



UPPSALA  
UNIVERSITET

En kartläggning över gårdagens, dagens och morgondagens  
stamcellsforskning och inducerbara pluripotenta stamcellers roll i  
den

Jens Berndtsson

---

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

## Sammandrag

Stamceller har länge varit ett område som många forskare ser som framtida hopp inom läkemedelsforskningen. Den kallas terapeutisk stamcellsforskning och är i dagsläget hetare än någonsin förr. Tidigare forskning på stamceller har kretsat kring embryonala stamceller och adulta stamceller. På den fronten är benmärgstransplantationer, som är en typ av applicering av adulta stamceller, numera ett vanligt ingrepp som årligen räddar många tusen liv. År 2006 publicerades en artikel där inducerbara pluripotenta stamceller genom direkt reprogrammering introducerades. Inducerbara pluripotenta stamceller skapas genom att en vanlig cell från kroppen behandlas med transkriptionsfaktorer som ändrar dess uttryck så att den dedifferentierar och bildar en stamcell. Fördelen med sådana stamceller är inte bara densamma som kännetecknar adulta stamceller: att de är DNA-specifika för värden de togs ifrån. Men också att de i likhet med de embryonala stamcellerna har en extrem förmåga att kunna differentiera till nya typer av celler. En cell som ursprungligen kom från huden kan således omvandlas till en nervcell, levercell eller muskelcell eller annan typ av cell. Den främsta fördelen med inducerbara pluripotenta stamceller är emellertid att de kan lösa ett av de största problemen stamcellsforskningen har mött: de etiska problemen. Att kunna framställa vilka typer av celler i kroppen som helst utan att behöva extrahera stamceller från embryon eller aborterade foster har fram till det att inducerbara pluripotenta stamceller kommit fram varit en omöjlighet. Och eftersom inducerbara pluripotenta stamceller framställs från celler som frivilligt donerats från individer kringgår dessa de etiska problemen som associeras med embryonal stamcellsforskning. Även om inducerbara pluripotenta stamceller som forskningsområde i dagsläget blomstrar behövs fortfarande forskning på embryonala- och adulta stamceller som komplement till den. Jämförande studier mellan embryonala stamceller och inducerbara pluripotenta stamceller är det bästa sättet att avgöra hur väl man lyckas med de senares forskning.

## Inledning

Stamcellsforskningen inleddes i början av 1960-talet i och med stamcellens upptäckt (Becker *et al.* 1963). Efter det har den expanderat, tack vare fyndet av inducerbara pluripotenta stamceller (iPS) genom direkt reprogrammering (Takahashi & Yamanaka 2006) är området nu hetare än någonsin

Den medicinska forskningen kring stamceller kallas terapeutisk stamcellsforskning. Stamcellers förmåga att differentiera till olika typer av celler gör dem intressanta för medicinsk forskning. Ökad kunskap i hur man kan styra stamcellers differentiering kan på sikt ge botemedel mot såväl sjukdomar som skador där celler i kroppen drabbas. Forskningen i dag är fortfarande mycket i experimentstadiet men vissa behandlingar existerar och praktiseras, ett sådant exempel är benmärgstransplantation (Snowden *et al.* 1997). Det långsiktiga målet med stamcellsforskning ur medicinsk synvinkel är att kunna bota sjukdomar såväl som att kunna skapa mänskliga 'reservdelar'. Det är dock inte bara ur medicinska syften man studerar stamceller. Ett exempel på ett annat forskningsområde där kunskap om stamceller kan användas är till att bevara den biologiska mångfalden genom att återinföra genetiskt material till utrotningshotade populationer (Ben-Nun *et al.* 2011).

Det finns många typer av stamceller som man kan dela upp efter vilket ursprung de har. Den mest kända stamcellstypen är embryonala stamceller (ES), utöver den finns också adulta stamceller (AS) och iPS. De i dagsläget mest intressanta typerna av stamceller är iPS eftersom de både är pluripotenta och mest forskning har skett på dem under de senaste åren.

Syftet med den här uppsatsen är att studera och presentera iPS genom direkt reprogrammering och dess roll i dagens och framtidens stamcells forskning. Kan iPS ersätta ES och AS som källa för pluripotenta stamceller och användas praktiskt i såväl forskning som medicin?

## **Introduktion till stamceller och deras uppdelning**

De tre huvudsakliga celltyperna som utgör grunden i flercelliga organismer är: somatiska celler, könsceller och stamceller. De somatiska cellerna utgör den största delen och innefattar alla celler utom könsceller och stamceller. Könscellerna innefattar spermier och ägg.

Stamceller är i grunden en typ av cell som inte har differentierat klart till en specifik cell (Lajtha 1979). För att en stamcell ska kallas en stamcell krävs också att den har ett självåterskapande system. Det vill säga att varje gång som den bildar en differentierad cell så skapar den också en odifferentierad kopia av sig själv genom asymmetrisk celldelning (Morrison *et al.* 1997). Vidare krävs det av stamceller att de har en potensgrad. Potensgraden indikerar stamcellens förmåga att differentiera (Jaenisch & Young 2008). Totipotenta stamceller kallas de allra första cellerna i ett embryo, dessa kan differentiera till alla olika celltyper hos en organism. Pluripotenta stamceller har nästan lika hög differentieringsgrad som totipotenta stamceller och kan differentiera till nästan alla celler hos en organism, de kan dock inte organisera sig till ett embryo och är därför inte totipotenta (Mitalipov & Wolf 2009). De multipotenta stamcellerna kan differentiera till celler som liknar varandra, hematopoetiska stamcellers utveckling till celler inom blodomloppet och immunsystemet är ett exempel på multipotenta stamceller (Orkin & Son 2008). Unipotenta stamceller ger endast upphov till en typ av cell, till exempel könsceller (Cinalli *et al.* 2008).

### **Embryonala stamceller**

Embryonala stamceller (ES) kallas så eftersom de har sitt ursprung i embryon. ES isolerades första gången från musblastocyter i början på 1980-talet (Evans & Kaufman 1981, Martin 1981). De är förmodligen den mest kända typen av stamceller både på grund av den etiska aspekten i stamcellsdebatten men också för att det har forskats på dessa under en längre period än de flesta andra typer.

Det finns totipotenta, pluripotenta och multipotenta stamceller i ES-gruppen. De allra tidigaste stadierna av ett befruktat ägg, zygoten och 2-, 4-, 6-8- och 16-cellsblastocysten utgör totipotenta ES (Bongso & Richards 2004). De pluripotenta stamcellerna i ES-gruppen har sitt ursprung från blastocystens senare stadium då den har utvecklat ICM (inner cell mass) (Thomson *et al.* 1998). ICM bildar epiblasten som i sin tur bildar ektodermet, mesodermet och endodermet. I endodermet finns en grupp multipotenta stamceller som differentierar och bildar alla endodermala organ till exempel lunga, lever och mage (Bongso & Lee 2005).

Embryoniska könsceller (EG) kallas en liten del pluripotenta stamceller (Stewart *et al.* 1994) som härstammar från de ursprungliga könscellerna (PGC) som formas då embryot är mycket ungt (Matsui *et al.* 1992).

### **Adulta stamceller**

Adulta stamceller (AS) är ett samlingsnamn för nio typer av multipotenta stamceller som återfinns hos vuxna individer (Bongso & Lee 2005) (tabell 1). Deras uppgift är att underhålla kroppen och skapa nya celler att ersätta gamla med.

