمونه تومور کولون بود.

ارزیابی RT-PCR

از RT-PCR جهت تایید بیان ژنهای مورد مطالعه (جدول ۱) استفاده شد. برای این منظور، ابتدا با استفاده از محلول استخراج (RNX Plus, Sinagen) RNA ی کل (Total RNA) از سلولهای سرطانی استخراج شد و پس از اطمینان یافتن از کیفیت RNA استخراج شده با انجام الکتروفورز ژل آگارز و اسپکتروفوتومتری،

بالا بیان می‌شود اما عملکرد آن به خوبی شناسایی نشده است. تاکنون بیان ژن Dppa4 و Esrrb در سرطانهایی انسان بررسی نشده است (۳۴). به دلیل شیوع بالای سرطانهایی کولون، پروستات، مثانه و کبد و ضعف‌های موجود در روشهای متداول تشخیص آنها که دارای دقت و حساسیت نمی‌باشند شناسایی تومور مارکرهایی که بتوانند ماهیت بیولوژیکی تومورها را پیش بینی کنند اهمیت زیادی خواهند داشت. هدف از این تحقیق بیان ژنهای Esrrb، Dppa4، Tcl1 و Tbx3 با استفاده از روش RT-PCR در رده‌های سلولی سرطان کولون HT-29 و Caco2، رده سلولی سرطان پروستات LN-cap، رده سلولی سرطان کبد HepG2 و در رده سلولی سرطان مثانه HT-1376، همچنین در نمونه‌های توموری انسانی است چرا که بیان ژنهای مذکور علاوه بر آنکه می‌توانند به عنوان مارکر حالت سرطانی استفاده شوند، با توجه به نقش مهم آنها در سلول‌های بنیادی می‌توانند تأیید دیگری برای فرضیه Cancer stem cell بوده و خصوصیات بن یاخته‌های سرطانی یک تومور را بازگو کنند.

روش بررسی

روش کشت سلول‌های سرطانی مورد مطالعه

در این مطالعه که یک مطالعه توصیفی با ویژگی تشخیصی است از رده‌های سلولی Caco2 و HT-29 مشتق از آدنو کارسینومای کولورکتال انسان، HT1376 (کارسینومای مثانه)، HepG2 (کارسینومای کبد) و LnCap (کارسینومای پروستات) استفاده شد که از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند. رده سلولی NT2 که یک رده سلولی کارسینومای جنینی انسانی می‌باشد، از طرف دانشگاه شفیلد (اهدائی از طرف دکتر احمد

۹۴ درجه سانتی‌گراد، Annealing ۴۵ ثانیه در دمای ۵۸-۶۴ (بر اساس نوع پرایمر) و Extention ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه انجام گرفت. تعداد سیکل ۳۵ و یک سیکل Extention نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد. جهت انجام هر دو واکنش RT و PCR از دستگاه ترمال سایکلر (Eppendorf) استفاده شد. ژن GAPDH به عنوان کنترل داخلی مورد استفاده قرار گرفت. بعد از اتمام واکنش ۸ میکرولیتر از محصول واکنش PCR توسط الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد بررسی شد. پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه با کمک نرم افزارهای Gene runner و Primer3 طراحی شد.

مراحل تهیه cDNA از آن به انجام رسید. RNA استخراج شده با استفاده از پرایمر (Random Hexamer) و کیت RT (Bioneer) نسخه برداری معکوس شد. واکنش RT در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر انجام گرفت. پس از تهیه cDNA، واکنش PCR جهت تکثیر قطعه مورد نظر انجام گرفت. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام شد و جهت تهیه حجم مذکور علاوه بر DNA الگو (محصول واکنش RT) از کیت PCR (Bioneer)، آب مقطر استریل و پرایمرهای بالادست (Forward) و پایین دست (Reverse)، با مشخصات مورد اشاره در جدول یک استفاده شد. پس از آماده ساختن حجم مورد نظر جهت انجام واکنش، واکنش PCR با شرایط Denaturation ۴۵ ثانیه در دمای

