



UPPSALA  
UNIVERSITET

# Inducerade pluripotenta stamceller

En möjlighet för regenerativ medicin i framtiden?

Johanna Sköld

---

Independent Project in Biology  
Självständigt arbete i biologi, 15 hp, höstterminen 2012  
Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

## Sammandrag

Shinya Yamanaka och hans kollegors upptäckt av de inducerade pluripotenta stamcellerna år 2006 har lett till förhoppningar om användning av dessa celler för regenerativ medicin. Cellerna kan skapas från en fullt differentierad cell (till exempel en hudcell), omprogrammeras till att bli en pluripotent stamcell för att sedan differentiera till en mängd olika celltyper. Dessa celler skulle alltså i idealfallet kunna skapas från en patient med till exempel Parkinsons sjukdom till att bli fullt fungerande dopaminproducerande celler som genom transplantation skulle kunna bota sjukdomen hos patienten i fråga. Cellerna innehåller då patientens eget DNA vilket kan minska risken för avstötning efter transplantation. En annan fördel med dessa celler är att de har liknande egenskaper som de embryonala stamcellerna vilket gör att den kontroversiella forskningen på embryon skulle kunna minska.

Än så länge kan dock cellerna inte användas *in vivo* på patienter. En mängd olika komplikationer uppstår vid omprogrammeringen såsom punktmutationer i genomet och tumörbildning efter transplantation. Dessa hinder måste undanröjas innan cellerna kan användas för transplantation på patienter. Cellerna har dock redan nu fungerat bra som modeller för olika sjukdomar och som celler att testa läkemedel på *in vitro*. Denna uppsats handlar om forskningen kring de inducerade pluripotenta stamcellerna och dess potential inom regenerativ medicin i framtiden.

## Inledning

Länge trodde man att en cell som mognat, differentierats och specialiserats hade nått sitt slutstadium. Att cellen skulle kunna bli en stamcell igen ansågs omöjligt. På senare år har forskare kunnat bevisa att det är möjligt att få mogna celler att backa i utvecklingen (Yamanaka *et al* 2006, Takahashi *et al.* 2007, Yu *et al* 2007).

Redan 1962 kunde britten Johan B. Gurdon visa att en somatisk cellkärna har hela sitt genmaterial intakt, vilket innebär att om cellkärnan förs in i en äggcell (vars egen cellkärna tagits ur) så kommer cellen att kunna utvecklas till ett embryo efter *in vitro* befruktning (Gurdon, 1962). Denna upptäckt banade väg för kloning av djur, bland annat fåret Dolly (Wilmut *et al.* 1997). År 2006 visade japanen Shinya Yamanaka, med hjälp av bland annat Gurdons upptäckt tillsammans med sin forskargrupp, att en mogen hudcell från en mus kan omprogrammeras till att bli en omogen pluripotent stamcell, detta genom att bara tillföra cellen fyra nya gener. Cellerna som skapas har då åter egenskapen att ge upphov till många av de olika celltyper som bygger upp en organism. De nya cellerna fick namnet inducerade pluripotenta stamceller (iPSC) (Yamanaka *et al.* 2006). Man har även visat att detta går att göra med humana celler vilket har öppnat upp för möjligheter inom regenerativ medicin (Takahashi *et al.* 2007). I år, 2012, belönades Gurdon och Yamanaka med Nobelpriset i medicin för sina upptäckter.

Yamanakas upptäckt är mycket intressant då den förändrar vår syn på cellbiologi och också skapar nya möjligheter för terapeutisk forskning. Upptäckten kan också komma att leda till att den kontroversiella forskningen på embryonala stamceller kan minska då dessa celler har liknande egenskaper som de embryonala cellerna. Man har förhoppningar om att i framtiden kunna använda dessa för att ersätta sjuka celler och organ i kroppen genom transplantation, så kallad regenerativ medicin, till exempel vid Parkinsons sjukdom, amyotrofisk lateralskleros (ALS) eller diabetes (Wernig *et al.* 2008; Dimos *et al.* 2008; Park *et al.* 2008). Cellerna kan skapas direkt från patientens egna celler och därmed minskar risken för avstötning efter transplantation (Takahashi *et al.* 2007). Det finns dock en mängd hinder som måste

övervinnas innan cellerna kan användas direkt på patienter (Hussein *et al.* 2011; Mayshar *et al.* 2011).

Syftet med denna uppsats är att beskriva hur en mogen cell åter kan bli en pluripotent cell och även vad denna upptäckt kan komma att användas till i framtiden. Mina frågeställningar är således; Hur går det till när man omvandlar en somatisk cell till en inducerad pluripotent stamcell? Inom vilka användningsområden kan dessa celler utnyttjas? Vilka komplikationer kan uppstå kring forskningen? Och mer specifikt; kommer de inducerade pluripotenta stamcellerna kunna användas för regenerativ medicin inom en snar framtid?

Som bakgrund till forskningen om de inducerade pluripotenta stamcellerna kommer jag nedan definiera vad en stamcell är och även översiktligt beskriva hur en cell differentieras. Jag kommer sedan sammanfatta viktiga milstolpar inom forskningen som ledde fram till upptäckten av de inducerade pluripotenta stamcellerna för att sedan beskriva forskningen om dessa celler mer ingående. Avslutningsvis följer en diskussion om de inducerade pluripotenta stamcellernas potential samt en framåtblick med kommande utmaningar och möjligheter.

## **Stamceller**

Stamceller är odifferentierade celler som har förmågor som särskiljer dem från andra celltyper. Dels har de kapacitet att dela sig och bilda dotterceller som också är stamceller, men de kan även bilda celler som börjar dela på sig, differentiera och mogna till alla olika celltyper som bygger upp en organism. Denna egenskap gör dessa celler unika. Under en organisms livstid behöver celler hela tiden ersättas med nya på grund av celldöd eller skada och det är där stamcellerna fyller sin funktion. Det är denna funktion som även är intressant för klinisk användning (Cooper & Hausman, 2009). Stamceller identifierades för första gången av Ernest McCulloch och James Till år 1961. De fann hematopoetiska (blodbildande) stamceller i benmärgen på en mus (Becker *et al.* 1963).

Det finns olika stamceller i kroppen och dessa karaktäriseras av olika potensgrad (totipotenta, pluripotenta, multipotenta). Potensgraden indikerar stamcellens förmåga att differentiera till olika celltyper (Jaenisch & Young 2008). Den befruktade äggcellen är totipotent vilket betyder att den kan bilda alla celler i kroppen samt ge upphov till en ny individ. Ju tidigare i utvecklingen man tar en stamcell, desto större utvecklingspotential har den och den totipotenta stamcellen har alltså högst potential. Det är faktorer i äggets cytoplasma som behåller cellen totipotent (Wolpert *et al.* 2011).

## **Pluripotenta embryonala stamceller**

Embryonala stamceller har länge varit intressanta ur forskningssynpunkt. De har används för att modellera molekylära och cellulära skeden i celldifferentieringsprocessen och har därför varit viktiga för utvecklingsbiologin. Dessa celler återfinns i det tidiga embryots blastocyst fem dagar efter befruktning, med förmågan att ge upphov till många av de celler och vävnader som bygger upp en organism. De kan dock inte bilda de celler som sedan utgör moderkakan och kan därför alltså inte skapa en livsduglig hel organism, vilket gör dem till pluripotenta (Campbell *et al.* 2008). I många länder tillåts inte forskning på embryonala stamceller av etiska skäl. Debatten rör främst frågan om när ett liv egentligen börjar och om detta finns det många skilda åsikter. I Sverige är det tillåtet att forska på embryonala stamceller. De celler som man får använda i medicinsk forskning har tagits i samband med provrörsbefruktning efter medgivande från donatorn. Det är också tillåtet att skapa befruktade äggceller för att framställa embryonala stamceller (Dock *et al.* 2009).

