

## INDUKOWANE KOMÓRKI PLURIPOTENTNE – NADZIEJE, OBAWY I PERSPEKTYWY\*

INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS –  
HOPES, FEARS AND VISIONS

Karolina ARCHACKA, Iwona GRABOWSKA, Maria A. CIEMERYCH

Zakład Cytologii, Instytut Zoologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

*Streszczenie:* W 2006 roku opublikowano wyniki doświadczeń, w których po raz pierwszy przekształcono komórkę somatyczną – fibroblast w komórkę pluripotentną, czyli taką, z której mogą powstać wszystkie tkanki budujące zarodek. Historia badań, które poprzedziły ten spektakularny sukces, jest długa i obejmuje zarówno prace, które doprowadziły do opracowania technik klonowania zwierząt, jak i takie, dzięki którym możliwe było uzyskanie zarodkowych komórek macierzystych. Niniejsza praca przedstawia historię badań poprzedzających erę indukowanych komórek pluripotentnych, jak również opisuje pionierskie doświadczenia, które doprowadziły do ich uzyskania, stosowane obecnie metody reprogramowania oraz perspektywy wykorzystania tych komórek.

*Słowa kluczowe:* komórki ES, komórki iPS, pluripotencja, Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, różnicowanie.

*Summary:* In 2006 first paper describing reprogramming of fibroblast into pluripotent cell, i.e. one that is able to differentiate into all tissues was published. Before that spectacular achievement many projects devoted to study the mechanisms of cell de-differentiation led to the establishment of animal cloning techniques and also derivation of embryonic stem cell lines. Present review summarizes the history of these studies and also describes pioneer works leading to derivation of induced pluripotent stem cells, current methods of reprogramming, and possible applications of these cells.

*Key words:* ES cells, iPS cells, pluripotency, Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, differentiation.

### WSTĘP

Zachodzące podczas rozwoju zarodkowego procesy różnicowania komórek prowadzą do powstania tak różnych tkanek, jak: nabłonkowa, łączna, nerwowa czy mięśniowa. Ponieważ prawidłowy przebieg różnicowania gwarantuje powstanie nie

\*Artykuł powstał podczas realizacji projektów badawczych finansowanych ze środków na naukę MNiSW nr: N301 4051 33 i N303 3081 33.

tylko funkcjonalnych tkanek, ale także zbudowanych z nich narządów, poznanie mechanizmów regulujących ten proces jest istotne zarówno dla zrozumienia prawidłowego rozwoju, jak i patologii, które mogą mu towarzyszyć. Równocześnie z badaniami poświęconymi różnicowaniu komórek prowadzone były i są takie, których celem jest stwierdzenie, czy proces różnicowania jest nieodwracalny, czy też można zmienić los zróżnicowanej komórki i przekształcić ją w komórkę niezróżnicowaną? Jeżeli tak, to jakie warunki muszą zostać spełnione, aby było to możliwe? Istotne jest również znalezienie odpowiedzi na pytanie, jakie cechy będą charakteryzowały te reprogramowane komórki. Czy będą one podobne do komórek obecnych w zarodku na bardzo wczesnych stadiach rozwoju lub też do zarodkowych komórek macierzystych, a więc czy będą pluripotenne?

Poszukiwania odpowiedzi na powyższe pytania zainicjowane zostały w latach 50. ubiegłego stulecia badaniami, w wyniku których opracowano techniki klonowania zwierząt. Ukoronowaniem tych poszukiwań okazały się natomiast doświadczenia, które doprowadziły do przekształcania komórek zróżnicowanych, takich jak: fibroblasty, komórki nabłonkowe czy hepatocyty w komórki niezróżnicowane, pluripotenne – a więc takie, z których mogą powstać wszystkie tkanki budujące organizm.