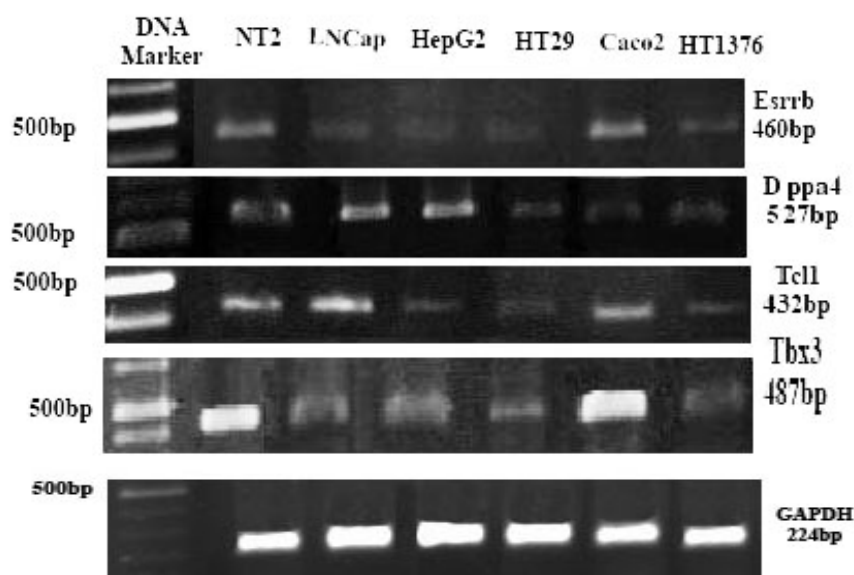
جدول ۱: اسامی ژنها و توالی مربوط به پرایمرهای بالادست (F) و پایین دست (R)

Product (bp) size	Annealing Temperature	Sequences	primer	Gene
224	59	CCAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAACA	F	hGAPDH
	59	AGGGTCTCTCTCTTCTCTTGCTC	R	
527	62	AAAAGCAAGAAGGGAGAGTGA	F	hDppa4
	62	CGGAGATTGCACTGAACTGA	R	
432	61	GATACCGATCCTCAGACTCCA	F	hTCL1
	61	GAGGGACAGAAGGGACAGAA	R	
487	58	GAAGAAGAGGTGGAGGACGA	F	hTBX3
	58	ATTCAGTTTCGGGGAACAAG	R	
460	62	TCAGAGAGCAGCCCATACCT	F	hEsrrb

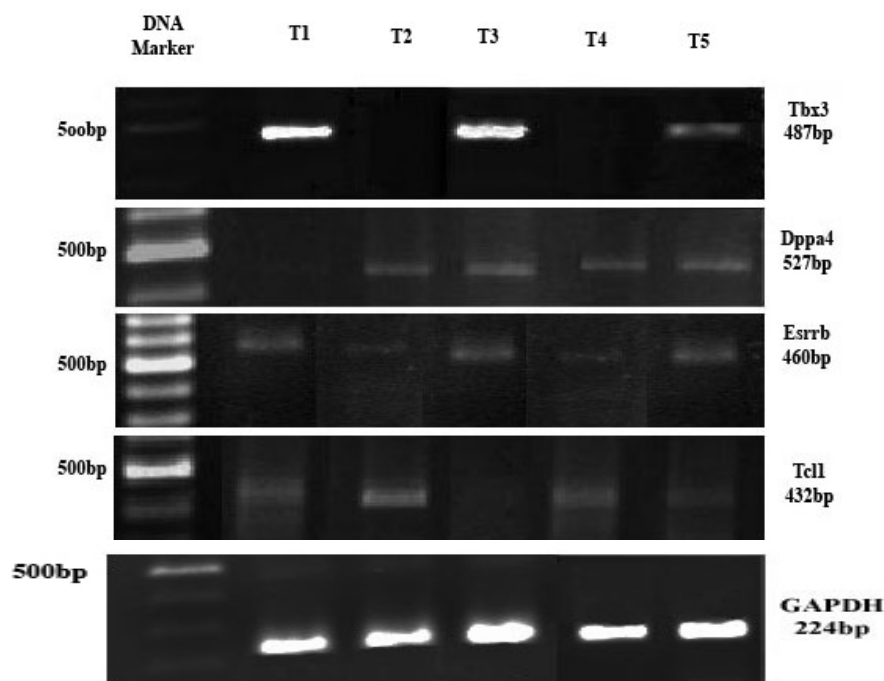
یافته‌ها

(شکل‌های ۱ تا ۴) و اندازه باندهای مربوط به ژنهای مورد مطالعه مطابق با الگوی پرایمر طراحی شده بود (جدول ۱). در هیچکدام از نمونه‌های نرمال کولون مورد مطالعه بیان ژنهای مذکور مشاهده نشد.