I och med upptäckten av de inducerade pluripotenta stamcellerna kan forskning bedrivas utan detta etiska dilemma på celler med liknande egenskaper som de embryonala stamcellerna därmed ses dessa celler som en potentiell lösning på ett tidigare stort problem inom stamcellsforskningen. Dock kan nya etiska frågor väckas i och med användningen av dessa celler.

### **Multipotenta adulta stamceller**

Det finns även stamceller i den utvecklade vävnaden, adulta stamceller, men dessa kan bara bilda ett begränsat antal olika celltyper och kallas därför multipotenta. Till exempel kan en stamcell från benmärgen ge upphov till alla olika blodceller, men den skulle inte kunna skapa en hel organism. De adulta stamcellerna är ytterst viktiga då de skapar nya celler att ersätta gamla med. Förutom i benmärgen så har man hittat dessa i bland annat huden, hjärnan och levern (Campbell *et al.* 2008).

Stamcellsdefinitionen ifrågasätts hela tiden. Nya upptäckter förändrar en tidigare given definition och denna kan också variera beroende på om vi studerar cellerna *in vivo* eller *in vitro*.

### **Celldifferentiering**

Alla celler förutom könscellerna, erytrocyterna och trombocyterna i en organism innehåller identiskt DNA (Sand *et al.* 2009). Hur kan det då finnas så många olika celltyper? Svaret är att cellerna uttrycker olika gener vid olika tidpunkt vilket avgör deras öde (Cooper & Hausman 2009). Många gener befinner sig i ett inaktivt stadie och behöver speciella transkriptionsfaktorer för att aktiveras. Dessa faktorer binder in till den region som ska läsas av och bildar tillsammans med bland annat RNA polymeras II ett komplex som leder till att transkriptionen kan starta. Vid transkriptionen läses den aktuella genen och bildandet av ett nytt protein kan starta. En differentierad cell karaktäriseras av de olika proteiner den innehåller (Wolpert *et al.* 2011).

I den embryonala utvecklingen spelar äggets cytoplasma stor roll. Denna är inte homogen utan organellerna, mRNA och andra beståndsdelar så som proteiner är ojämnt fördelade (Campbell *et al.* 2008). Efter den mitotiska celldelningen fördelas zygotens cytoplasma i två separata celler vilket leder till att kärnan i dessa celler blir exponerad för olika så kallade cytoplasmiska determinanter. Det är bland annat detta som leder till att cellerna utvecklas till olika celltyper, då de under utvecklingen kommer uttrycka olika gener. När det sedan bildats ett embryo spelar miljön runt i kring de olika cellerna stor roll. Cellerna i embryot kommunicerar med varandra genom specifika signalmolekyler och tillväxtfaktorer, antingen genom direkt kontakt eller genom diffusion. Dessa signaler orsakar en förändring i mottagarcellen vilket leder till ett förändrat genuttryck som i sig leder till en differentierad cell (Campbell *et al.* 2008). Mycket av det som rör celldifferentiering involverar processer som inte rör genuttryck specifikt. Dessa kallas för epigenetiska förändringar och kan till exempel röra DNA-metylering och acetylering/metylering av histonerna (Wolpert *et al.* 2011).

Celldifferentiering är naturligt en irreversibel process. I de fall som cellen slutar behålla den uppgift den blivit tilldelad kan till exempel cancer uppstå. Cancer beror på mutationer i genomet som är av värde för cellcykelns funktion vilket leder till okontrollerad celltillväxt (Cooper & Hausman 2009).

## Tidigare forskning – viktiga framsteg

Historien om de inducerade pluripotenta stamcellerna började för nästan 60 år sedan. Fram till idag har många viktiga framsteg gjorts inom stamcellsforskningen som gjort denna upptäckt möjlig.

### Somatisk kärnöverföring

Tidigare trodde man att differentierade celler förlorade sin förmåga och kunskapen att producera olika celltyper. År 1962 kunde John B. Gurdon och hans kollegor visa att så inte var fallet. De använde sig av icke-fertiliserade ägg från grodor som hade fått en ny kärna från en fullt differentierad tarmcell från ett grodyngel. Denna utvecklades till ett yngel (Gurdon, 1962). Hans upptäckt ledde till hypotesen att det i äggets cytoplasma finns faktorer som på något sätt kan omforma den transplanterade kärnan till att återigen uttrycka gener som kan leda till formationen av en hel frisk groda. Även en differentierad cell innehåller alltså all den genetiska information som behövs för att utveckla en hel organism. Det DNA som finns i kärnan behöver bara aktiveras på rätt sätt. Proceduren fick namnet somatisk kärnöverföring (Gurdon, 1962).

Somatisk kärnöverföring har sedan använts för mer komplexa djur. 1997 lyckades Ian Wilmut och hans kollegor klonas det första däggdjuret, fåret Dolly (Wilmut *et al.* 1997). Möjligheten att klonas genom kärnöverföring tillsammans med de egenskaper som embryonala stamceller har, har öppnat upp möjligheter för det som kallas terapeutisk kloning. Tekniken innebär att man tar ut kärnan från en patients cell och för in denna i ett ägg vars egen kärna har tagits ut. Denna cell kan sedan odlas och embryonala stamceller bildas då cellen man skapar uppfattar sig som ett befruktat ägg. Stamcellerna från klonen som bildas kan sedan användas då de differentierar till nya celler som sedan skulle kunna transplanteras tillbaka till patienten (Cooper & Hausman, 2009). Fördelen med denna metod är att de stamceller som bildas är patientens egna och innehåller patientens DNA, vilket bör undanröja risken för avstötning. Metodens effektivitet är dock låg och inga lyckade försök har ännu gjorts på människor, dessutom är det även ett problem att tekniken kräver många ägg från donatorer. Kritik riktas även mot metoden då den använder embryonala stamceller (Cooper & Hausman, 2009).

### Odling av stamceller i kultur

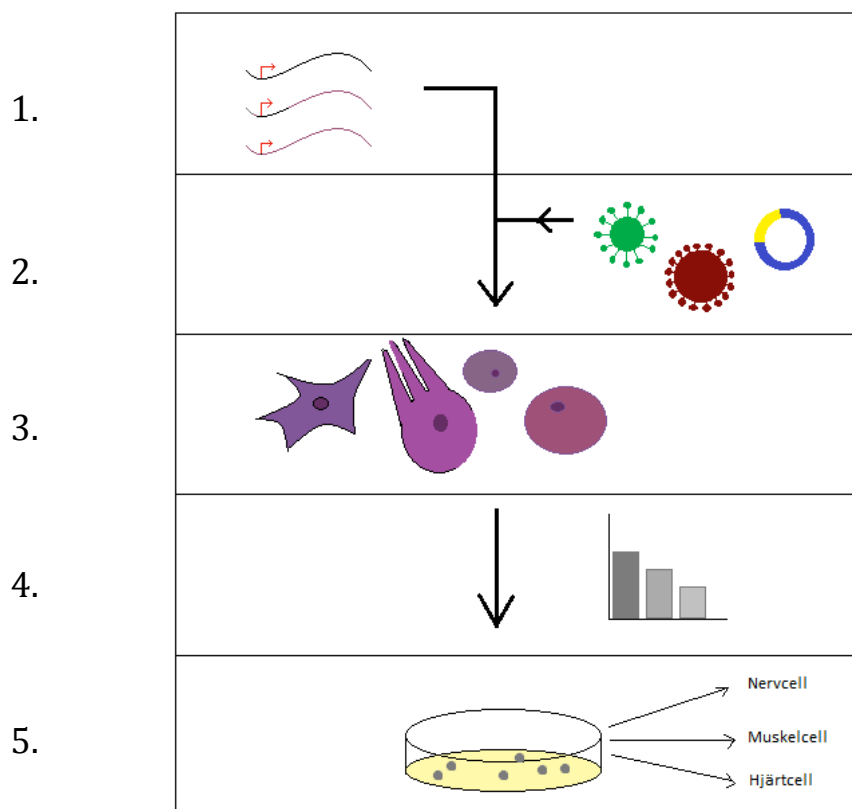
År 1981 kunde Martin Evans och Matthew H. Kaufman visa att embryonala stamceller bildas från celler ur den inre cellmassan hos blastocyster från möss. De upptäckte att dessa celler var pluripotenta och kunde hållas odifferentierade i cellodling samtidigt som de kunde bilda alla organ och vävnader om de återfördes in i ett tidigt musembryo (Evans *et al.* 1981). Även Gail R. Martin genomförde studier med liknande resultat som också har varit betydelsefulla. Hon studerade en tumörliknande struktur hos möss, innehållande odifferentierade celler som liknade embryonala stamceller. Dessa lyckades hon sedan odla fram *in vitro* (Martin, 1981). År 1998 visade James Thomson och hans kollegor att embryonala stamceller även kunde framställas från människor och isoleras i kultur (Thomson *et al.* 1998). Dessa upptäckter har varit av stor betydelse för stamcellsforskningen och den regenerativa medicinen.