## KRÓTKA HISTORIA REPROGRAMOWANIA KOMÓREK

Fundamentalne znaczenie dla prac poświęconych reprogramowaniu komórek zróżnicowanych miały doświadczenia, które doprowadziły do opracowania metod klonowania zwierząt. W 1952 roku Briggs i King przeprowadzili doświadczenie polegające na wprowadzeniu do pozbawionego chromosomów oocyty żaby *Rana pipiens* jądra komórki pochodzącej z zarodka w stadium blastuli. W efekcie udało się uzyskać normalnie rozwijające się zarodki, a z nich kijanki. W latach 60. Marie di Berardino i Thomas King oraz John Gurdon<sup>1</sup> przeprowadzili podobne doświadczenia – do oocytów żaby transplantowali jądra pochodzące z różnicujących lub w pełni zróżnicowanych komórek. Także wtedy uzyskano normalnie rozwijające się płazy [7]. Próbę odpowiedzi na pytanie, czy w podobny sposób można „odróżnicować” (reprogramować) jądra ssaczych komórek somatycznych podjął w latach 80. i 90. XX wieku również polski zespół kierowany przez pracującego na Uniwersytecie Warszawskim Andrzeja K. Tarkowskiego. Doświadczenia, które polegały na zastąpieniu materiału genetycznego oocyty myszy jądrem komórki somatycznej – limfocyty, nie doprowadziły co prawda do sklonowania myszy, dostarczyły jednak wielu istotnych informacji na temat zmian, jakim podlegają jądra komórek somatycznych „wystawione” na działanie cytoplazmy oocyty [79]. Klonowanie ssaków stało się faktem w 1996 roku, kiedy w szkockim Instytucie Roślin przysłała na świat

<sup>1</sup>W 2009 roku John Gurdon oraz „twórca” indukowanych komórek pluripotentnych Shinya Yamanaka za swoje prace dotyczące reprogramowania komórek somatycznych zostali uhonorowani prestiżową nagrodą – *Albert Lasker Basic Medical Research Award*.

owca Dolly. Została ona „stworzona” przez Iana Wilmuta i jego współpracowników, którzy jądro komórki pochodzącej z gruczołu mlekowego owcy wprowadzili do oocytu. Oocyt został następnie aktywowany do rozwoju, a powstały zarodek przeszczepiony do dróg rodnych owcy, matki zastępczej. Wkrótce w laboratorium Ryuzo Yanagimachi'ego do oocytu myszy transplantowano jądro komórki folikularnej i w efekcie uzyskano pierwszą sklonowaną mysz [86]. Przeszczepiając więc jądro komórki somatycznej do oocytu i ekspozując je na działanie zawartych w jego cytoplazmie czynników sprawiono, że „odzyskiwało” ono cechy umożliwiające mu pełną kontrolę rozwoju zarodkowego. Przełamano więc dogmat, że różnicowaniu towarzyszy nieodwracalna determinacja losów komórki, a zmiany zachodzące w jądrze komórkowym są ostateczne.

Równocześnie z doświadczeniami, które doprowadziły do reprogramowania jąder komórek zróżnicowanych i sklonowania ssaka, prowadzono badania, w wyniku których uzyskano pierwsze linie komórek pluripotentnych. W 1981 roku Martin Evans i Matthew Kaufman oraz niezależnie od nich Gail Martin uzyskali z mysich zarodków (blastocyst) zdolne do samoodnawiania się w hodowli *in vitro*, niezróżnicowane, pluripotentne, a więc zdolne do tworzenia wszystkich tkanek zarodkowe komórki macierzyste – ES (ang. *Embryonic Stem*). W 1998 roku komórki takie uzyskano także z zarodków ludzkich (zobacz prace: Witkowska i wsp. w tym numerze PBK str. 23 oraz [6]). Fakt, że komórki te mogły zarówno *in vivo*, po wprowadzeniu do rozwijającego się zarodka, jak i *in vitro*, pod wpływem odpowiednich czynników, różnicować we wszystkie znane tkanki, obudził wielkie nadzieje na ich wykorzystanie w medycynie regeneracyjnej. Nadziejom tym towarzyszyły jednak opory natury etycznej – uzyskiwaniu linii zarodkowych komórek macierzystych towarzyszy zniszczenie zarodka. Z tego właśnie powodu poszukiwano innych niż zarodkowe źródeł pluripotentnych komórek.