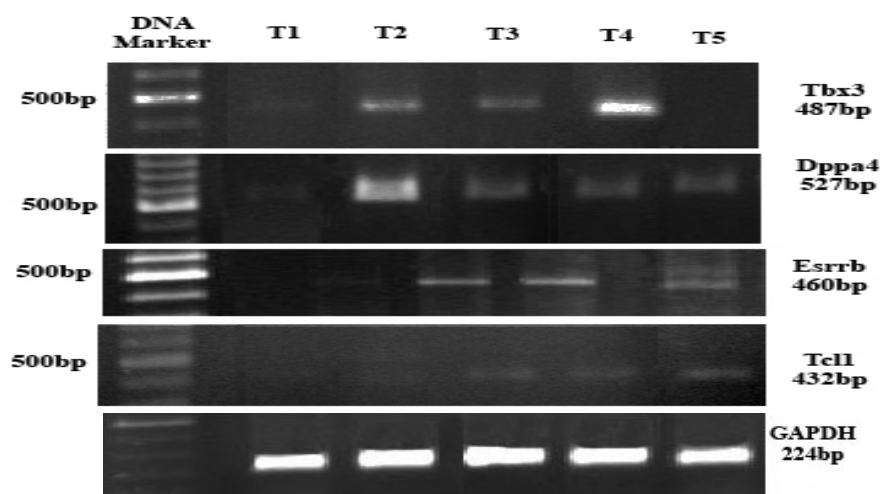
بیان ژنهای اختصاصی سلولهای بنیادی در سلول‌های مورد مطالعه، به روش RT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. بیان ژنهای Tbx3، Dppa4، Tcl1 و Esrrb در سلولهای سرطانی HT-29، HT1376، LnCap، Caco2، HepG2 و در نمونه‌های توموری مشاهده شد.



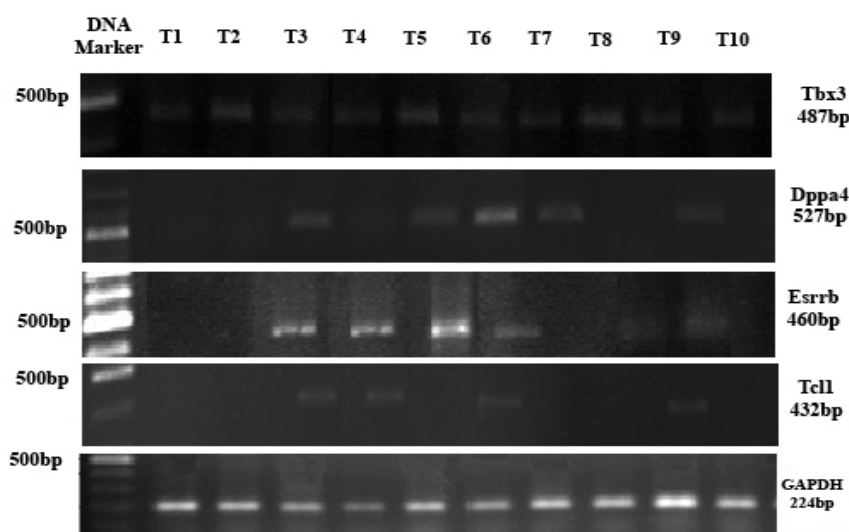
شکل ۱: بیان ژن‌های خودبازسازی Esrrb، Tbx3، Dppa4 با استفاده از تکنیک RT-PCR در رده‌های سلولی HT-29 و Caco2 آدنوکارسینومای کولورکتال، Lncap کارسینومای پروستات، HepG2 کارسینومای کبد، HT-1376 کارسینومای مثانه. دودمان سلولی NT2 بعنوان کنترل مثبت استفاده شد. همچنین ژن GAPDH بعنوان ژن کنترل داخلی مورد استفاده قرار گرفت ژن Esrrb در رده‌های سلولی HT-29 و HepG2، Lncap به مقدار جزئی بیان شد.



شکل ۲: بیان ژن‌های خودبازسازی Tc11، Esrrb، Tbx3 و Dppa4 با استفاده از تکنیک RT-PCR در نمونه‌های توموری پروستات. به عنوان ژن کنترل داخلی مورد استفاده قرار گرفت. در نمونه‌های توموری T2 و T4 بیان ژن Tbx3 مشاهده نشد. همچنین در نمونه‌های توموری T1 و T3 به ترتیب بیان ژنهای Dppa4 و Tc11 مشاهده نشد.