Tabell 1. Visar de nio stora grupperna av AS beskrivna av Bongso & Lee (2005) tillsammans med deras ursprung och vad de kan differentiera till.

Stamcelltyp/ursprung	Typ av differentierad cell	Referens
<b>Hematopoetisk</b> /Benmärg, Blod	Blodkroppar, Myleoidceller, Lymfoidceller	Reya <i>et al.</i> 2001.
<b>Mesenchymal</b> /Benmärgsstroma	Brosk, Ben, Fett, Hud, Ligament, Muskler	Caplan & Dennis 1996.
<b>Mag</b> /Mage, Tarmar	Inälvskryptsystem Gastrointestinalt carcinom	Wright 2000.
<b>Lever</b>	Hepatocyter, gallepitelceller	Alison <i>et al.</i> 2004.
<b>Ben</b>	Adipocyter, Osteoblaster	Nuttall <i>et al.</i> 1998
<b>Epidermal</b> /Hud	Hudceller, Hårceller	Blanpain <i>et al.</i> 2004.
<b>Neuronal</b> /Hjärnan	Neuroner, Astrocyter <sup>a</sup> , Oligodendrocyter <sup>a</sup>	Bottai <i>et al.</i> 2003.
<b>Pankreatik</b> <sup>b</sup> /Bukspottskörteln	β-celler	Zulewski <i>et al.</i> 2001. Dor <i>et al.</i> 2004.
<b>Ögon</b>	Stavar, Bipolär neuron, Müllers Glia	Tropepe <i>et al.</i> 2000.

<sup>a</sup> Endast i *in vitro* <sup>b</sup> Forskarna ovissa om stamcellers existens

### Inducerbara pluripotenta stamceller

Inducerbara pluripotenta stamceller (iPS) är ett namn för stamceller som skapats av att man framkallat pluripotenta stamceller av vanliga somatiska celler. IPS-forskningen är det senaste tillskottet till stamcellsforskningen och hade sitt stora genombrott i och med att japanska forskare framställde iPS genom direkt reprogrammering för första gången i mitten av 2000-talet (Takahashi & Yamanaka 2006).

Eftersom iPS i likhet med ES är pluripotenta men till skillnad från AS inte i första hand kommer från ett specifikt ställe från kroppen delas iPS in i fyra grupper beroende på vilken metod man har använt för att framställa dem. Dessa är SCNT (cellkärnstransplantation), cellfusion, inducering med hjälp cellkulturer och direkt reprogrammering.

#### *SCNT, cellfusion och inducering med hjälp av cellkulturer.*

Även om iPS namngavs av Takahashis och Yamanakas i och med deras upptäckt 2006 så har iPS i andra former funnits innan det. SCNT är kanske mest förknippat med födseln av Dolly, ett klonat får som var resultatet av ett experiment av Wilmut *et al.* (1997). Konceptet med SCNT är att ta ut cellkärnan ifrån en äggcell och ersätta den med en cellkärna ifrån en somatisk cell, låta den växa och sedan få ES med DNA ifrån somatiska celler (Coleman & Kind 2000). Därefter kan man antingen göra som Wilmut och hans forskargrupp och låta det bli en organsim (reproduktiv kloning) eller så kan man använda stamcellerna man får av dem för forskning och eventuella framtida medicinska applikationer (terapeutisk kloning).

Cellfusion är ett annat sätt att skapa iPS. Metoden går ut på slå ihop en somatisk cell med en ES, och på så vis skapa en tetraploid cell (Hochedlinger & Jaenisch 2002). Metoden har visat sig fungera även för mänskliga celler och utgör ett alternativ till äggcellerna som används i SCNT (Cowan *et al.* 2005). Både SCNT- och cellfusionsforskning kräver bruket av ES, något som gör att de hamnar i samma sits som ES i stamcellsdebatten.

Inducering med hjälp av cellkulturer är ett potentiellt tredje sätt att alstra iPS. Att odla PGC under rätta förhållanden kan skapa ES-liknande celler (Kanatsu-Shinohara *et al.* 2004) och inte bara EG celler som man tidige trott (Matsui *et al.* 1992). Huruvida metoden fungerar på samma sätt med somatiska celler är dock inte självklart (Jaenisch & Young 2008).

Sedan Takahashis och Yamanakas experiment 2006 har fler forskare fått upp ögonen för potentialen hos iPS genom direkt reprogrammering. Detta har lett till att fler dedifferentieringsmetoder för somatiska celler har uppkommit. IPS har en stor potential som framtida forskningsområde eftersom de till skillnad från AS är pluripotenta och till skillnad från ES är relativt lätta att få tag på. Dock existerar frågetecken kring iPS, till vilken utsträckning är iPS pluripotenta, kan de användas terapeutiskt?

### **Övriga stamceller**

Utöver ES, AS och iPS finns det även stamceller från andra ursprung. Av dessa så är de fetala- och infantila stamcellerna de som sticker ut ur mängden. Fetala stamceller återfinns i organ hos foster och infantila stamceller hittas i navelsträngsblod och i Wharton's jelly (typ av cell inuti navelsträngen) (Mitchell *et al.* 2003). Precis som i fallet med ES är forskning på fetala- och infantila stamceller begränsad eftersom det finns etiska betänkligheter kring denna forskning.

### **Framställning av iPS via direkt reprogrammering**

Framställning av iPS via direkt reprogrammering är det senaste framsteget i iPS-forskningen. Kortfattat kan man säga att processen möjliggörs genom ektopisk uttryckning (uttryckning av en normalt sett inaktiv gen) av specifika transkriptionsfaktorer. Sedan dess genombrott har tekniken förbättrats och nya tekniker uppkommit. Maherali och Hochedlinger (2008) har emellertid identifierat sju punkter som gäller för framställning av iPS via reprogrammering; (1) Transkriptionsfaktorsval för reprogrammeringen, (2) Vektorval för leverans av transkriptionsfaktorn, (3) Celltypsval för reprogrammeringen, (4) Faktorparametrar (koncentrationer, tidpunkter för tillsättning, etc.), (5) Cellkulturförhållanden i framställningen, (6) Identifiering av iPS och (7) Karaktärisering av reprogrammerade celler.

### **Transkriptionsfaktorsval, vektorval och celltypsval för reprogrammering av iPS**

De första sakerna att ta hänsyn till vid framställning av iPS är valet av transkriptionsfaktorer, vektor att leverera sagda faktorer och vilken typ av cell man vill reprogramera. En kombination som påverkar effektiviteten och funktionaliteten för terapeutisk forskning hos den reprogrammerade cellen (tabell 2).

Transkriptionsfaktorer är speciella proteiner som sätter igång transkription. Vid direkt reprogrammering av somatiska celler till iPS inducerar dessa transkriptionsfaktorer proteiner som får cellen att omvandlas. De första transkriptionsfaktorerna att användas för det ändamålet var Oct3/4, Sox2, c-Myc, och Klf4. Dessa hade tagits fram ur en pool av 24 kandidater som tidigare karaktäriserats som faktorer viktiga för ES (Takahashi & Yamanaka 2006). Liknande transkriptionsfaktorer har visat sig fungera som substitut för dessa (Yu *et al.* 2007). Det har också visat sig att andra faktorer medverkan kan skapa mer gynnsamma förutsättningar för reprogrammeringen till iPS (tabell 2).