### Genen MyoD för omprogrammering

Ytterligare en milstolpe inom cellbiologin som bidrog med kunskap om celldifferentiering och omprogrammering var Harold Weintraub och hans kollegors upptäckt av genen *MyoD*. De tvingade hudceller att uttrycka denna gen vilket ledde till bildandet av muskelceller. Det visade sig att genen är den centrala regleraren av myogenesen, alltså skapandet av muskulär vävnad speciellt under embryonal utveckling (Davis *et al.* 1987; Weintraub *et al.* 1989).

## Inducerade pluripotenta stamceller

Yamanaka och hans kollegor var intresserade av att se om det fanns någon annan metod som också kunde omprogrammera somatiska celler till celler med embryonala stamcellers egenskaper, utan att behöva genomföra en så kallad somatisk kärnöverföring. Deras hypotes var att om man lyckades identifiera de faktorer som bevarar pluripotens hos en stamcell, så skulle man genom att introducera dessa till en somatisk cell, få denna att programmeras om till en stamcell (Yamanaka *et al.* 2006). Nimet Maherali och Konrad Hochedlinger (2008) har sammanfattat olika variabler att ta hänsyn till då man ska framställa inducerade pluripotenta stamceller (figur 1). Dessa inkluderar 1) valet av gener att omprogrammera cellen med; 2) metod att leverera generna in i cellen; 3) val av celltyp att omprogrammera; 4) parametrar av värde för genuttryck såsom timing och koncentrationsnivåer samt cellkulturförhållanden i framställningen; 5) identifiering av inducerade pluripotenta celler och karaktärisering av omprogrammerade celler.



**Figur 1.** Variabler att ta hänsyn till vid framställning av iPSC. Dessa inkluderar 1) valet av gener att omprogrammera cellen med; 2) metod att leverera generna in i cellen; 3) val av celltyp att omprogrammera; 4) parametrar av värde för genuttryck såsom timing och koncentrationsnivåer samt cellkulturförhållanden i framställningen; 5) identifiering av inducerade pluripotenta celler och karaktärisering av omprogrammerade celler. Inspirerad av Maherali & Hochedlinger (2008).

### Ursprunglig metodik för framställning av inducerade pluripotenta stamceller

Yamanaka och hans kollegor använde sig av bindvävceller (hudceller) från adulta möss och 24 gener som möjliga kandidater som kunde inducera pluripotens i hudcellen. Dessa gener, då de uttrycks, sätter igång transkriptionen i cellen och därmed bildandet av särskilda proteiner (transkriptionsfaktorer) som är delaktiga i bevarandet av cellen som blivande pluripotent. Man visste sedan innan att dessa gener uttrycktes i embryonala stamceller. De började med att testa

generna en efter en för att sedan mixa dem i olika kombinationer. Det visade sig att vissa av kombinationerna ledde till bildandet av celler som liknade embryonala stamceller. Frågan är vilken kombination som var den rätta. Och hur många gener, och därmed transkriptionsfaktorer, skulle det behövas totalt? Efter stegvis eliminering kom de fram till det häpnadsväckande resultatet att enbart fyra gener var nödvändiga för omprogrammeringen, nämligen; *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* och *c-Myc* (Yamanaka *et al.* 2006) (se punkt 1 i figur 1). De använde sig av samma slags näringslösning som man normalt låter embryonala stamceller i kultur växa i.

År 2007 kunde liknande celler även skapas från humana hudceller genom att introducera samma fyra faktorer (Takahashi *et al.* 2007) eller genom induktion med en snarlik kombination; *Nanog*, *Lin28*, *Oct4* och *Sox2* (Yu *et al.* 2007). Detta har gett förhoppningar om användning av dessa celler inom regenerativ medicin då genen *c-Myc* är en onkogen (se nedan under Användningsområden för inducerade pluripotenta stamceller).

För att kunna föra in generna i den somatiska cellkärnans genom användes en retroviral vektor (Yamanaka *et al.* 2006) (se punkt 2 i figur 1). Vektorerna är verktyg som kan användas till detta ändamål antingen *in vivo* eller *in vitro*. En grundläggande mekanism hos många virus är att de för in sitt eget genom in i värdcellens som de infekterar och det är denna mekanism man utnyttjar (Campbell *et al.* 2008). I Yamanakas första studie användes det rekombinanta retroviruset moloney murint leukemivirus (MMLV) som integrerar med värdcellen. Det innehåller enzymet reversibelt transkriptas som sköter integrationen. Retroviruset infekterar bara celler som delar på sig. Genom denna metod tvingar man alltså cellen att uttrycka gener som annars är tystade. Då generna uttrycks startar omprogrammeringen och efter en tid bildas de stamcellsliknande cellerna på grund av bildandet av nya proteiner. Dessa celler visade sig sedan ge upphov till de tre cellagerna endoderm, mesoderm och ectoderm *in vitro* (Yamanaka *et al.* 2006).

Gällande valet av celltyp (punkt 3 i figur 1) så har detta visat sig ha betydelse för omprogrammeringens effektivitet. Till exempel så visade det sig vara så att mag- och leverceller från möss snabbare visade reaktivering av genen *Fbx15* som är specifik för embryonala stamceller, jämfört med fibroblaster (Aoi *et al.* 2008). Även de humana keratinocyterna omprogrammerades snabbare jämfört med humana fibroblaster (Aasen *et al.* 2008). Resultaten indikerar att en mängd olika celltyper kan genomgå omprogrammering *in vitro* (tabell 1), och därmed bli pluripotenta stamceller, oavsett hur differentierade cellerna är (Stadtfeld *et al.* 2008a).

**Tabell 1.** Urval av celler som genomgått lyckad omprogrammering

| <b>Omprogrammerad celltyp</b>  | <b>Referens</b>               |
|--------------------------------|-------------------------------|
| Mag- och leverceller           | Aoi <i>et al.</i> 2008        |
| Insulinproducerande betaceller | Stadtfeld <i>et al.</i> 2008a |
| Lymfocyter                     | Hanna <i>et al.</i> 2008      |
| Keratinocyter                  | Aasen <i>et al.</i> 2008      |
| Hudceller                      | Yamanaka <i>et al.</i> 2006   |
| Blodceller                     | Loh <i>et al.</i> 2009        |

De exakta förhållanden gällande bland annat koncentrationsnivåer av transkriptionsfaktorer och cellkulturförhållanden som krävs för omprogrammeringen av olika celltyper är än inte fastslagna. Ny forskning visar hela tiden på alternativa metoder och detta speglar att forskningsområdet är ungt och ständigt i utveckling (Maherali & Hochedlinger 2008).