شکل ۳: بیان ژن‌های خودبازسازی Tbx3، Esrrb، Tcl1 و Dppa4 با تکنیک RT-PCR در نمونه‌های توموری کولون. GAPDH به عنوان ژن کنترل داخلی مورد استفاده قرار گرفت. در نمونه‌های توموری T1 بیان ژنهای Esrrb، Tbx3، Tcl1 مشاهده نشد و ژن Dppa4 به میزان جزئی بیان شد. همچنین در سایر نمونه‌های تومور پروستات، بیان ژن Tcl1 به صورت جزئی مشاهده شد و در نمونه T5 بیان ژن Tbx3 مشاهده نشد.



شکل ۴: بیان ژن‌های خودبازسازی Tbx3، Esrrb، Tcl1 و Dppa4 با استفاده از تکنیک RT-PCR در نمونه‌های توموری مثانه. همچنین ژن GAPDH بعنوان ژن کنترل داخلی مورد استفاده قرار گرفت. همانطوری که در شکل ملاحظه می‌شود در بعضی از نمونه‌ها بیان بعضی از ژنهای مورد مطالعه مشاهده نشد.

بحث

HT-1376، سرطان کبد HepG2، سرطان پروستات LN-cap و در نمونه‌های انسانی تومور کولون، مثانه و پروستات نشان داد، حائز اهمیت است. امروزه ژن‌هایی

نتایج این پژوهش به این دلیل که برای اولین بار بیان ژنهای Tbx3، Esrrb، Tcl1 و Dppa4 را در رده‌های سلولی سرطان کولون Caco2 و HT-29، سرطان مثانه

سلولهای بنیادی جنینی افزایش می‌دهد. مهار ژن *Esrrb* باعث پیشبرد فرآیند تمایز می‌شود. موشهای موتانت در این ژن تکثیر غیر عادی تروفوبلاست و تمایز زودرس به سمت سلولهای سنسیتو تروفوبلاست را نشان دادند (۳۲). تاکنون گزارش قابل توجهی از بیان ژن *Esrrb* در سلولهای سرطانی گزارش نشده است. ژن *Dppa4* در سلولهای بنیادی جنینی به میزان بالا بیان می‌شود و در پلوری پوتنسی سلولهای بنیادی جنین موش نقش مهمی دارد و تمایز سلولهای بنیادی جنینی را به سمت دودمانهای اکتودرم اولیه تنظیم می‌کند. اما عملکرد آن به خوبی شناسایی نشده است. تاکنون بیان ژن *Dppa4* در سرطان های انسان بررسی نشده است (۳۴). در تحقیق حاضر بیان ژن *Dppa4* و *Esrrb* نیز برای اولین بار در رده‌های سلولی و نمونه‌های توموری مورد مطالعه نشان داده شد. در مطالعات قبلی بیان این دو ژن در سلولهای بنیادی جنینی در انسان و موش نشان داده شده بود (۳۴) و (۳۲). با توجه به اینکه در هر توده توموری تعدادی از سلولها، ویژگی سلولهای بنیادی جنینی را دارا می‌باشند (۶۷) پس می‌توان بیان ژنهای خودبازسازی مورد بررسی را دلیل حضور سلولهای بنیادی در رده‌ها و نمونه‌های توموری مورد مطالعه دانست.

نتیجه‌گیری

در مجموع نتایج حاصل از تحقیق حاضر بیان ژنهای خودتجدیدی *Tbx3*، *Tcl1*، *Dppa4* و *Esrrb* را برای اولین بار در رده‌های سلولی سرطان HT-29، HT1376، LnCap و HepG2 و در نمونه‌های توموری کولون، مثانه و پروستات نشان داد که این امر تأییدی بر نظریه Cancer stem cell می‌باشد. با مطالعات بیشتر روی عملکرد این ژنها با استفاده از تکنیک‌های پیشرفته