Vektorval är det som avgör med vilken metod man väljer att leverera faktorerna in i cellen. Takahashi och Yamanaka (2006) använde i sitt experiment en retroviral vektor som integrerade med värdcellen. Men mer aktuell forskning försöker att använda icke-integrerade och till och med DNA-fria alternativ till vektorer. Detta för att undvika förhöjd mutationsfrekvens som korrelerar med integrerade vektorer. Icke-integrerade vektorer har emellertid lägre effektivitetsgrad än de integrerande (tabell 2).

Celltypsvalet avgör vilken typ av cell man vill reprogrammera. Det finns tre variabler man måste ta hänsyn till i celltypsvalet: (1) Hur lätt transkriptionsfaktorerna för reprogramming kan introduceras, (2) Hur tillgänglig cellen är för experiment, (3) Hur gammal cellen ifråga är (Maherali & Hochedlinger 2008). Den vanligaste celltypen för iPS-forskning har varit fibroblaster (typ av bindvävscell) som tidigare blivit iPS genom cellfusion (Cowan *et al.* 2005). Andra celltyper har dock använts och precis som med transkriptionsfaktorsvalet och vektorvalet spelar även celltypsvalet in i effektiviteten och funktionaliteten för terapeutisk forskning (tabell 2).

Tabell 2. Fördelar och nackdelar med olika kombinationer av vektorer, celltyper och faktorer för att inducera pluripotens. Modifiering av Robinton & Daley 2012. För ytterligare referenser se originaltabellen.

<b>Vektortyp</b>		<b>Celltyp</b>	<b>Faktorer*</b>	<b>Fördelar och nackdelar</b>
Integrerande	Retroviral	Fibroblaster, neurala stamceller, magceller, leverceller, keratinocyter, amnioniska celler, blodceller och fettceller	OSKM, OSK, OSK +VPA, OS + VPA	Metoden är effektiv men innefattar genomisk integration, har problem med kvarstående viral uttryckning och långsam reprogrammingskinetik.
	Lentiviral	Fibroblaster och keratinocyter	OSKM <i>miR302/367</i> cluster + VPA	Metoden är effektiv och transducerar både delande och icke-delande celler. Men den medför genetisk integration och problem med kvarstående viral uttryckning.
	Inducibel lentiviral	Fibroblaster, $\beta$ -celler, keratinocyter, blodceller och melanocyter	OSKM OSKMN	Metoden är effektiv och tillåter kontrollerad uttryckning av faktorer. Men den medför genetisk integration and krav för transaktivator uttryck.
Urklippbar	Transposon	Fibroblaster	OSKM	Metoden är effektiv och är utan integrering men den är också arbetsam på grund av screening av urklippning i genomet.
	<i>loxP</i> -flankerad lentiviral	Fibroblaster	OSK	Metoden är effektiv och är utan integrering men den är också arbetsam på grund av screening av urklippning i genomet. <i>LoxP</i> är kvar i genomet.
Icke-integrerande	Adenoviral	Fibroblaster och leverceller	OSKM	Ingen genetisk integration men är ineffektiv.
	Plasmid	Fibroblaster	OSNL	Nästan ingen genetisk integration, är dock ineffektiv.

<b>Vektortyp</b>	<b>Celltyp</b>	<b>Faktorer*</b>	<b>Fördelar och nackdelar</b>	
DNA fri	Sendai virus	OSKM	Saknar genetisk integration men har sekvenskänsligt RNA replikase, och svårigheter i att ta bort virusen från cellerna.	
	Protein	OS	Saknar genetisk integration, levererar faktorerna direkt och saknar DNA-relaterade komplikationer. Men är ineffektiv, har kort "half-life" och behöver stora mängder av proteiner samt multipla användningar av de.	
	Modified mRNA	OSKM OSKML + VPA	Saknar genetisk integration, förbiser kroppens antivirala respons, snabb reprogrammeringskinetik, effektiv och kontrollerbar men kräver multipla transfektionsomgångar.	
	Micro-RNA	stromala fettceller och dermal fibroblaster	miR-200c, miR-302s miR-369s	Saknar genetisk integration, relativt effektiv, snabbare reprogrammeringskinetik än lentivirala eller retrovirala vektorer och saknar exogena faktorer. Men har lägre effektivitet än vanligare metoder.

\*OSKM och liknande faktornamn representerar kombinationer av reprogrammeringsfaktorer: K=KLF4; L=LIN28; M=c-MYC; N=NANOG; O=OCT4; S=SOX2; och VPA=valproinsyra.

### **Faktorparametrar och cellkulturförhållanden i framställningen av iPS**

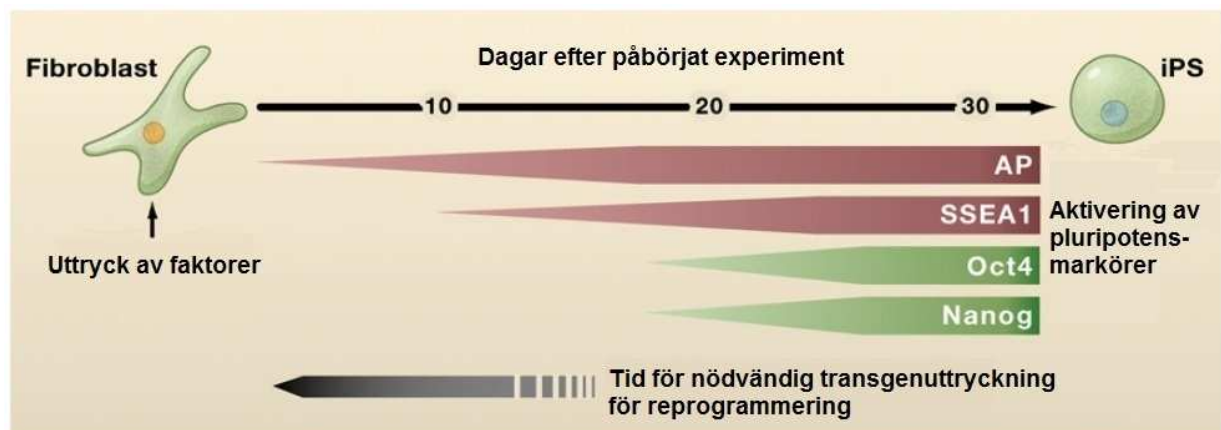
När val av transkriptionsfaktorer, vektor och celltyp har gjorts måste parametrarna kring dessa uppmärksammas. Detta innebär att mängden transkriptionsfaktorer och hur dessa samordnas tidsmässigt samt hur stökiometrin (mängdförhållandena mellan faktorerna för reaktion) måste granskas. Vid cellkulturförhållanden krävs det inte bara att cellerna får den näring de behöver, det är också viktigt att de dissocierar med varandra för att hålla isär de kulturer som uppstår från varandra.

Samordningen av transkriptionsfaktorer under tiden för experimentet har visat vara en viktig komponent och något som måste kvantifieras ifall man vill vidareutveckla tekniker att framställa iPS. En av de första sådana studier gjordes på musfibroblaster, där man fastslog att det krävdes minst 12 dagar under extern transkriptionsfaktorspåverknings med hjälp av doxycycline (dox) inducerbar lentivirusvektor (figur 1) (Brambrink *et al.* 2008). Liknande studier har också utförts på mänskliga celler med liknande resultat: 10 dagar (Maherali *et al.* 2008).