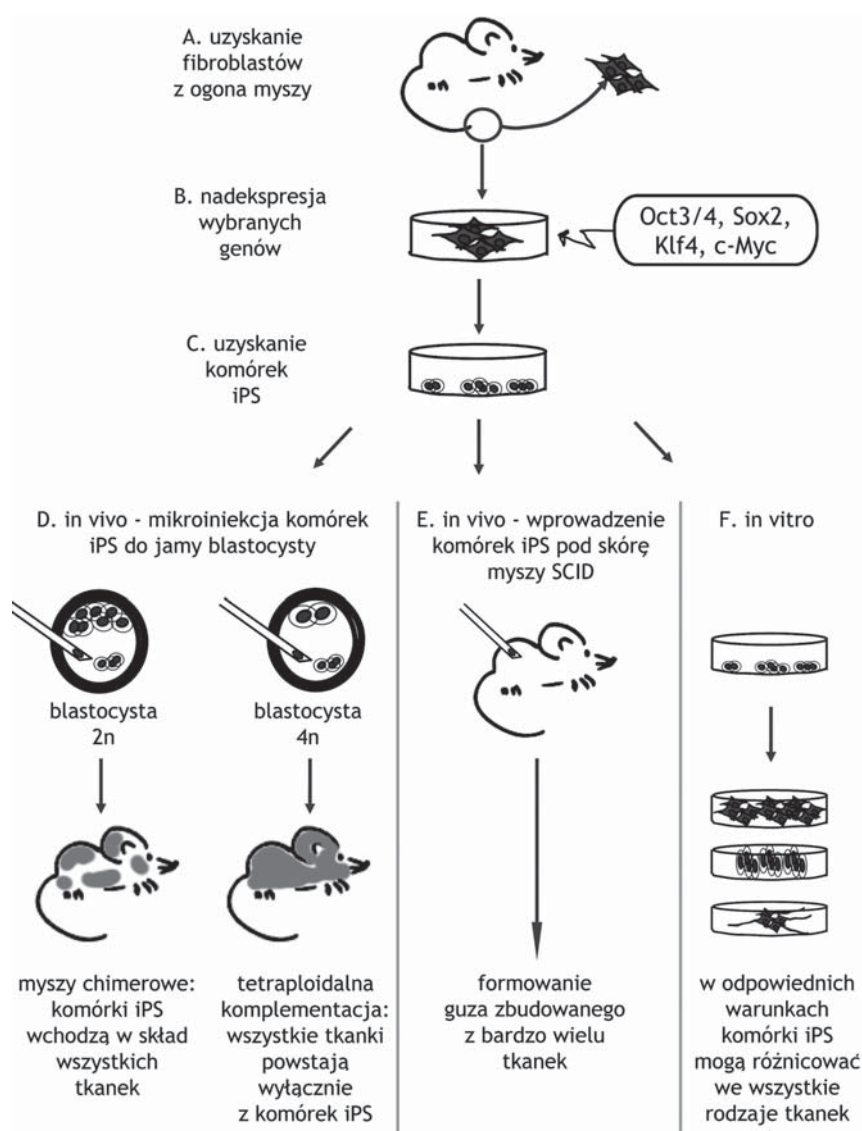
Opublikowana w 2006 roku praca Takahashi'ego i Yamanaki opisywała doświadczenie, które było ukoronowaniem zarówno badań dotyczących reprogramowania komórek, jak i tych, które doprowadziły do uzyskania komórek ES. Udało się bowiem zmusić komórkę somatyczną, fibroblast, do „przekształcenia” się w komórkę pluripotentną, będącą odpowiednikiem zarodkowej komórki macierzystej [78]. Tym razem reprogramowanie odbyło się inaczej niż podczas klonowania zwierząt – a więc bez udziału czynników zawartych w cytoplazmie oocytu. Wymagało natomiast zaindukowania w fibroblacie ekspresji genów, których aktywność jest niezbędna dla zachowania pluripotencji zarówno przez komórki budujące przedimplantacyjny zarodek ssaka, jak i przez komórki ES. Fibroblasty infekowano wirusami kodującymi dwa markery pluripotencji – Oct3/4 i Sox2, a także Klf4, odpowiedzialny za indukcję ekspresji kluczowego dla komórek ES czynnika Nanog oraz onkogen c-Myc, którego aktywność miała zapewnić intensywne podziały zainfekowanych komórek [78]. Nadekspresja tych czterech genów spowodowała, że fibroblasty zaczęły morfologicznie i funkcjonalnie przypominać komórki ES, a więc z rosnących w monowarstwie wydłużonych komórek stały się komórkami o zaokrąglonym kształcie, rosnącymi w zwartych, owalnych koloniach. Określono je mianem indukowanych