که در کنترل خودبازسازی سلول های بنیادی نقش دارند به عنوان دسته جدیدی از مارکرهای مولکولی سرطان معرفی شده‌اند که بیان کنترل نشده آنها از اهمیت زیادی در فرآیند سرطانی شدن برخوردار است (۵ و ۴). ژن *Tcl1* بعنوان یک انکوژن در لوکیمیای T-cell شناخته شده است. افزایش بیان این ژن نقش مهمی در شروع لوکیمیای T-Cell در انسان و موش دارد (۲۱). بیان این ژن به طور محدود در تعدادی از سرطانها بررسی شده است. در سال ۲۰۱۰ Sean و همکاران بیان ژن *Tcl1* را در سرطان بیضه با منشأ سلولهای جنسی نشان دادند (۲۵). ژن *Tbx3* بعنوان یک ژن مهارکننده آپوپتوزیس شناسایی شده است (۲۹). بیان ژن *Tbx3* بوسیله مسیر wnt- β catenin فعال می‌شود و باعث تکثیر و حفظ سلولهای سرطانی می‌شود (۲۹). افزایش بیان ژن *Tbx3* با مهار ژن P14 باعث افزایش تقسیم سلولهای اپیتلیالی شده و می‌تواند منجر به بروز سرطان شود اما مکانیسم آن ناشناخته است (۳۰). بیان این ژن در سرطانهای پستان، تخمدان و اندومترיום شناسایی شده است. با توجه به نقش کلیدی این ژن در کارسینوژنز، مهار فعالیت *Tbx3* می‌تواند یک راهکار درمانی مناسب برای درمان سرطان باشد (۳۱). نتایج حاصل از تحقیق حاضر بیان ژنهای *Tcl1* و *Tbx3* را با استفاده از روش RT-PCR برای اولین بار در رده‌های سلولی Caco2، HT-29، LnCap HepG2، HT-1376 و در نمونه‌های توموری کولون، مثانه و پروستات نشان داد که نتایج حاصل از یافته‌های محققان قبلی را در مورد بیان این ژنها در تعدادی از سرطانها تایید می‌کند. Ito و همکاران در سال ۲۰۰۵ نشان دادند که افزایش بیان ژن *Tbx3* موجب افزایش تکثیر سلولهای اپیتلیالی و سرطان مثانه در موش می‌شود (۲۹). افزایش بیان ژن *Esrrb* خودتجدیدی را در

تشکر و قدردانی

این پژوهش با هزینه و مساعدت معاونت پژوهشی دانشگاه‌های علوم پزشکی کردستان و آزاد سندج انجام شده که بدینوسیله قدردانی می‌شود.

مولکولی مانند مهار این ژن‌ها در سلول‌های سرطانی با استفاده از siRNA و بررسی اثر آن در کنترل تکثیر سلولی، همچنین استفاده از تکنیک Gene Chip، در آینده نتایج مهمتر و قابل اعتمادتری به دست خواهد آمد.

References

1. Cohen SM, Shirai T, Steineck G. Epidemiology and Etiology of premalignant and malignant urothelial changes. *Scandinavian J Urol and Nephro* 2000; 205, 105.
2. Parkin DM, Pisani P, and Ferlay J. Global cancer statistics *CA Cancer. J Clin* 1: 33-64.
3. Vinay Kumar, Abul K. Abbas. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. *Advances in Anatomic Pathology*: 2005 , p 103. Book Reviews.
4. Costjeva EV, Thilly WG. Stem cell stages and the origin of colon cancer. *Stem Cell Rev* 2005; 1: 243-51.
5. Clarke MF, Fuller M. Stem cell and cancer. *Cell* 2006; 124: 1111-5.
6. Haraguchi N, Inoue H, Tanaka F. Cancer stem cells in human gastrointestinal cancers. *Hum Cell* 2006; 19: 24-29.
7. Al-Hajj M, Clarke MF. Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene* 2004; 23: 7274-82.
8. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997; 3: 730-736.
9. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 1994; 17: 645-648.
10. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci* 2003; 100: 3983-3988.
11. Singh, S. Identification of human brain tumor initiating cells. *Nature* 2004; 432: 396-401.
12. Collins At, Berry PA. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res* 2005; 65: 10946-10951.
13. Chiba T, Kita K, Zheng YW, Yokosuka O, Saisho H, Iwama A and et al. Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like properties. *Hepatology* 2006; 44: 240-251.
14. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 2007; 445: 106-110.
15. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 2007; 445: 111-115.
16. Jose M, Galan-Caridad, Sivan Harel, Teresita L, Arenzana Z, Esther Hou, and et al. Zfx controls the self-renewal of embryonic and hematopoietic stem cells. *Cell* 2007; 129: 345-357.
17. Ivanova N, Dobrin R, Lu R, Kotenko I, Levorse J, DeCoste C and et al. Dissecting selfrenewal in stem cells with RNA interference. *Nature* 2006; 442: 533-538.
18. Rodda Dj, Chew JL, Lim LH, Loh YH, Wang B, Ng HH, and et al. Transcriptional regulation of Nanog by Oct4 and Sox2. *J Biol Chem* 2005; 280: 24731-24737.
19. Ezech U, Turek P, Reijo R, Clark AT. Human Embryonic Stem Cell Genes OCT4, NANOG, STELLAR, and GDF3 Are Expressed in Both Seminoma and Breast Carcinoma. *CANCER*. 2005; 104: 2255-2265.
20. Atlasi Y, Mowla Sj. OCT-4, an embryonic stem cell marker, is highly expressed in bladder cancer. *Int j cancer*. 2007; 120: 1598-1602.