### **Identifiering och karaktärisering av inducerade pluripotenta stamceller**

De inducerade pluripotenta stamcellerna måste uppvisa karaktärsdrag som annars är utmärkande för embryonala stamceller, detta för att visa att omprogrammeringen gått rätt till. Dessa inkluderar morfologiska, molekylära och funktionella likheter med embryonala stamceller (Maherali & Hochedlinger 2008). De första inducerade pluripotenta stamcellerna från möss var selekterade med avseende på den embryonala stamcellsspecifika genen *Fbx15* (Yamanaka *et al.* 2006). Denna visade sig dock vara icke essentiell för omprogrammeringen och istället började man selektera cellerna efter uttryck av generna *Nanog* och *Oct4* (Okita *et al.* 2007).

De inducerade pluripotenta stamcellerna ska uttrycka pluripotentrelaterade markörer på cellytan och dessa söker man efter då man vill identifiera dem. Den epigenetiska statusen såsom metylering och kromatinkonfiguration måste även den vara gemensam med de embryonala stamcellerna. Gällande funktionella likheter så ska en godkänd iPS-cell ha förmågan till självförnyelse och även behålla utvecklingspotentialen att differentiera till alla de tre primära cellager, alltså endoderm, ectoderm och mesoderm (Lanza *et al.* 2009).

### **Alternativa metoder för omprogrammering**

Till skillnad från Yamanaka och hans kollegor använde sig Junying Yu och hennes forskargrupp av lentivirus för att infektera celler med de nödvändiga faktorerna (Yu *et al.* 2007). Lentivirus är en undergrupp till retrovirus och har den unika förmågan att infektera ett värdgenom hos en cell som inte delar på sig tack vare enzymet integras. Vektoren hos dessa olika virus kan dock aktivera onkogener i värdgenomet vilket kan leda till utvecklingen av cancer (Läs mer om detta under Komplikationer).

#### *Proteiner, adenovirus, plasmider med mer*

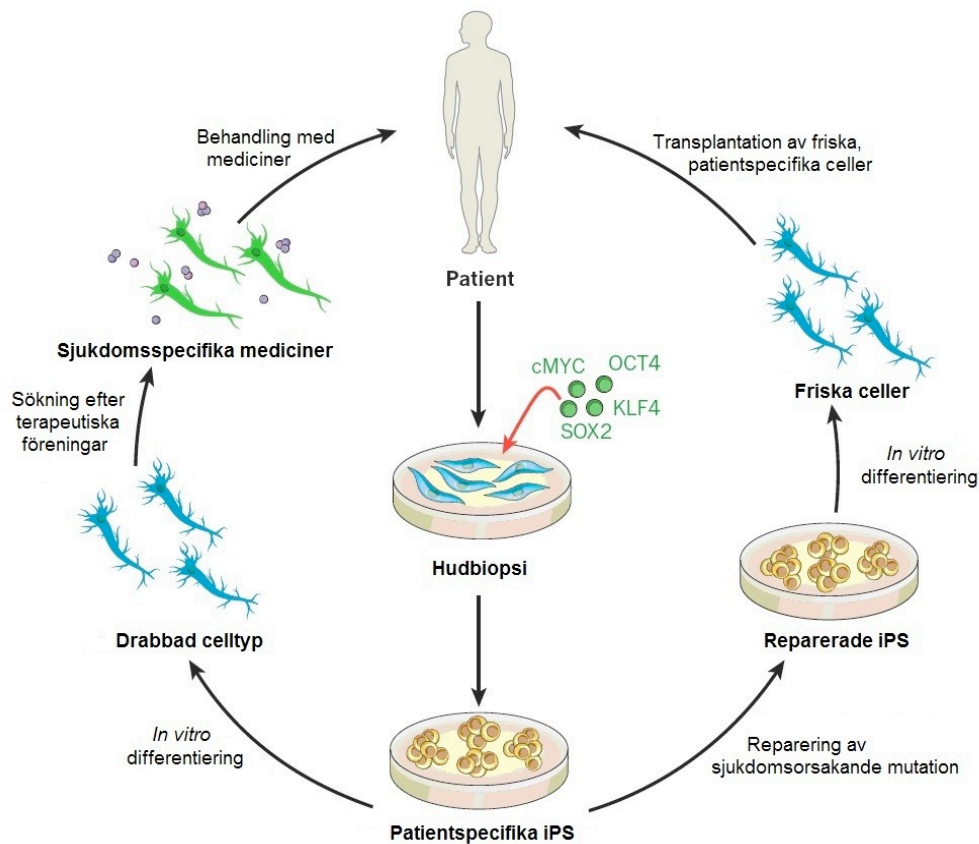
Senare forskning har även visat att de gener som behövs för omprogrammeringen inte behöver föras in på specifika platser i genomet vilket öppnar upp för alternativa sätt som inte kräver retrovirala vektorer. Detta minskar risken för tumörbildning hos patienter efter transplantation (Aoi *et al.* 2008). Kim *et al.* (2009) visade genom sin studie att det var möjligt att skapa inducerade pluripotenta stamceller med hjälp av att direkt leverera omprogrammeringsproteiner fuserade med en cellpenetreringspeptid. Denna metod var dock ineffektiv. Andra icke-integrerande vektorer som använts och lett till lyckad omprogrammering är bland annat adenovirus (Stadtfeld *et al.* 2008b) och plasmider (Okita *et al.* 2008) men även dessa med minskad effektivitet. Studier visar även att omprogrammeringen kan genomföras med hjälp av syntetiserade mRNAs (Warren *et al.* 2010). Dessa upptäckter har gett förhoppningar om att cellerna ska kunna användas inom regenerativ medicin.

### **Användningsområden för inducerade pluripotenta stamceller**

Forskningen som rör användningen av stamceller för att på olika sätt bota sjukdomar och läka skador kallas terapeutisk stamcellsforskning. Den terapeutiska forskningen med inducerade pluripotenta stamceller har huvudsakligen tagit två riktningar (figur 2). Den ena riktningen rör transplantation av differentierade celler (regenerativ medicin) och den andra rör



sjukdomsmodellering och framställning av läkemedel med hjälp av studier på cellerna *in vitro* (Park *et al.* 2008).



**Figur 2.** Den terapeutiska forskningen med de inducerade pluripotenta stamceller har huvudsakligen tagit två riktningar. De inducerade pluripotenta stamcellerna kan skapas från patientens egna celler (hudbiopsi) för att sedan antingen repareras (om sjukdomen beror på en mutation i genomet) och differentieras till önskad frisk celltyp för transplantation, eller så kan man låta de inducerade pluripotenta stamcellerna få agera modell för olika sjukdomar man sedan även kan söka läkemedel till. I exemplet ovan lider patienten av en neurodegenerativ sjukdom (Figur modifierad från Robinton & Daley 2012).

Nyligen kunde en forskargrupp visa att det var möjligt att skapa levande avkomma med hjälp av inducerade pluripotenta stamceller. De använde sig av hudceller från en mus, omprogrammerade dessa till pluripotenta stamceller som sedan differentierade till äggceller. Dessa befruktades *in vitro* och kunde sedan utvecklas till levande möss *in vivo* (Hayashi *et al.* 2012). Denna upptäckt visar på dessa cellers potential.

### Sjukdomsmodeller och läkemedelstillverkning

Redan nu använder man de inducerade pluripotenta stamcellerna *in vitro* för att studera cellulära mekanismer. Hittills har man kunnat skapa inducerade pluripotenta stamcells-linjer från patienter med antingen monogenetiska eller multigenetiska sjukdomar (Lanza *et al.* 2009). Studier på cellerna *in vitro* kan ge oss många förklaringar till var i cellen det blir fel och därmed också ovärderlig kunskap om en sjukdoms utveckling. Det har bland annat gjorts studier på celler från patienter med sjukdomar så som immunbristsjukdomar, Parkinsons sjukdom, typ 1 diabetes, Huntingtons sjukdom, Down syndrom med mera (Park *et al.* 2008). Det skulle även kunna vara möjligt att utveckla nya läkemedel med hjälp av de inducerade pluripotenta stamcellerna (Park *et al.* 2008).