komórek pluripotencyjnych – iPS (ang. *induced Pluripotent Stem*). Wkrótce komórki iPS uzyskano także w innych laboratoriach [51, 57, 61, 89] i wykazano, że reprogramować można nie tylko mysie, ale także ludzkie fibroblasty [48, 67, 77, 95].

Pluripotencję zarówno mysich, jak i ludzkich komórek iPS weryfikowano wykorzystując metody klasycznie stosowane podczas testowania komórek ES (ryc. 1). Najważniejszą z nich, możliwą jednak do przeprowadzenia jedynie w przypadku komórek zwierzęcych, jest uzyskiwanie zwierząt chimerowych. Metoda ta polega na mikrochirurgicznym wprowadzeniu badanych komórek do 3,5-dniowych zarodków myszy – blastocyst, które zbudowane są z zewnętrznej warstwy nabłonkowych komórek – trofektodermi – oraz zlokalizowanego na jednym z biegunów zarodka węzła zarodkowego (ryc. 1). Z trofektodermi powstaną m.in. błony płodowe, natomiast węzeł zarodkowy będzie stanowił „materiał” na ciało rozwijającego się zarodka. Centrum blastocysty zajmuje jamka, do której mikrochirurgicznie wprowadza się testowane komórki. Jeżeli są one w stanie zasiedlać węzeł zarodkowy i wchodzić w skład wszystkich tkanek rozwijającego się organizmu, można uznać, że są one pluripotencyjne. Istotne jest również, aby powstawały z nich komórki rozrodcze, dzięki czemu na świat będą mogły przyjść zwierzęta zbudowane z tkanek wywodzących się wyłącznie z analizowanych komórek. Przeprowadzone przez Takahashi'ego i Yamanakę badania wykazały, że uzyskane przez nich komórki iPS co prawda brały udział w powstawaniu ciała zarodka, jednak zarodki te obumierały *in utero* [78]. Dalsze analizy wykazały, że pierwsze komórki iPS nie były w pełni reprogramowane, dlatego określono je jako pre-iPS (patrz ryc. 3), a co za tym idzie, były niezdolne do utworzenia prawidłowo rozwijającego się organizmu. Jednak już kolejne prace przyniosły informacje o uzyskaniu prawidłowo rozwijających się chimerowych zarodków, a z nich płodnych chimerowych myszy [57, 61, 89].