21. Narducci MG, Fiorenza MT, Kang SM, Bevilacqua A, Di Giacomo M, Remotti D and et al. TCL1 participates in early embryonic development and is overexpressed in human seminomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002; 99: 11712-11717.
22. Lock RB. TCL1: A new drug target in lymphoid and germ-cell malignancies? *Int J Biochem Cell Biol* 2003; 35: 1614-1618.
23. Bichi R, Shinton A, Martin, ES, Koval A, Calin GA, Cesari R and et al. Human chronic lymphocytic leukemia modeled in mouse by targeted TCL1 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 6955-6960.
24. Hoyer KH, French SW, Turner DE, Nguyen MTN, Renard M, Malone CS and et al. Dysregulated TCL1 promotes multiple classes of mature B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 14392-14397.
25. Lau SK, Weiss M, Chu PG. TCL1 Protein Expression in testicular germ cell tumors. *Am J Clin Pathol* 2010; 133: 762-766.
26. Ryo Matoba, Hitoshi Niwa, Shinji Masui, Satoshi Ohtsuka, Mark G. Carter. Dissecting Oct3/4-Regulated Gene Networks in Embryonic Stem Cells by Expression Profiling. *PloS ONE* 2006;1:e26.
27. Carlson H, Ota S, Campbell CE, Hurlin PJ. A dominant repression domain in Tbx3 mediates transcriptional repression and cell immortalization: relevance to mutations in Tbx3 that cause ulnar-mammary syndrome. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 2403-2413.
28. Renard CA, Labalette C, Armengol C. Tbx3 is a downstream target of the Wnt/ β -catenin pathway and a critical mediator of β -catenin survival functions in liver cancer. *Cancer Res* 2007; 67: 901-910.
29. Ito A, Asamoto M, Hokaiwado N, Takahashi S, Shirai T. Tbx3 expression is related to apoptosis and cell proliferation in rat bladder both hyperplastic epithelial cells and carcinoma cells. *Cancer Lett* 2005;219:105–112.
30. Yarosh W, Barrientos T, Esmailpour T, Lin L, Carpenter PM, Osann K. et al. TBX3 Is Overexpressed in Breast Cancer and Represses p14 by Interacting with Histone Deacetylases . *Cancer Res* 2008; 68: 693-969.
31. Lomnytska M, Dubrovskaya A, Hellman U, Volodko N, Souchelnytskyi S. Increased expression of cSHMT, Tbx3 and utrophin in plasma of ovarian and breast cancer. *Int J Cancer* 2006; 118:412–421.
32. Zhang X, Zhang J, Wang T, Esteban MA, Pei D. Esrrb activates Oct4 Transcription and sustains self-renewal and pluripotency in embryonic stem cells. *J Biol Chem* 2008; 283: 35825-33.
33. van den Berg DL, Zhang W, Yates A, Engelen E, Takacs K, Bezstarosti K and et al. The estrogen related receptor beta interacts with Oct4 to positively regulate Nanog gene expression. *Mol Cell Biol* 2008; 28: 5986-5995.
34. Chakravarthy H, Boer B, Desler M, Mallanna SK, McKeithan TW, Rizzino A. Identification of DPPA4 and other genes as putative Sox2:Oct-3/4 target genes using a combination of in silico analysis and transcription-based assays. *J Cell Physiol* 2008; 216: 651-662.