### *Växthormon premierar differentiering av nya nervceller*

Ett bra exempel på detta är att man, med hjälp av *in vitro* studier på inducerade pluripotenta stamceller, funnit ett sätt att modellera sjukdomen Riley-Day (familjär dysautonomi) (Lee et al. 2009). Denna ovanliga genetiska sjukdom beror på en punktmutation i genen *IKBKAP* som uppstår på grund av onaturlig mRNA splicing och avsaknad av exon 20 på kromosom nummer 9. Mutationen leder till defekta nervceller. Gabsang Lee (2009) och hans kollegor kunde visa att växthormonet kinetin reducerade felet och premierade differentiering av nya nervceller.

### *Modellering av sjukdomen amyotrofisk lateralskleros (ALS)*

Sjukdomen amyotrofisk lateralskleros (ALS) tros bero på en komplex interaktion mellan genetiska faktorer och yttre påverkan. Många frågor är obesvarade på grund av att man inte lyckats hitta något bra sätt att studera sjukdomen på. I en uppmärksam studie har dock forskare lyckats generera inducerade pluripotenta stamceller från en äldre kvinna med ALS. Efter omprogrammeringen fick de dessa celler att differentiera till motorneuroner, den typ av celler som bryts ner vid sjukdomen (Dimos et al. 2008). Denna upptäckt öppnar upp för möjligheten att studera motorneuroner genererade från en patient med ALS vilket kan leda till svar på frågor om cellernas överlevnadsegenskaper, interaktioner med andra celltyper och deras känslighet för yttre faktorer som troligtvis spelar stor roll för utveckling av ALS (Dimos et al. 2008).

Tack vare möjligheten att använda cellerna som modeller för sjukdomar kan alltså frågor som både rör molekylära men även cellulära mekanismer bli besvarade. Detta kan i sin tur leda till att cellerna kan komma att användas för transplantation i framtiden, något som kallas regenerativ medicin.

### **Regenerativ medicin**

En stor fördel med de inducerade pluripotenta stamcellerna är att de kan framställas av patientens egna celler (Takahashi et al. 2007). I idealfallet skulle alltså celler till exempel kunna tas från en patient med en nervsjukdom, omprogrammeras till inducerade pluripotenta stamceller för att sedan differentiera till friska nervceller som genom autolog transplantation (transplantation av patientens egna celler) *in vivo* skulle skapa möjlighet att bota nervsjukdomen hos patienten i fråga.

Nedan tas några studier upp som har fått stort genomslag och som gett förhoppningar om att cellerna kan komma att användas inom regenerativ medicin som behandlingsmetod av många sjukdomar i framtiden. I tabell 2 ges en översikt över olika celltyper som blivit differentierade från inducerade pluripotenta stamceller.

Tabell 2. Urval av celltyper som blivit differentierade från iPSC

| <b>Celltyp som blivit differentierad från iPSC</b> | <b>Referens</b>      |
|--|----------------------|
| Hjärtmuskelceller                                  | Mauritz et al. 2008  |
| Leverceller  | Song et al. 2009     |
| Blodstamceller                                     | Hanna et al. 2007    |
| Nervceller   | Dimos et al. 2008    |
| Näthinneceller                                     | Buchholz et al. 2009 |

### *Sicklecellanemi*

Sicklecellanemi är en sjukdom där kroppen producerar felaktigt formade erythrocyter (röda blodkroppar) som leder till förändrat blodflöde och på sikt även till blodbrist. Sjukdomen uppstår som ett resultat av en punktmutation i kodon 6 i  $\beta$ -globin genen (av värde för hemoglobin) vilket ger aminosyrasubstitution från glutamin till valin (Overgaard & Ljung, 2012). Hanna *et al.* (2007) kunde i sin studie visa att fenotypen reducerades med hjälp av de inducerade pluripotenta stamcellerna. Forskarna omprogrammerade hudceller från sjuka möss med hjälp av retrovirus och generna *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* och *c-Myc* på samma sätt som den ursprungliga metodiken (Yamanaka *et al.* 2006). De reparerade sedan den genetiska defekt i cellerna som gav upphov till sicklecellanemi hos mössen, detta genom homolog rekombination (information mellan två homologa DNA-molekyler utbyts). Differentiering av de reparerade cellerna *in vitro* kunde sedan ge upphov till fungerande hematopoetiska stamceller (blodstamceller) som sedan kunde transplanteras tillbaka till mössen. Dessa visade sig sedan kunna differentiera till normalt fungerande röda blodkroppar, och på så sätt övervanns sjukdomen (Hanna *et al.* 2007). Studien visar på möjligheten att kunna använda de inducerade pluripotenta stamcellerna i cellterapi.

### *Parkinsons sjukdom*

I en annan studie visade forskarna att inducerade pluripotenta stamceller kan differentieras till funktionella neuroner (nervceller) *in vitro*. Efter transplantation av dessa celler in i en hjärna hos ett musfoster vandrade cellerna till olika regioner i hjärnan där de sedan differentierade till nerv- och gliaceller. Forskarna kunde bevisa att dessa celler blivit synaptiskt integrerade med fungerande aktionspotentialer i mushjärnan (Wernig *et al.* 2008). I samma studie frågade sig forskarna om iPSC-celler kunde återställa funktionen i hjärnan efter förlorade dopaminproducerande neuroner, ett problem som uppstår vid Parkinsons sjukdom. Med hjälp av ett försök på råttor kunde de visa att det var möjligt. De framkallade en analog modell av Parkinsons sjukdom hos råttorna genom att slå ut de nervceller som producerar dopamin och transplanterade sedan tillbaka dopaminproducerande nervceller som skapats från inducerade pluripotenta stamceller. Även dessa blev funktionellt integrerade i hjärnan och därmed visar denna studie en lyckad djurmodell för Parkinsons sjukdom (Wernig *et al.* 2008).

### *iPSC skapade bukspottskörtel hos mus*

En annan upptäckt som visar på möjligheterna hos dessa celler rapporterades år 2010 då en forskargrupp lyckades skapa en fungerande bukspottskörtel i en mus med hjälp av bland annat inducerade pluripotenta stamceller. De introducerade celler omprogrammerade från en råtta till ett musembryo och kunde visa att dessa celler sedan byggde upp organet (Kobayashi *et al.* 2010).

### *iPSC från urin*

I en nyligen publicerad studie visade forskare på ett enkelt och effektivt sätt att ta celler från en patient för omprogrammering. De lyckades skapa humana inducerade pluripotenta stamceller från epitelceller extraherade från urin. Förutom enkelheten och effektiviteten är metoden även kostnadseffektiv och universell, den kan användas oberoende patientens ålder eller kön (Zhou *et al.* 2012).

## Komplikationer

Det finns tyvärr många risker vid framställningen av inducerade pluripotenta stamceller som i dagsläget hindrar användningen av dessa celler inom regenerativ medicin på människor.

### Stor risk för tumörbildning och cancer

Först och främst så är det svårt att helt och hållet veta om varje inducerad pluripotent stamcell som skapats har genomgått full omprogrammering. Onormal omprogrammering kan leda till bildandet av teratom, en inkapslad tumör innehållande olika cellinjer, som ökar risken för cancer. Celler som kan komma att användas i framtida behandlingar måste även vara fullt mogna, helt fria från inblandning av omogna inducerade pluripotenta ursprungsceller vilka även de kan leda till tumörbildning (Wernig *et al.* 2008). Det är troligtvis många slumpmässiga förlopp som äger rum under omprogrammeringen och som krävs för att den ska genomföras till fullo. Dessa skeenden har man inte fullt förstått än vilket också kan ses som ett problem (Hanna *et al.* 2009; Yamanaka 2009).