Modyfikacją techniki uzyskiwania zwierząt chimerowych jest technika tzw. tetraploidalnej komplementacji. Umożliwia ona otrzymanie zarodka myszy, którego ciało zbudowane jest wyłącznie z testowanych komórek. Jeżeli są to komórki pluripotencyjne, na świat może przyjść normalna, płodna mysz. Pierwszym etapem takiego doświadczenia jest wywołana impulsami prądu elektrycznego fuzja blastomerów (komórek) dwublastomerowego zarodka myszy. W wyniku tego zabiegu powstaje blastomer tetraploidalny (4n), z którego w drodze kolejnych podziałów bruzdkowania rozwinię się tetraploidalna blastocysta. Wiadomo, że komórki tetraploidalne nie są w stanie wchodzić w skład tkanek budujących ciało zarodka. Mogą z nich powstać jedynie struktury pozazarodkowe – błony płodowe. Wprowadzenie pluripotencyjnych komórek do jamy tetraploidalnej blastocysty spowoduje, że powstający zarodek będzie zbudowany wyłącznie z przeszczepionych komórek (ryc. 1). Pierwsze

FIGURE 1. Derivation and verification of mouse iPS cells: Fibroblast isolated from tail tips (A) are infected with viruses encoding Oct3/4, Sox2, Klf4 and c-Myc (B), and reprogrammed into iPS cells (C). Testing of the pluripotency and developmental abilities of iPS cells involves: production of mouse chimeras via microinjection of iPS cells into cavity of normal, diploid blastocyst or non-chimeric animal via microinjection of iPS cells into cavity of tetraploid blastocyst (D); transplantation of iPS cells under the skin of immunodeficient nude or SCID mice leading to the teratoma development (E); *in vitro* differentiation of iPS cells (F)



RYCINA 1. Uzyskiwanie mysich komórek iPS oraz metody ich testowania: A. Fibroblasty izolowane są najczęściej z ogona myszy; B. Hodowane *in vitro* komórki są infekowane wirusami kodującymi Oct3/4, Sox2, Klf4 oraz c-Myc; C. W wyniku reprogramowania z fibroblastów w hodowli powstają kolonie komórek iPS. D. Sposoby testowania pluripotencji komórek iPS. Komórki iPS mikrochirurgicznie wprowadzone do jamy blastocysty wchodzi w skład wężła zarodkowego, a następnie biorą udział w formowaniu wszystkich tkanek i narządów. Jeżeli testowane komórki pochodzą od myszy różniących się kolorem sierści od myszy dawczyń blastocyst, to widocznym przejawem chimeryzmu będzie pigmentacja sierści. Komórki iPS można też wprowadzić do jamy tetraploidalnej blastocysty, komórki 4n mogą tworzyć wyłącznie tkanki pozazarodkowe, więc ciało rozwijającego się zarodka powstanie wyłącznie z komórek iPS; E. Transplantacja komórek iPS pod skórę myszy *nude* lub SCID prowadzi do rozwoju guza zbudowanego z tkanek pochodzenia ekto-, endo- i mezodermalnego; F. Hodowane *in vitro* komórki iPS można różnicować w różne rodzaje tkanek zależnie od warunków hodowli, zastosowanego podłoża, czynników wzrostu

próby eksperymentalnego uzyskania zwierząt zbudowanych wyłącznie z komórek iPS podjęto już w 2007 roku [89]. Zakończyły się one jednak niepowodzeniem, gdyż zarodki nie były w stanie rozwijać się do końca ciąży. Dopiero w 2009 roku stosując opisaną powyżej metodę wykazano, że z komórek iPS można uzyskać żywe i płodne myszy „jednoetapowo”, a więc z pominięciem tworzenia organizmów chimerowych [2, 29, 98].

Testom polegającym na uzyskiwaniu organizmów chimerowych lub zbudowanych wyłącznie z komórek iPS można poddać komórki zwierzęce, np. mysie, szczurze. Potencjał komórek ludzkich, ale także zwierzęcych, można analizować wprowadzając je pod skórę nieodrzucających przeszczepów myszy *nude* lub SCID (ang. *Severe Combined Immunodeficiency*) (ryc. 1). W takich warunkach komórki pluripotenne (np. komórki ES) formują zbudowane z tkanek pochodzenia ekto-, endo- i mezodermalnego guzy – potworniaki, określane także jako teratomy (gr. *teratos* – potwór). Zarówno mysie, jak i ludzkie komórki iPS z powodzeniem formowały potworniaki [48, 57, 61, 67, 77, 78, 89, 95].