Kvantifiering av transkriptionsfaktorkoncentrationer och stökiometrin som innefattar dessa är ännu ett icke fastslaget forskningsområde utan utförs från fall till fall. Det är likafullt viktigt att försäkra sig om att tillräckliga mängder transkriptionsfaktorer uttrycks för lyckad framställning av iPS.

På grund av iPS likheter med ES har det i nästan alla fall använts samma medium som används för underhåll av ES i ES-forskning. Akutsu *et al.* (2006) rekommenderar att man använder trypsinmedium för enzymatisk dissociation eftersom det underlättar räkning av

antalet celler samt möjliggör skapandet av DSCC (definite single cell clone) vilket inte är fallet om man använder medium med collagenase eller dispase för enzymatisk dissociation.



Figur 1. Vid reprogrammering sker aktivering av pluripotensmarkörer sekventiellt. AP- (alkaline phosphatase) och SSEA1-celler upptäcks redan dag 3 respektive 9 efter introduktion av faktorer. Produkter från Oct4- eller Nanog-loci visas inte fören efter 2 veckor. För fullständig reprogrammering krävs alltså ungefär 2 veckors uttryck av faktorerna. Modifierad från Jaenish & Young 2008.

### Identifiering av iPS och karaktärisering av reprogrammerade celler

För att vara säkra på cellerna som odlats verkligen har reprogrammerats och blivit pluripotenta stamceller måste de testas. Det finns många sätt att testa detta genom att selektera de reprogrammerade cellerna efter skapandet av dem (tabell 3). Att endast identifiera iPS med hjälp av selektion är dock inte nog för att kunna påstå att man har framställt dem. Tre karaktärsdraggrupper som iPS måste uppvisa inkluderar morfologiska, molekylära och funktionella likheter med ES.

Tabell 3. Olika metoder, och vad dessa innebär, för selektion av möjliga iPS.

Metod	Om metoden	Referens
Selektering av Fbx15	Selektering av ES-specifik gen, först att användas, indikerar endast partiell reprogrammering av iPS	Takahashi & Yamanaka 2006
Selektering av Oct14, Nanog och Sox2	Selektering av ES-specifika gener, indikerar full reprogrammering av iPS	Wernig <i>et al.</i> 2007
Ytantigenstest	Selektering för uttryck av ES-specifika ytantigener (t ex SSEA-1).	Stadtfeld <i>et al.</i> 2008

Morfologiskt menas att de måste se likadana ut som ES samt vara självåterskapande. Molekylära likheter innefattar att den har korrekta mängder av ES-proteiner som Oct4, Nanog och Sox2 och de specifika ytantigenerna för stamcellen i fråga. Det krävs också att den har funktionellt telomerasuttryck (Stadtfeld *et al.* 2008) och att gener som är involverade i retroviral inaktivering uttrycks vilket görs genom att undersöka metyleringsstatusen hos deras promotorer (Cowan *et al.* 2005). Kvinnliga iPS måste uppvisa återaktivering av den inaktiva X-kromosomen, något som händer sent i reprogrammeringen (Maherali *et al.* 2007). Funktionella likheter innebär att iPS måste kunna forma embryodiska kroppar *in vitro* från vilka man kan avgöra ifall ektodermet, mesodermet och endodermet kan bildas. Bildandet av ektodermet, mesodermet och endodermet kan dock ske till följd av cellulär stress vilket innebär att vidare test måste genomföras. Man kan också testa i fall iPS kan bilda köns-celler (Jaenisch & Young 2008). Hos möss är utvecklandet av en chimär (organism med celler från olika individer) viktigt. Detta visar att iPS kan följa den normala gången för ES. Celler från



värden kan dock kontaminera sådana tester så ett liknande test där man för in iPS i en tetraploid blastocyst istället brukas användas. Detta för att tetraploida värdceller kan inte kontaminera på det sättet (Nagy *et al.* 1990). Hos människor används istället utvecklandet av teratoma vilket skapas av att iPS injekteras i möss (*in vivo*) och då skapar en tumör vars beståndsdelar kommer från ektodermet, mesodermet och endodermet (Lensch *et al.* 2007).

## **Terapeutisk stamcells forskning**

Den terapeutiska stamcells forskningen är den typ av medicinsk forskning som går ut på att använda stamceller för att på ett eller annat sätt bota sjukdomar och skador. Av befintliga stamcellsmediciner är i dagsläget benmärgstransplantationer det bästa exemplet, något som gör att adulta stamceller toppar listan för praktisk användning av stamceller. Adulta stamceller har dock inte samma potential som finns hos de pluripotenta cellerna hos ES och iPS. Potentialen att inte bara bota de åkommor som drabbar de områdena vi kan extrahera adulta stamceller ifrån utan också de mer svåråtkomliga som till exempel de som finns i ögonen är ett av målen med iPS-forskningen. Ett mer långsiktigt mål är skapandet av hela organ.

### **Benmärgstransplantation med AS**

Benmärgstransplantation är som tidigare betonats det bästa exemplet på hur adulta stamceller kan användas i terapeutisk forskning. Benmärgstransplantationer använder hematopoetiska stamceller och fungerar så att man först måste få tag på friska stamceller, dessa kan komma från patienten själv (autolog) eller från en värd (allogen). Sedan behandlas de drabbade områdena med kemoterapi eller strålbehandling eller en kombination av båda till alla de drabbade cellerna dör eller delar av de drabbade cellerna dör. Sedan förs de friska cellerna tillbaka till patienten och bildar nya friska celler i de döda cellernas plats (Burt *et al.* 2008). Benmärgstransplantationer har praktiserats längre än man väntar sig när man tänker på det som en del av stamcells forskningen. Så tidigt som 1968 utfördes den första lyckade benmärgstransplantationen (Hansen 2003). Tack vare användandet av hematopoetiska stamceller har man med hjälp av behandlingen kunnat bota en rad sjukdomar där leukemi och immunologa sjukdomar räknas som de främsta. Även om benmärgstransplantationer numera förekommer frekvent så är det en riskfull operation med påtaglig risk för komplikationer under behandlingen. GVHD (graft-versus-host disease) kallas det tillståndet som uppstår när patientens kropp inte är kompatibel med de transplanterade stamcellerna. Det tillsammans med infektioner och blödningar är de vanligaste komplikationerna som kan uppstå vid benmärgstransplantation och bidrar med en dödlighet på 7% - 23% (Gratwohl *et al.* 2005, Nash *et al.* 2007).

### **ES och iPS pluripotentiella potential i sjukdomsmodellering, medicinutveckling och celltransplantationer**

Både ES och iPS är pluripotenta, något som gör dem extra intressanta då dess ursprung inte hindrar deras differentieringsförmåga i samma grad som för AS. Ett mål som forskare länge haft är att utveckla patientspecifika stamceller. Tanken med dessa är att undvika GVHD och minimera behovet av donatorer inom stamcellstransplantationer. ES som inte är DNA specifika för patienten gjorde att SCNT var ett hett forskningsområde innan upptäckten av iPS. I och med iPS upptäckt har vissa forskare hävdad att det problemet är löst medan andra ställer sig mer reserverade till det påståendet.

Den terapeutiska stamcells forskningen för iPS liknar den forskning som har gjorts och görs på ES i det att flera typer av differentierade celler skapas av iPS (tabell 4). Själva skapandet av differentierade celler är dock bara första steget i den terapeutiska forskningen kring dem. Den

mesta forskningen idag fokuserar på sjukdomsmodellering, men medicinutveckling och i framtiden celltransplantationer är praktiska applikationer som börjat tillämpas på forskningsnivå.