Genen *c-Myc* som Yamanaka introducerade var som sagt en onkogen. Denna gen bär på förmågan att ge upphov till tumörer efter transplantation, vilket den också gjorde i många av mössen som studerades (Yamanaka *et al.* 2006). Det har dock visat sig att man kan utesluta denna gen, dock med förlorad effektivitet, och istället använda sig av en annan kombination gener för att inducera pluripotens (Yu *et al.* 2007). Ytterligare ett problem med den ursprungliga metoden är som sagt användandet av retrovirala vektorer så som retrovirus. Dessa kan ge upphov till mutationer i det genom som infekteras på grund av att virusen integrerar generna på slumpmässiga platser i värdgenomet. Kvarstående viral uttryckning är också ett problem. Följden kan också här vara utveckling av cancer (Yamanaka *et al.* 2006). Man har dock lyckats hitta alternativa vägar med bland annat proteiner för att undvika detta problem, men då med minskad effektivitet (Hayashi *et al.* 2012).

### Ineffektiv metod för framställning av iPSC

Omprogrammeringen som Yamanaka och hans kollegor lyckades med är ineffektiv. Enbart 0,1-1 % av alla de hudceller från möss som Yamanaka använde blev inducerade pluripotenta stamceller. Detta kan bero på att de uttryckte en för låg halt av generna (Yamanaka *et al.* 2006) men även att omprogrammering hos en differentierad cell är en onaturlig process och något som cellen har ett inbyggt försvar mot (Cooper & Hausman 2009). Att omprogrammera cellerna tog dem ca 3-4 veckor. Att sedan få dem att tillväxa tog ytterligare en månad och att därefter få dem att differentiera tog även det ca en månad. Processen är alltså relativt långsam vilket kan ses som en nackdel (Yamanaka *et al.* 2006). Ineffektiviteten hos metoden gäller generellt för många studier.

### Nya studier bekräftar farorna

Flera efterföljande studier bekräftar bilden av att mycket forskning återstår innan cellerna kan användas inom regenerativ medicin. Hussien *et al.* (2011) visade i sin studie att omprogrammeringsprocessen är associerad med många mutationer i genomet. En liknade studie visade på att många punktmutationer uppstår under omprogrammeringen och dessa forskare förespråkar sekvensering av de inducerade pluripotenta stamcellernas genom som standardrutin efter omprogrammering (Gore *et al.* 2011). En annan studie visar på stor risk för kromosomduplikation hos studerade humana inducerade pluripotenta stamceller vilket kan leda till en signifikant ökning av cellcykelrelaterade gener. Detta ökar risken för cancer (Mayshar *et al.* 2010). Andra studier har dock visat att många av de genetiska förändringar som hittats i de inducerade pluripotenta stamcellerna redan kan ha existerat i den ursprungliga

somatiska cellen. Förändringarna kan då alltså ha uppstått oberoende av omprogrammeringsprocessen i sig (Cheng *et al.* 2012; Young *et al.* 2012).

### **Immunrespons hos mus vid syngenisk transplantation**

Trots att cellerna kan göras om från patienter direkt, vilket borde minska risken för avstötning efter transplantation, har studier på möss visat att onormalt genuttryck i vissa celler som differentierats från inducerade pluripotenta stamceller kan leda till T-cellsberoende immun respons (bildandet av antikroppar) hos mottagaren. Mössen i studien stötte ifrån sig de celler som de fått genom syngenisk transplantation, alltså från en individ med samma DNA (Zhao *et al.* 2011).

Ytterligare en risk som kan finnas vid transplantation av inducerade pluripotenta stamceller är att de okända genetiska faktorer och övriga anledningar som orsakade en patients sjukdom (vid till exempel en neurodegenerativ sjukdom) också skulle kunna leda till nedbrytning av de omprogrammerade och transplanterade cellerna. Det är dock för tidigt att kunna säga något definitivt gällande detta (Wernig *et al.* 2008).

## **Diskussion**

Syftet med denna uppsats var att beskriva forskningen kring de inducerade pluripotenta stamcellerna och deras potential för regenerativ medicin. Genom att tvinga även den mest differentierade cell att uttrycka gener som annars uttrycks unikt hos en embryonal stamcell kan de inducerade pluripotenta stamcellerna skapas (Yamanaka *et al.* 2006). Från dessa celler, som kan tas direkt från en patient, kan en mängd olika önskade celltyper skapas (Hanna *et al.* 2007; Dimos *et al.* 2008; Buchholz *et al.* 2009). Detta har skapat förhoppningar om att kunna använda cellerna inom regenerativ medicin. I dagsläget kan dock inte cellerna användas för transplantation på patienter då risken för tumörbildning är hög (Yamanaka *et al.* 2006; Mayshar *et al.* 2010). Mycket tyder dock på att cellerna inom en snar framtid kan användas för autolog transplantation. Dock återstår det fördjupad forskning på området för att helt och hållet garantera patientens säkerhet.

### **Utvecklingsmöjligheter**

Mycket forskning talar för att de inducerade pluripotenta stamcellerna kommer kunna bota många sjukdomar i framtiden, medan annan forskning ställer sig kritisk till om de någonsin kommer kunna användas till transplantation på patienter på grund av alla komplikationer som kan uppstå. Största faran som hindrar användning av dessa celler inom regenerativ medicin idag är alltså risken för tumörbildning. Även ineffektiviteten och de slumpmässiga förlopp man inte har inblick i än under omprogrammeringen, är ett problem. För att kunna använda metoden på patienter bör man säkerställa att den är ofarlig. Man bör även optimera introduktionen av omprogrammeringsfaktorerna in i den somatiska cellen och därmed förbättra omprogrammeringens effektivitet. Med bättre förståelse för omprogrammeringsprocessen kan vi öka sannolikheten att hitta alternativa metoder som på sikt kan leda till att humana inducerade pluripotenta stamceller kan användas på ett säkert sätt för cellterapi i framtiden. Man är på god väg. Redan nu finns metoder för omprogrammering som inte kräver retrovirala vektorer, dock med förlorad effektivitet (Kim *et al.* 2009; Stadtfeld *et al.* 2008b; Okita *et al.* 2008). Det är även av största värde att ta reda på mer om immunresponsen som kan uppstå hos patienten efter autolog transplantation av inducerade pluripotenta stamceller (Zhao *et al.* 2011). Detta område är hittills relativt outforskat.

I studien där forskarna lyckades bota sickelcellanemi hos möss användes retrovirus och onkogenen *c-Myc*. Det skulle inte vara tillåtet att använda på patienter på grund av cancerrisken. Studien visar ändå på dessa cellers enorma potential. Forskarna kunde i denna studie reparera den genetiska defekt som gav upphov till sjukdomen med hjälp av homolog rekombination tack vare att mutationen var känd (Hanna *et al.* 2007). Med framgångar inom denna teknik, att reparera genetiska defekter i cellernas genom innan de differentieras till önskad celltyp, kan vi nå närmare användning av cellerna för transplantation.

I dagsläget är hematopoetisk stamcellstransplantation det enda riktiga framgångsrika exemplet på kliniskt tillämpad stamcellsterapi. Det används bland annat för att bota olika sorters cancer (Cooper & Hausman 2009). Transplantationen är mycket riskfull men patienterna som genomgår behandlingen lider av dödliga sjukdomar och då kan det vara värt att ta risken att genomföra en svår operation som ett sista hopp, frågan är hur stora risker vi vågar ta. För att det i framtiden ska vara möjligt att transplantera de inducerade pluripotenta stamcellerna bör även många framsteg göras inom tekniken för transplantationer i allmänhet. Man bör även utveckla tekniken för odling av cellerna *in vitro* innan transplantation. Vilka cellkulturförhållanden är ultimata för att få cellerna att efter omprogrammering differentiera längs med rätt och önskad väg?