Oprócz opisanych powyżej testów *in vivo*, komórki iPS poddawano, stosując zdefiniowane uprzednio dla komórek ES warunki hodowli, różnicowaniu *in vitro* (ryc. 1). Hodowane *in vitro* komórki ES zdolne są do różnicowania w wiele rodzajów komórek. Mogą także formować tzw. kule zarodkowe, zbudowane z ekto-, endo- i mezodermy, których powstawanie odzwierciedla zjawiska zachodzące w rozwijającym się zarodku. Także komórki iPS z powodzeniem tworzą kule zarodkowe i różnicują w komórki wywodzące się trzech listków zarodkowych (np. [48, 55, 56, 77, 78]). Przeprowadzając więc testy *in vivo* i *in vitro* otrzymano niezbite dowody na to, że komórki iPS są pluripotenne.

Oprócz doświadczeń wykazujących, że komórki iPS można uzyskać z mysich i ludzkich fibroblastów (zarówno zarodkowych, jak i izolowanych od dorosłych osobników) przeprowadzono badania wykazujące, że reprogramowaniu mogą ulec także inne komórki, np. hematopoetyczne komórki macierzyste [10], izolowane ze szpiku komórki jednojądrzaste [36], komórki płodowej wątroby [76], komórki izolowane z płynu owodniowego [41], komórki krwi obwodowej CD34+ [93], komórki krwi pępowinowej (np. [16, 93]), dojrzałe limfocyty B [18], keratynocyty [50], neuronalne komórki macierzyste (np. [34]), komórki  $\beta$  trzustki [75] czy hepatocyty [1, 76]. Komórki iPS uzyskano także z komórek somatycznych gatunków innych niż mysz i człowiek, np. z komórek szczura [43, 44], rezusa [46], świni [13] czy miniaturowej świni rasy tybetańskiej [12]. Z dużym prawdopodobieństwem można więc sądzić, że w przyszłości komórki iPS będzie można uzyskiwać z wielu, jeśli nie wszystkich rodzajów tkanek różnych gatunków zwierząt. Dzięki temu możliwe będzie prowadzenie różnego rodzaju badań poświęconych między innymi mechanizmom różnicowania komórek. Jednak największe emocje budzi uzyskiwanie ludzkich komórek iPS oraz ich wykorzystanie w medycynie regeneracyjnej. Zanim jednak okaże się to możliwe, konieczne będzie rozwiązanie kilku problemów „technologii iPS”.



## POSZUKIWANIE IDEALNEJ METODY UZYSKIWANIA KOMÓREK iPS

Pionierskie doświadczenia przeprowadzone przez Takahashi'ego i Yamanakę doprowadziły do uzyskania komórek iPS [78]. Proces reprogramowania fibroblastów trwał jednak aż trzy tygodnie i charakteryzował się niską wydajnością (0,01–0,1%) [78]. Także reprogramowanie innych typów komórek mysich okazało się mało skuteczne. Jeszcze niższą wydajnością reprogramowania, bo jedynie około 0,001%, charakteryzowało się uzyskiwanie ludzkich komórek iPS [66, 77]. Wydajna „produkcja” tych komórek jest więc jednym z głównych problemów, które muszą zostać rozwiązane, aby ich wykorzystanie w medycynie nie pozostało jedynie marzeniem. Kolejny problem stanowią stosowane do wprowadzenia reprogramujących genów wektory wirusowe. Obecnie wiadomo, że konieczne jest ich zastąpienie przez „bezpieczniejsze” wektory, na przykład takie, które umożliwiałyby ekspresję wnoszonych przez nie do komórki genów bez konieczności wbudowania ich do jej genomu. Istotne jest także opracowanie metody uzyskiwania komórek iPS, która nie wymagałaby wprowadzania do komórek potencjalnie groźnych czynników, takich jak protoonkogen c-Myc, którego niekontrolowana ekspresja może doprowadzić do rozwoju nowotworów. W jaki sposób rozwiązuje się te problemy?