Tabell 4. Urval av iPS differentierade celler.

Typ av differentierad cell	Referens
Neuronala, gliala och dopaminneuroner	Wernig <i>et al.</i> 2008
Motorneuroner	Dimos <i>et al.</i> 2008
Hematopoetiska stamceller och blodceller	Hanna <i>et al.</i> 2007
Hjärtmuskel	Shi <i>et al.</i> 2008
Oligodendrocyter	Jang <i>et al.</i> 2011
$\beta$ -lika celler	Maehr <i>et al.</i> 2009
Skelettmuskel	Kawagoe <i>et al.</i> 2011
Retinala, fotoreceptorer och retinal pigment epitel,	Osakada <i>et al.</i> 2009
Vita och bruna fettceller	Ahldeldt <i>et al.</i> 2012

Det finns så pass mycket forskning på sjukdomsmodellering och potentiella behandlingar med hjälp av iPS att en fullständig förteckning över alla är omöjlig här. Vad sjukdomsmodellering innebär är att man skapar iPS i från celler av en sjuk patient, vilka man sedan gör vidare experiment på för att öka kunskapen om sjukdomen patienten har. Ett av de mest kända exemplen på sådan forskning är den på familjär dysautonomi (Riley-Day syndromet), som är en genetisk sjukdom som orsakas av en punktmutation i en specifik gen (*IKBKAP*). Vad forskarna kom fram till var att orsaken till mutationen berodde på ett splicing fel samt att nerurogenesen (skapandet av neuroner från stamceller) och migrationen för NC (nerunal crest) prekursorceller var defekta (Lee *et al.* 2009). Vidare så visar forskarna att växthormonet kinetin kraftigt reducerar splicningsfelet i den drabbade genen. Yngre och mindre kända exempel på sjukdomsmodellering med hjälp av iPS har gjorts på bland annat schizofreni (Brennand *et al.* 2011) och den neurodegenerativa sjukdomen Sanfilippo syndromet typ B (Lemonnier *et al.* 2011). Brennands och hennes kollegors forskning visade på förminskad neuronal konduktivitet i iPS-inducerade nervceller. De visade också att läkemedlet loxapine ökade samma konduktivitet, och att läkemedlen clozapine, olanzapine, risperidone och thioridazine inte hade någon signifikant effekt för ökandet av neuronal konduktivitet. I fallet med Sanfilippo syndromet som orsakas av en mutation i *NAGLU*, visade Lemonnier och hans kollegor att genom tillförsel av exogena *NAGLU*-enzym kunde förhindra sjukdomen.

När det gäller celltransplantationer med mänskliga iPS finns det ännu en del problem som måste lösas. Det har dock gjorts studier på möss med till exempel Parkinsons sjukdom (Wernig *et al.* 2008) och sickelcellanemi (Hanna *et al.* 2007). Där båda forskargrupperna visat förbättring av mössens tillstånd efter iPS transplantation av de drabbade områdena.

## Problematik med stamcells forskning

Precis som med den mesta forskning så finns det ett viss mått av problematik kring stamcells forskning. ES-forskningens debatt om huruvida den är etisk försvarbar eller inte är i grund och botten en subjektiv fråga och har därför inget rätt svar. Ett problem som är övergripande för all typ av mänsklig stamcells forskning är det praktiska problemet med att det kräver mänskliga celler för att forska i och det är en bristvara.

### **Praktiska, etiska och juridiska problem med ES**

All forskning på ES ställs inför tre problem: praktiska, etiska och juridiska. Det praktiska problemet med forskning kring mänskliga ES kommer alltid att vara brist på tillgången. För att få tag i ES måste du först ha ett embryo med ICM och de enda sätten att få ett sånt är att abortera ett tidigt foster eller via överblivna embryon från infertilitetsbehandlingar vilket minskar utbudet rejält.

Det etiska problemet är ännu svårare att kringgå eftersom det i sin natur är subjektivt. I ett nötskal så är frågan man måste ställa sig, när börjar mänskligt liv? De som anser att livet börjar vid befruktning anser att fostret redan då bör ha fullvärdiga mänskliga rättigheter. Att extrahera ES bryter i så fall mot artikel 3 i FN:s allmänna förklaring om de mänskliga rättigheterna: rätten till liv (Regeringskansliet 2009) samt lagstiftningar kring vävnadsdonation.

De juridiska problemen med ES har fötts ur de etiska. I den europeiska unionen finns inget direktiv för ES-forskning som gäller för alla länder utan man har lämnat det upp till medlemmarna att själv lagstifta om frågan. Detta har lett till att vissa länder har lagar som gör det möjligt att forska på överblivna embryon (Sverige, Finland, Grekland, Nederländerna och Storbritannien, där Storbritannien till och med tillåter skapandet av embryon för forskningssyfte) medan andra länder (Tyskland, Frankrike, Irland, Österrike och Danmark) inte tillåter sådan forskning (Wiedemann *et al.* 2005). I USA finns det både federala och delstatliga lagar som reglerar ES-forskningen. De federala lagarna bestämmer vad federala skattepengar ska gå till. 2001 beslöts att ES-forskningen endast fick ske på ett fåtal stamcellslinjer. Detta luckrades i viss mån upp 2009 (Vita Huset). De delstatliga lagarna i USA är mer lika de lagar som finns i Europa i det att några stater förbjuder stamcells forskning och några ger ES-forskning delstatligt stöd.

### **AS multipotens medför differentieringsbegränsningar**

I likhet med ES är vissa adulta stamceller svåra att tillgå. För att till exempel få neuronala stamceller krävs att man dissekerar en hjärna vilket endast kan ske i fall vävnadsvärden är avliden. Att AS inte är pluripotenta är också något som gör dem mindre attraktiva att forska om. Pluripotenta stamceller är per definition mer användbara än multipotenta stamceller eftersom de är mer mångfaldiga i dess användningsområden.

### **Inducerbara pluripotenta stamceller**

Även om iPS inte kräver mänskliga embryon vid framställning och har samma DNA som värden den togs ifrån finns det vissa frågetecken som har dykt upp på senaste tiden. Hinder som måste övervinnas inkluderar vektorproblem, tumörproblem vid transplantation och huruvida cellvalet påverkar effektiviteten hos iPS. Verifieringsproblem är också ett ständigt aktuellt ämne i iPS-forskningen

Ett typiskt problem under framställningen av iPS är vektorvalet, som har gått från integrerade vektorer (retrovirus, lentivirus, transposoner, etc) till icke-integrerande vektorer. Anledningen är att de integrerande vektorerna eller faktorerna de levererar i vissa fall kan visa sig cancerogena, särskilt transkriptionsfaktorn c-Myc har visat sig ha onkogena egenskaper (Okita *et al.* 2007). Att ha icke-integrerande vektorer löser det problemet eftersom transkriptionsfaktorerna slutar uttryckas efter reprogrammering. Men som tidigare diskuterats så har dessa icke-integrerande vektorer oftast lägre effektivitetsgrad i reprogrammeringen än deras virala motsvarigheter eller är på annat vis svårare att jobba med (tabell 2). En annan källa till tumörer i arbetet med iPS ligger vid transplantationen av iPS från provröret till

patienten. Kontamination av odifferentierade iPS kan liksom deras ES motsvarigheter orsaka tumörer vilket innebär att identifiering och borttagning av odifferentierade iPS måste ske innan någon transplantation kan ske (Choo *et al.* 2008).