### **Embryonala stamceller som idealet**

De embryonala stamcellerna står som idealet för de inducerade pluripotenta stamcellerna att sträva efter. Det var inte så länge sedan som man började med kliniska försök med embryonala stamceller för transplantation (Keirstead *et al.* 2005), så att förvänta sig att de inducerade pluripotenta stamcellerna kan komma att användas på patienter inom en snar framtid kan låta orimligt, men inte omöjligt. En fråga väcks; kommer vi att behöva fortsätta med forskning på embryonala stamceller eller kan vi förlita oss på de inducerade pluripotenta stamcellerna för transplantation i fortsättningen? I dagsläget är som sagt komplikationerna som rör forskning på iPSC många. Även om de har liknande egenskaper som de embryonala stamcellerna så är de inte identiska. Men den embryonala stamcellen är inte längre unik i egenskapen att kunna differentiera till olika celltyper. Den forskning som kommer bedrivas på den ena celltypen tror jag kan komma att berika forskningen på den andra och vice versa. På sikt kanske den kontroversiella forskningen på embryonala stamceller kan minska tack vare de inducerade pluripotenta stamcellerna.

### **Verktyg för sjukdomsmodellering**

Idag har mest framgångar gjorts inom sjukdomsmodellering och läkemedelstillverkning med hjälp av de inducerade pluripotenta stamcellerna och detta är oerhört betydelsefullt (Park *et al.* 2008). Det har till exempel tidigare varit svårt att ta reda på orsakerna till ALS men i och med de inducerade pluripotenta stamcellerna finns nu en möjlighet att modellera denna sjukdom och söka svar på tidigare obesvarade frågor både på molekylär men även cellulär nivå (Dimos *et al.* 2008). En mängd andra sjukdomar studeras och nya studier avlöser hela tiden varandra. Detta område inom stamcellsforskningen expanderar snabbt just nu.

### **Etiska aspekter**

De inducerade pluripotenta stamcellerna har fått mycket uppmärksamhet då de kan komma att lösa det etiska dilemmat med användningen av embryonala stamceller. Dock tror jag att de inducerade pluripotenta stamcellerna kan komma att användas i syften som inte är etiskt försvarbara. Frågan som tidigare satt käppar i hjulet för forskning på embryonala stamceller rör när ett liv egentligen börjar. Nu flyttas snarare frågan till hur långt vi är villiga att gå för att få alla våra frågor besvarade. De inducerade pluripotenta stamcellerna kan göras om från

hudceller och kan alltså skapas relativt enkelt från olika arter. Det är inte en orimlighet att vi snart kan komma att ha cellbanker med inducerade pluripotenta stamceller som framställts från levande donatorer. Vilka rättigheter bör donatorerna ha? Bör de informeras om man finner att de har anlag för vissa sjukdomar då man studerar deras DNA? Problematiken med kloning? Då detta område är nytt är det svårt att förutspå hur cellerna kommer att användas. Jag tror oavsett att det kommer att krävas en etisk debatt kring de inducerade pluripotenta stamcellerna. Även om cellerna kommer att lösa vissa etiska problem kommer de säkerligen att skapa nya dilemman.

### **Framåtblick**

Trots att Yamanakas upptäckt är relativt ny har den redan fått stort genomslag och kan ses som ett av de stora genombrotten inom stamcells forskning i modern tid. Det är inte för inte som han tilldelades Nobelpriset i medicin trots att forskningen om de inducerade pluripotenta stamcellerna är ung.

Efter upptäckten av de inducerade pluripotenta stamcellerna har mycket forskning gjorts på området och processen har utvecklats, förbättrats, uppgraderats och alternativa vägar har hittats. Ett område som uppkommit och vuxit tack vare upptäckten är så kallad direkt transdifferentiering. Denna metod bygger på att man omprogrammerar en somatisk cell till att bli en annan celltyp, detta utan att gå vägen via stamcellen. I en studie lyckades forskarna omprogrammera celler från bukspottskörtelns exokrina del till betaliknande-celler (de celler som producerar hormonet insulin) *in vivo* på en mus (Zhou *et al.* 2008). I en annan uppmärksam studier lyckades forskarna omprogrammera hjärthudceller till hjärtmuskelceller *in vivo* på en mus (Qian *et al.* 2012). Troligtvis är detta ett område som kommer utforskas parallellt med de inducerade pluripotenta stamcellerna och få stor betydelse i framtiden. Transdifferentiering skulle kunna lösa en del problem som de inducerade pluripotenta stamcellerna står inför, men forskningen är ny så det är för tidigt att säga något definitivt. Framtiden får utvisa vilken av grenarna som kommer få mest betydelse för regenerativ medicin. En ny generation av omprogrammering har dock väckts som kan göra transplantationsfri cellterapi möjlig.

Utmaningen för framtiden är att skapa en säkrare och effektivare metod vid framställningen av de inducerade pluripotenta stamcellerna. Det kan ta tid. Mycket forskning återstår för att kunna fastställa om cellerna kommer kunna leva upp till de förväntningar som många forskare tillskriver dem. Jag tror ändå det finns anledning att se hoppfullt på framtiden. De inducerade pluripotenta stamcellerna har förändrat vårt sätt att se på hur celldifferentiering går till och de har gett förhoppningar om att bota många sjukdomar. Dessa cellers egenskaper tror jag kommer få stor betydelse för regenerativ medicin och därmed för många människor världen över. Den största utmaningen är löst; att få en mogen cell att backa i utvecklingen. Jag följer med spänning detta område som på kort tid har förändrat stamcells forskningen och som på lång sikt kanske kan rädda många liv.

### **Tack**

Jag vill rikta ett stort tack till mina medstudenter Linnea Blomberg och Lars Nordling för värdefulla kommentarer på uppsatsen under arbetets gång. Jag vill även tacka min handledare Jan Andersson för förslag på förbättringar och kloka råd samt kursansvarige Jan Örberg för stöd och uppmuntran.

## Referenser

- Aasen T, Raya A, Barreo MJ, Garetta E, Consiglio A, Gonzalez F, Vassena R, Bilic J, Pekarik V, Tiscornia G, Edel M, Boué S, Belmonte JCI. 2008. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nature biotechnology* **26**: 1276-1284
- Aoi T, Yae K, Nakagawa M, Ichisaka T, Okita K, Takahashi K, Chiba T, Yamanaka S. 2008. Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science* **321**: 699-702
- Becker AJ, McCulloch EA, Till JE. 1963. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* **197**: 452-254
- Buchholz DE, Hikita ST, Rowland TJ. 2009. Derivation of functional retinal pigmented epithelium from induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*. **27**: 2427-2434
- Campbell NA, Reece JB, Urry LA, Cain ML, Wasserman SA, Minorsky PV, Jackson RB. 2008. *Biology*. 8:e uppl. Benjamin Cummings, San Francisco
- Cheng et al. 2012. Low incidence of DNA sequence variation in human induced pluripotent stem cells generated by nonintegrating plasmid expression. *Cell Stem Cell* **10**: 337-344
- Cooper GM, Hausman RE. 2009. *The cell: a molecular approach*. 5:e uppl. ASM Press, Washington DC
- Davis RL, Weintraub H, Lassar AB. 1987. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblast to myoblasts. *Cell* **51**: 987-1000
- Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, Weisenthal LM, Mitsumoto H, Chung W, Croft GF, Saphiner G, Leibel R, Golland R, Wichterle H, Henderson CE, Eggan K. 2008. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* **321**: 1218-1221
- Dock AM, Björck I, Tillhammar P, Barkeman E. 2009. Vad säger lagen om forskning med stamceller?  
<http://www.forskning.se/nyheterfakta/teman/stamceller/tiofragorochsvar/vadsagerlagenomforskningmedstamceller.5.65328cea1221364f9da8000203.html>. Hämtad 2012-12-05
- Evans MJ, Kaufman MH. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**: 154-156
- Gore A, Li Z, Fung HL, Young JE, Agarwal S, Antosiewicz-Bourget J, Canto I, Giorgetti A, Israel MA, Kiskinis E, Lee JH, Loh YH, Manos PD, Montserrat N, Panopoulos AD, Ruiz S, Wilbert ML, Yu J, Kirkness EF, Belmonte JCI, Rossi DJ, Thomson JA, Eggan K, Daley GQ, Goldstein LSB, Zhang K. 2011. Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. *Nature* **471**: 63-67
- Gurdon JB. 1962. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *Journal of embryology and experimental morphology* **10**: 622-640
- Hanna J, Markoulaki S, Schorderet P, Carey BW, Beard C, Wernig M, Creighton MP, Steine EJ, Cassady JP, Foreman R, Lengner CJ, Dausman JA, Jaenisch R. 2008. Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. *Cell* **133**: 250-264
- Hanna J, Saha K, Pando B, van Zon J, Lengner CJ, Creighton MP, van Oudenaarden A, Jaenisch R. 2009. Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration. *Nature* **462**: 595-601
- 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
- Hayashi K, Ogushi S, Kurimoto K, Shimamoto S, Ohta H, Saitou M. 2012. Offspring from oocytes derived from in vitro primordial germ cell-like cells in mice. *Science* **338**: 971-975