Retrowirusy i podobne do nich lentiwirusy stanowią bardzo dobre narzędzie umożliwiające wprowadzanie genów kodujących różne czynniki do komórki. Początkowo były one powszechnie stosowane przez wiele zespołów uzyskujących komórki iPS [4, 51, 78, 89, 95]. Ekspresja transgenów kodowanych przez wirusy możliwa jest jednak tylko po ich wbudowaniu do genomu zainfekowanej komórki, a to może stać się przyczyną nieprawidłowego funkcjonowania genów zlokalizowanych w miejscu integracji. Mimo iż wykazano, że w komórkach iPS modyfikacje epigenetyczne, polegające na metylacji sekwencji wirusowych i transgenów, prowadzą do stopniowego wyciszenia ekspresji wprowadzonych czynników [51, 61, 89], to nie można wykluczyć ich spontanicznej reaktywacji, np. pod wpływem bodźców zewnętrznych. Może to doprowadzić do rozwoju nowotworów, co zaobserwowano między innymi u pacjentów, u których podjęto próbę terapii genowej z wykorzystaniem retrowirusów [25]. Dlatego konieczne stało się opracowanie metody uzyskiwania komórek iPS wykorzystującej „bezpieczniejsze” wektory. Pierwszym krokiem w tym kierunku było otrzymanie mysich i ludzkich komórek iPS w wyniku zastosowania adenowirusów i plazmidów kodujących reprogramujące czynniki [17, 62, 76, 94]. Oba rodzaje wektorów są w stanie pozostać w komórce przez kilka pierwszych cykli komórkowych, umożliwiając tym samym przejściową ekspresję kodowanych przez nie czynników, bez ich integracji do genomu. Niestety, w porównaniu z metodą wykorzystującą wektory integrujące do genomu, wydajność uzyskiwania komórek iPS z zastosowaniem tej metody była znacząco niższa. Efekt ten był prawdopodobnie skutkiem zbyt krótkiej ekspresji wprowadzanych genów, a w konsekwencji zbyt niskiego poziomu reprogramujących białek. Wiadomo bowiem, że reprogramowanie, zwłaszcza komórek ludzkich, wymaga stosunkowo „długiej” aktywności wprowadza-

nych czynników. Określenie minimalnego, niezbędnego do przekształcenia komórki czasu ekspozycji na czynniki reprogramujące było możliwe dzięki używaniu takich wektorów, w których ekspresja transgenów kontrolowana była przez promotory przejściowo indukowane odpowiednimi antybiotykami (np. doksycykliną). Tak więc dane białko syntetyzowane było jedynie wtedy, gdy w pożywce hodowlanej obecny był antybiotyk. Pozwoliło to ustalić, że komórki mysie były zdolne do przekształcenia w komórki iPS po 10 dniach ekspresji wprowadzonych czynników, natomiast komórki ludzkie najwcześniej po 14 dniach [4, 23, 50, 76, 87]. Doświadczenia, w których wykorzystano tzw. wektory episomalne, czyli nieintegrujące do genomu, wykazały, że wbrew wcześniejszym przypuszczeniom włączenie transgenów do genomu komórki nie jest konieczne do jej reprogramowania [62, 76, 94]. Było to zgodne z wynikami badań wykazującymi, że miejsca integracji wirusów do genomu komórki są przypadkowe i indukcja przekształcenia komórki somatycznej w komórkę iPS nie zależy od lokalizacji wprowadzonych genów [1, 84].