Effektivitetsgraden är ett ämne som inte bara ifrågasätts i samband med vektorval. En effektivitetsstudie där man jämför ES med iPS har visat att iPS i sig är mindre effektiva och har negativa funktionella skillnader när man jämför dem med ES (Feng *et al.* 2010). Studien visar även på ökad apoptos, minskad förmåga för tillväxt och expansion och minskad förmåga för kolonibildning hos hematopoetiska celler. Snabbare cellulärt åldrande påvisades också för vissa differentierade iPS. Fengs slutsatser att iPS alltid skulle vara mindre effektiva har dock fått kritik, där andra forskargrupper hävdar att effektivitetsskillnaderna mellan iPS och ES kan utjämnas med ett bättre cellval för reprogrammering (Bar-Nur *et al.* 2011). I sin studie visar Bar-Nur och hans kollegor hur iPS från bukspottskörteln som differentierat till insulinproducerande  $\beta$ -celler är bättre på att skapa insulin än  $\beta$ -celler från andra iPS och ES. Detta tar upp frågan huruvida det finns ett slags cellminne där iPS delar epigenetiska drag med sin originalcell och vilken effekt den iså fall har på iPS i ett terapeutiskt syfte. Att det existerar ett sådant minne hos iPS är väldokumenterat inte bara från Bar-Nurs experiment men även från andra forskargrupper (Kim *et al.* 2010, Ghosh *et al.* 2010). Huruvida detta minne har stor effekt på iPS terapeutiska förmåga är däremot inte lika välstuderat. *In vivo* studier på klonade möss har visat att individerna kan vara relativt tåliga emot epigenetiska avvikelser (Humpherys *et al.* 2001).

Verifiering av pluripotens är svårare i mänskliga iPS än de ifrån möss. Detta beror på att de verifieringstest som görs kan utföras grundligare på iPS från möss eftersom skapandet av chimär samt observationer om deras funktionella egenskaper i tetraploida blastocyster ger bättre bild än skapandet av en teratoma. Även om iPS-forskningen med mänskliga iPS har sådana inbyggda problem är det fortfarande viktigt att man inför en standard i forskarvärlden för hur man verifierar pluripotens. Daley *et al.* (2009) föreslår att man alltid använder sig av det bästa testet för pluripotens, och poängterar hur viktigt det är att alla gör det för att underlätta jämförelser av studier gjorda på olika håll.

## Diskussion

Trots att iPS-forskning genom direkt reprogrammering är en väldigt ny företeelse har den redan lämnat ett gigantiskt avtryck i stamcellsforskningen. Men kan den ersätta ES och AS som källa för pluripotenta stamceller och användas såväl praktiskt som i forskning? I dagsläget skulle jag säga nej, det kan den inte. Problemen som existerar med iPS-forskningen är ännu för stora för att förlita sig enbart på iPS. Några av problemen kräver jämförande studier mellan iPS och ES, något som gör ES-forskningen nödvändig. En annan anledning att inte sluta upp med den befintliga forskningen av de övriga stamcellerna är att den mänskliga iPS-forskningen inte har kommit i närheten av applicerbarhet för medicinskt bruk, något som forskningen på AS har gjort då benmärgstransplantationer årligen utförs cirka 50 000 gånger (Gratwohl *et al.* 2010).

Många av problemen kopplade till iPS är att val i framställningen har stor påverkan när det gäller effektiviteten hos iPS men också att vissa hävdar att iPS har en inneboende minskad effektivitet jämfört med ES. Det är sant att både epigenetiska och till och med genetiska skillnader har observerats hos iPS om man jämför dem med ES, bland annat av Hussein *et al.* (2011). Varför det är så och huruvida detta påverkar dem i fråga om terapeutisk forskning är i dagsläget svårt att svara på. Kommer skillnaderna från så enkla saker som kultur-

förutsättningar som Newman och Cooper (2010) föreslår eller finns svaret på annat håll är frågor som bara mer forskning på området kan svara på. Gällande verifieringsproblemen med iPS så är det svårt att inte hålla med Daley *et al.* (2009) i det att de bästa testen för pluripotens används. Utvecklingen av dedifferentieringsmetoder går framåt, metoderna som användes 2006 är redan förlegade, och det är svårt att säga hur metoderna kommer se ut om 5 år annat än att de kommer att röra sig mot applicerbarhet för terapeutisk forskning. Att metoderna för framställning utvecklas är normalt, precis lika normalt som att metoderna för identifiering och verifiering utvecklas. Daley och hans kollegors poängtering av hur en standard för verifiering medför förenklingar i jämförande arbeten mellan labb är återigen bara något man kan hålla med om.

Sammanfattningsvis kan man säga att det är svårt att dra slutsatser om problemen med iPS i dagsläget. IPS genom direkt reprogrammering är nytt och det behövs mer forskning i området för att fastställa huruvida om iPS kan leva upp till potentialen och förväntningarna som så många forskare tillskriver den. Det finns dock yttre krafter som påverkar framtidens stamcells forskning minst lika mycket som de vetenskapliga framstegen och det är politiska beslut. Som tidigare framlagts beror stamcells forskningen inte bara på kvalitén hos forskarna men också hur det politiska läget ser ut i länderna där den bedrivs. USA som är ledande i stamcells forskning i det att de mest ansedda stamcells forskarna verkar där, är ett land där stamcells debatten ständigt tas upp och forskningens existens sätts på prov. Det som redan nämnts är att lagarna lättades upp och underlättade för stamcells forskning 2009, mycket beroende på presidentbytet 2008. I år (2012) är det återigen valår i USA. Den sittande presidenten har genom sina handlingar visat stöd för stamcells forskning, hans oppositionskandidater har dock varierande åsikter. De fyra stora kandidaterna som det troligtvis kommer stå emellan är (i bokstavsordning): Newt Gingrich, Ron Paul, Mitt Romney och Rick Santorum. Gingrich har uttryckt stöd för AS-forskning men motsätter sig ES-forskning (Gingrich 2011). Paul är emot federalt stöd till stamcells forskning men anser att samma forskning är viktigt (Paul 2007). Romney är liksom Paul emot federalt stöd, men bara i fall det går till ES-forskning. Han stödjer dock metoder där embryon inte har någon roll (Romney 2007). Santorum motsätter sig förstörandet av embryon (Santorum 2006). Skulle någon av dessa kandidater vinna presidentvalet finns en överhängande risk att ES-forskningen i USA kan regleras på ett liknande sätt som innan 2009. Naturligtvis skulle inte stamcells forskning försvinna men eftersom många av de allra bästa forskarna i området verkar från USA skulle det bli en fördröjning med framstegen. En intressant upptäckt som nyligen gjordes kan dock göra framtiden för ES lite ljusare. I slutet av 2000-talet lyckades amerikanska forskare att extrahera ES utan att förstöra embryot (Chung *et al.* 2008). En bedrift vars påverkan på lagändringar kan komma att få stor betydelse inte bara i USA men också resten av världen.

## Tack

Tack till min handledare Lage Cerenius och mina medstudenter Emmy Borgmästars och Helen Kahsay för kommentarer och återkoppling på arbetet.

## Referenser

Ahldeldt T, Schinzel RT, Lee YK, Hendrickson D, Kaplan A, Lum DH, Camahort R, Xia F, Shay J, Rhee EP *et al.* 2012. Programming human pluripotent stem cells into white and brown adipocytes. *Nature Cell Biology* **14**: 209-219.