- Hussien SM, Batada NN, Vuoristo S, Ching RW, Autio R, Närvä E, Ng S, Sourour M, Hämäläinen R, Olsson C, Lundin K, Mikkola M, Trokovic R, Peitz M, Brüstle O, Bazett-Jones DP, Alitalo K, Lahesmaa R, Nagy A, Otonkoski T. 2011. Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency. *Nature* **471**: 58-62
- Jaenish R, Young R. 2008. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell* **132**: 567-582
- Keirstead HS, Nistor G, Bernal G, Totoiu M, Cloutier F, Sharp K, Steward O. 2005. Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury. *The Journal of Neuroscience* **25**: 4694-4705
- Kim D, Kim CH, Moon JI, Chung YG, Chang MY, Han BSH, 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
- Kobayashi T, Yamaguchi T, Hamanaka S, Kato-Itoh M, Yamazaki Y, Ibata M, Sato H, Lee YS, Usi J, Knisely AS, Hirabayashi M, Nakauchi H. 2010. Generation of rat pancreas in mouse by interspecific blastocyst injection of pluripotent stem cells. *Cell* **142**: 787-799
- Lanza R, Gearhart J, Hogan B, Melton D, Pedersen R, Thomas ED, Thomson J, Wilmot I. 2009. *Essentials of stem cell biology*. 2:e uppl. Elsevier, London
- Lee G, Papapetrou EP, Kim H, Chambers SM, Tomishima MJ, Fasano CA, Ganat YM, Menon J, Shimizu F, Viale A, Tabar V, Sadelain M, Studer L. 2009. Modeling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient specific iPSCs. *Nature* **461**: 402-406
- Loh YH, Agarwal S, Park IH, Urbach A, Hou H, Heffner GC, Kim K, Miller JD, Ng K, Daley GQ. 2009. Generation of induced pluripotent stem cells from human blood. *Blood* **113**: 5476-5479
- Maherali N, Hochedlinger K. 2008. Guidelines and techniques for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* **3**: 595-605
- Martin GR. 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cell. *Proceedings of the national academy of science of the United States of America* **78**: 7634-7638
- Mauritz C, Schwanke K, Reppel M, Neef S, Katsirntaki K, Maier LS, Nguemo F, Menke S, Hausteiner M, Hescheler J, Hasenfuss G, Martin U. 2008. Generation of functional murine cardiac myocytes from induced pluripotent stem cells. *Circulation* **118**: 507-517
- Mayshar Y, Ben-David U, Lavon N, Biancotti JC, Yakir B, Clark AT, Plath K, Lowry WE, Benvenisty N. 2010. Identification and classification of chromosomal aberrations in human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* **7**: 521-531
- Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. 2007. Generation of germline-component induced pluripotent stem cells. *Nature* **448**: 313-317
- Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, Yamanaka S. 2008. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* **322**: 949-953
- Oveergard U, Ljung R. 2012. *Konstitutionella anemier*. I: Gahrton G, Juliusson G (red.). *Blodets sjukdomar. Lärobok i hematologi*, ss. 247. Studentlitteratur, Lund
- Park IH, Arora N, Huo H, Maherali N, Ahfeldt T, Shimamura A, Lensch MW, Cowan C, Hochedlinger K, Daley GQ. 2008. Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* **134**: 877-886
- Qian L, Huang Y, Spencer CI, Foley A, Vedantham V, Liu L, Conway SJ, Fu J, Srivastava D. 2012. *In vivo* reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes. *Nature* **485**: 593-598
- Sand O, Sjaastad ØV, Haug E. 2009. *Människans fysiologi*. 2:e uppl. Stockholm: Liber

- Song Z, Cai J, Liu Y, Zhao D, Yong J, Duo S, Song X, Guo Y, Zhao Y, Qin H, Yin X, Wu C, Che J, Lu S, Ding M, Deng H. 2009. Efficient generation of hepatocytelike cells from human induced pluripotent stem cells. *Cell Research* **19**: 1233-1242
- Stadtfeld M, Maherali N, Breault DT, Hochhedlinger K. 2008a. Reprogramming of pancreatic beta cells into induced pluripotent stem cells. *Current biology* **18**: 890-894
- Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, Weir G, Hochhedlinger K. 2008b. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* **322**: 945-949
- Takahashi K, Tanabe k, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**: 861-872
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocyst. *Science* **282**: 1145-1147
- Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, Loh TH, Li H, Lau F, Ebina W, Mandal PK, Smith ZD, Meissner A, Daley GQ, Brack AS, Collins JJ, Cowan C, Schlaeger TM, Rossi DJ. 2010. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell* **7**: 618-630
- Weintraub H, Tapscott SJ, Davis RL, Thayer MJ, Adam MA, Lassar AB, Miller AD. 1989. Activation of muscle-specific genes in pigment, nerve, fat, liver, and fibroblast cell lines by forced expression of MyoD. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**: 5434-5438
- Wernig M, Zhao JP, Pruzsak J, Hedlund E, Fu D, Soldner F, Broccoli V, Constantine-Paton M, Isacson O, Jaenisch R. 2008. Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proceedings of the national academy of science of the United States of America* **105**: 5856-5861
- Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KHS. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* **385**: 810-813
- Wolpert L, Tickle C, Lawrence P, Meyerowitz E, Robertson E, Smith J, Jessell T. 2011. *Principles of development*. 4:e uppl. Oxford University Press, Oxford
- Yamanaka S. 2009. Elite and stochastic models for induced pluripotent stem cell generation. *Nature* **460**: 49-52
- Yamanaka S, Takahashi K. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**: 663-676
- Young MA, Larson DE, Sun CW, George DR, Ding L, Miller CA, Lin L, Pawlik KM, Chen K, Fan X, Schmidt H, Kalicki-Veizer J, Cook LL, Swift GW, Demeter RT, Wendl MC, Sands MS, Mardis ER, Wilson RK, Townes TM, Ley TJ. 2012. Background mutations in parental cells account for most of the genetic heterogeneity of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* **10**: 570-582
- Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. 2007. Induced pluripotent stem cells lines derived from human somatic cells. *Science* **318**: 1917-1920
- Zhao T, Zhang ZN, Rong Z, Xu Y. 2011. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature* **474**: 212-215
- Zhou T, Benda C, Dunzinger S, Huang Y, Ho JC, Yang J, Wang Y, Zhang Y, Zhuang Q, Li Y, Bao X, Tse HF, Grillari J, Grillare-Voglauer R, Pei D, Esteban MA. 2012. Generation of human induced pluripotent stem cells from urine samples. *Nature protocols* **7**: 2080-2089
- Zhou Q, Brown J, Kanarek A, Rajagopal J, Melton DA. 2008. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature* **455**: 627-632