- Akutsu H, Cowan CA, Melton D. 2006. Human embryonic stem cells. *Embryonic Stem Cells* **418**: 78-92.
- Alison MR, Vig P, Russo F, Bigger BW, Amofah E, Themis M, Forbes S. 2004. Hepatic stem cells: from inside and outside the liver?. *Cell Proliferation* **37**: 1-21.
- Bar-Nur O, Russ HA, Efrat S, Benvenisty N. 2011. Epigenetic memory and preferential lineage-specific differentiation in induced pluripotent stem cells derived from human pancreatic islet beta cells. *Cell Stem Cell* **9**: 17-23.
- 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.
- Ben-Nun IF, Montague SC, Houck ML, Tran HT, Garitaonandia I, Leonardo TR, Wang YC, Charter SJ, Laurent LC, Ryder OA, Loring JF. 2011. Induced pluripotent stem cells from highly endangered species. *Nature Methods* **8**: 829-833.
- Blanpain C, Lowry WE, Geoghegan A, Polak L, Fuchs E. 2004. Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche. *Cell* **118**: 635-648
- Bongso A, Richards M. 2004. History and perspective of stem cell research. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* **18**: 827-842.
- Bongso A, Lee EH. 2005. Stem cells: their definition, classification and sources. I: Bongso A, Lee EH (red.). *Stem cells: from bench to bedside*, ss. 1-13. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Singapore.
- Bottai D, Fiocco R, Gelain F, Defilippis L, Galli R, Gritti A, Vescovi LA. 2003. Neural stem cells in the adult nervous system. *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research* **12**: 655- 670.
- Brambrink T, Foreman R, Welstead GG, Lengner CJ, Wernig M, Suh H, Jaenisch R. 2008. Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. *Cell Stem Cell* **2**: 151-159.
- Brennan KJ, Simone A, Jou J, Gelboin-Burkhat C, Tran N, Sangar S, Li Y, Mu Y, Chen G Yu D *et al.* 2011. Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. *Nature* **473**: 221-225.
- Burt RK, Loh Y, Pearce W, Beohar N, Barr WG, Graig R, Wen Y, Rapp JA, Kessler J. 2008. Clinical applications of blood-derived and marrow-derived stem cells for nonmalignant diseases. *The journal of the American medical association* **229**: 925-936.
- Caplan AI, Dennis JE. 1996. Mesenchymal stem cells: Progenitors, progeny, and pathways. *Journal of Bone and Mineral Metabolism* **14**: 193-201.
- Choo AB, Tan HL, Ang SN, Fong WJ, Chin A, Lo J, Zheng L, Entze H, Philp RJ, Oh SKW, Yap M. 2008. Selection against undifferentiated human embryonic stem cells by a cytotoxic antibody recognizing podocalyxin-like protein-1. *Stem Cells* **26**: 1454-1463.
- Chung Y, Klimanskaya I, Becker S, Li Tong, Maserati M, Lu SJ, Zdravkovic T, Ilic D, Genbacev O, Fisher S *et al.* 2008. Human embryonic stem cell lines generated without embryo destruction. *Cell Stem Cell* **2**: 113-117.
- Cinalli RM, Rangan P, Lehmann R. 2008. Germ cells are forever. *Cell* **132**: 559-562.
- Colman A, Kind A. 2000. Therapeutic cloning: concepts and practicalities. *Trends in Biotechnology* **18**: 192-196.
- Cowan CA, Atienza J, Melton DA, Eggan K. 2005. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science* **309**: 1369-1373.
- Daley GQ, Lench MW, Jaenisch R, Meissner A, Plath K, Yamanaka S. 2009. Broader implications of defining standards for the pluripotency of iPSCs. *Cell Stem Cell* **4**: 200-201.

- Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, Weisenthal LM, Mitsumoto H, Chung W, Croft GF, Saphier G, Leibel R, Goland R *et al.* 2008. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* **321**: 1218-1221.
- Dor Y, Brown J, Martinez OI, Melton DA. 2004. Adult pancreatic  $\beta$ -cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature* **429**: 41-46.
- Evans MJ, Kaufman MH. 1981. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. *Nature* **292**: 154-156.
- Feng Q, Lu SJ, Klimanskaya I, Gomes I, Kim D, Chung Y, Honig GR, Kim KS, Lanza R. 2010. Hemangioblastic derivatives from human induced pluripotent stem cells exhibit limited expansion and early senescence. *Stem Cells* **28**: 704-712.
- Ghosh Z, Wilson KD, Wu Y, Hu S, Quertermous T, Wu JC. 2010. Persistent donor cell gene expression among human induced pluripotent stem cells contributes to differences with human embryonic stem cells. *PLoS ONE* **5**: e8975.
- Gingrich N. 2009. Gingrich on stem cells. WWW-dokument: <http://www.youtube.com/watch?v=2rjL7AiS8Mo>. Hämtad 2012-03-02.
- Gratwohl A, Passweg J, Bocelli-Tyndall C, Fassas A, van Laar JM, Farge D, Andolina M, Arnold R, Carreras E, Flinck J *et al.* 2005. Autologous hematopoietic stem cell transplantation for autoimmune diseases. *Bone Marrow Transplantation* **35**: 869-879.
- Gratwohl A, Baldomero H, Aljurf M, Pasquini MC, Bouzas LF, Yoshima A, Szer J, Lipton J, Schewndener A, Gratwohl M *et al.* 2010. Hematopoietic stem cell transplantation a global perspective. *Journal of the American Medical Association* **303**: 1617-1624.
- Hanna J, Wenig 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.
- Hansen JA. 2003. In memoriam Robert A. Good, MD, PhD. *Journal of Clinical Immunology* **23**: 539-540.
- Hochedlinger K, Jaenisch R. 2002. Monoclonal mice generated by nuclear transfer from mature B and T donor cells. *Nature* **415**: 1035-1038.
- Humpherys D, Eggan K, Akutsu H, Hochedlinger K, Rideout WM, Biniszkiwicz D, Yanagimachi R, Jaenisch R. 2001. Epigenetic instability in ES cells and cloned mice. *Science* **293**: 95-97.
- Hussein SM, Batada NN, Vuoristo S, Ching RW, Autio R, Närvä E, Ng S, Sourour M, Hämäläinen R, Olsson C *et al.* 2011. Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency. *Nature* **471**: 58-62.
- Jaenisch R, Young R. 2008. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell* **132**: 567-582.
- Jang J, Kang HC, Kim HS, Kim JY, Huh YJ, Kim DS, Yoo JE, Lee JA, Lim B, Lee J *et al.* 2011. Induced pluripotent stem cell models from X-linked adrenoleukodystrophy patients. *Annals of Neurology* **70**: 402-409.
- Kanarsu-Shinohara M, Inoue K, Lee J, Yoshimoto M, Ogonuki N, Miki H, Baba S, Kato T, Kazuki Y, Toyokuni S *et al.* 2004. Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell* **119**: 1001-1012.
- Kawagoe S, Higuchi T, Meng XL, Shimada Y, Shimizu H, Hirayama R, Fukuda T, Chang H, Nakahata T, Fukada SI *et al.* 2011. Generation of induced pluripotent stem (iPS) cells derived from a murine model of Pompe disease and differentiation of Pompe-iPS cells into skeletal muscle cells. *Molecular Genetics and Metabolism* **104**: 123-128.
- Kim K, Doi A, Wen B, Ng K, Zhao R, Cahan P, Kim J, Aryee MJ, Ji H, Ehrlich L *et al.* 2010. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature* **467**: 285-290.
- Lajtha LG. 1979. Stem cell concepts. *Differentiation* **14**: 23-34.

- Lee, G, Papapetrou EP, Kim H, Chambers SM, Tomishima MJ, Fasano CA, Ganat YM, Menon J, Shimizu F, Viale A *et al.* 2009. Modeling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient specific iPSCs. *Nature* **461**: 402-406.
- Lemonnier T, Blanchard S, Toli D, Roy E, Bigou S, Froissart R, Rouvet I, Vitry S, Heard JM, Bohl D. 2011. Modeling neuronal defects associated with a lysosomal disorder using patient-derived induced pluripotent stem cells. *Human Molecular Genetics* **20**: 3653-3666.
- Lensch MW, Schlaeger TM, Zon LI, Daley GQ. 2007. Teratoma formation assays with human embryonic stem cells: a rationale for one type of human-animal chimera. *Cell Stem Cell* **1**: 253-258.
- Maehr R, Chen S, Snitow M, Ludwig T, Yagasaki L, Goland R, Leibel RL, Melton DA. 2009. Generation of pluripotent stem cells from patients with type 1 diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 15768–15773.
- Maherali N, Sridharan R, Xie W, Utikal J, Eminli A, Arnold K, Stadtfeld M, Yachechko R, Tchieu J, Jaenisch R *et al.* 2007. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell* **1**: 55-70.
- Maherali N, Ahfeldt T, Rigamonti A, Utikal J, Cowan C, Hochedlinger K. 2008. A high-efficiency system for the generation and study of human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* **3**: 340-345.
- 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 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **78**: 7634-7638.
- Matsui Y, Zsebo K, Hogan BLM. 1992. Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell* **70**: 841–847.
- Mitalipov S, Wolf D. 2009. Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* **114**: 185-199.
- Mitchell KE, Weiss ML, Mitchell BM, Martin P, Davis D, Morales L, Helwig B, Beerensrauch M, Abou-Easa K, Hildreth T, Troyer D. 2003. Matric cells from wharton's jelly form neuron and glia. *Stem Cells* **21**: 50-60.
- Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ. 1997. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell* **88**: 287-298.
- Nagy A, Gocza E, Diaz EM, Prideaux VR, Ivanyi E, Markkl'la M, Rossant J. 1990. Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse. *Development* **110**: 815-821.
- Nash RA, McSweeney PA, Crofford LJ, Abidi M, Chen CS, Godwin JD, Gooley TA, Holmberg L, Henstorf G, LeMaistre CF *et al.* 2007. High-dose immunosuppressive therapy and autologous hematopoietic cell transplantation for severe systemic sclerosis: long-term follow-up of the US multicenter pilot study. *Blood* **110**: 1388-1396.
- Newman AM, Cooper JB. 2010. Lab-specific gene expression signatures in pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* **7**: 258-262.
- Nuttall ME, Patton AJ, Olivera DL, Nadeau DP, Gowen M. 1998. Human trabecular bone cells are able to express both osteoblastic and adipocytic phenotype: Implications for Osteopenic Disorders. *Journal of Bone and Mineral Research* **13**: 371-382.
- Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. 2007. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* **448**: 313-317.
- Orkin SH, Zon LI. 2008. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell* **132**: 631-644.



- Osakada F, Jin ZB, Hiram Y, Ikeda H, Danjyo T, Watanabe K, Sasai Y, Takahashi M. 2009. In vitro differentiation of retinal cells from human pluripotent stem cells by small-molecule induction. *Journal of Cell Science* **122**: 3169-3179.
- Paul R. 2007. Ron Paul on abortion and stem cell research. WWW-dokument: <http://www.youtube.com/watch?v=66jpPCIzza8>. Hämtad 2012-03-03.
- Regeringskansliet 2009. FN:s allmänna förklaring. WWW-dokument: [http://www.manskligarattigheter.gov.se/extra/pod/?action=pod\\_show&id=71&module\\_instance=6](http://www.manskligarattigheter.gov.se/extra/pod/?action=pod_show&id=71&module_instance=6). Hämtad 2012-02-04.
- Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. 2001. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **414**: 105-111.
- Robinton DA, Daley GQ. 2012. The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature* **481**: 295-305.
- Romney M. 2007. Governor Romney on stem cell research. WWW-dokument: [http://www.dailymotion.com/video/x2or8x\\_governor-romney-on-stem-cell-resear\\_news](http://www.dailymotion.com/video/x2or8x_governor-romney-on-stem-cell-resear_news). Hämtad 2012-03-03.
- Santorum R. 2006. Santorum on embryonic stem cells. WWW-dokument: <http://www.youtube.com/watch?v=7ZxvP70HKYo>. Hämtad 2012-03-03.
- Shi Y, Despons C, Do JT, Hahm HS, Schöler HR, Ding S. 2008. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Oct4 and Klf4 with small-molecule compounds. *Cell Stem Cell* **3**: 568-574.
- Snowden JA, Brooks PM, Biggs JC. 1997. Haemopoietic stem cell transplantation for autoimmune diseases. *British Journal of Haematology* **99**: 9-22.
- Stadtfield M, Maherali N, Breault DT, Hochedlinger K. 2008. Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse. *Cell Stem Cell* **2**: 230-240.
- Stewart CL, Gadi I, Bhatt H. 1994. Stem cells from primordial germ cells can reenter the germ line. *Developmental Biology* **161**: 626-628.
- Takahashi K, Yamanaka S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**: 663-676.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**: 1145-1147.
- Tropepe V, Coles BLK, Chiasson BJ, Horsford DJ, Elia AJ, McInnes RR, Kooy D. 2000. Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science* **287**: 2032-2036.
- Vita Huset 2009. Removing barriers to responsible scientific research involving human stem cells. WWW-dokument: [http://www.whitehouse.gov/the\\_press\\_office/Removing-Barriers-to-Responsible-Scientific-Research-Involving-Human-Stem-Cells/](http://www.whitehouse.gov/the_press_office/Removing-Barriers-to-Responsible-Scientific-Research-Involving-Human-Stem-Cells/). Hämtad 2012-02-04.
- Wernig M, Meissner A, Foreman R, Brambrink T, Ku M, Hochedlinger K, Bernstein BE, Jaenisch R. 2007. *In vitro* reprogramming of fibroblast into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* **448**: 318-324.
- 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 Sciences of the United States of America* **105**: 5856-5861.
- Wiedemann PM, Simon J, Schick Tanz S, Tannert C. 2005. The future of stem-cell research in Germany. *EMBO reports* **5**: 927-931.
- Wilmut I, Schnieke AE, Kind AJ, Campbell KHS. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* **385**: 810-813.

- Wright NA. 2000. Epithelial stem cell repertoire in the gut: clues to the origin of cell lineages, proliferative units and cancer. *International Journal of Experimental Pathology* **81**: 117-143.
- Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourger J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Routti V, Stewart R *et al.*. 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* **318**: 1917-1920.
- Zulewski H, Abraham EJ, Gerlach MJ, Daniel PB, Moritz W, Müller B, Vallejo M, Thomas MK, Habener JF. 2001. Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes. *Diabetes* **50**: 521-533.