Kolejną strategią mającą zminimalizować ryzyko powstania mutacji genomowych w komórce było wykorzystanie metody umożliwiającej usunięcie wprowadzonych genów już po zaindukowaniu reprogramowania komórki. W tym celu zastosowano technikę polegającą na otoczeniu transgenów sekwencjami loxP. Sekwencje te są rozpoznawane przez bakteryjną rekombinazę Cre, dzięki czemu otoczony nimi fragment DNA może zostać usunięty. Fakt ten został z sukcesem wykorzystany podczas uzyskiwania „wolnych” od transgenów komórek iPS [28, 74]. Duże nadzieje na wykorzystanie w „technologii iPS” wiąże się z ruchomymi elementami genetycznymi określanymi jako piggyBac. Są to transpozony zdolne do przenoszenia fragmentów DNA o wielkości sięgającej nawet 10 tysięcy par zasad. Integracja piggyBac z genomem komórki możliwa jest dzięki aktywności transpozazy. Ten enzym nie tylko wprowadza sekwencję do genomu, ale odpowiada także za późniejsze usunięcie transpozonu i przywrócenie miejsc jego integracji do „oryginalnego” stanu. „System” piggyBac został z sukcesem wykorzystany podczas uzyskiwania zarówno mysich, jak i ludzkich komórek iPS. Co ciekawe, reprogramowanie zaindukowane genami wprowadzonymi z wykorzystaniem piggyBac zachodziło z relatywnie wysoką, wynoszącą 1% wydajnością [28, 91, 96]. Zaletą tej metody jest także jej uniwersalność. Transpozony mogą być wprowadzane do wszystkich typów komórek, także tych dzielących się oraz do komórek ES [37]. W 2009 roku ukazały się dwie prace, których Autorzy podjęli próbę uzyskania komórek iPS nie tylko bez udziału wektorów integrujących do genomu, ale też bez udziału jakichkolwiek wektorów. Doświadczenia te polegały na wykorzystaniu białek, a nie jak to było dotychczas – kodujących je sekwencji DNA [32, 100]. Jednak metoda ta okazała się na tyle niedoskonała, że wymagała kilkukrotnego powtarzania procedury wprowadzania białek do komórki. Wiązało się to także z wydłużeniem czasu reprogramowania. Pomimo niedoskonałości technika ta ma jednak szansę po „dopracowaniu” stać się bezpiecznym sposobem uzyskiwania komórek iPS.

Doskonalenie technik wprowadzania reprogramujących genów do komórki polega także na ograniczaniu liczby wykorzystywanych genów lub/i zastąpieniu ich przez



substancje bezpieczne dla komórki i organizmu. „Najgroźniejszym” z czynników używanych do reprogramowania komórek jest onkogen *c-Myc*. Jego obecność i niekontrolowana aktywność prowadziła do rozwoju nowotworów [53, 61]. Co prawda wydajność uzyskiwania komórek iPS z fibroblastów po zastosowaniu „koktajlu” genów *Oct3/4*, *Sox2* i *Klf4*, z pominięciem *c-Myc*, była niższa niż po zastosowaniu wszystkich czterech transgenów, jednak u żadnej z myszy chimerowych, których tkanki powstały z takich komórek iPS, nie stwierdzono rozwoju nowotworów [59, 88]. Choć obecność *c-Myc* wydaje się stanowić największe zagrożenie dla prawidłowego funkcjonowania komórek, niekontrolowana ekspresja pozostałych transgenów także może mieć poważne skutki uboczne. Wiadomo, że ektopowa ekspresja *Oct3/4* związana jest z rozwojem dysplazji nabłonka [21], zaś ekspresja *Klf4* może prowadzić do transformacji nowotworowej komórek tej tkanki [69]. Ponadto, niekontrolowane „uruchomienie” ekspresji transgenów w komórkach iPS może zaburzać wyniki wielu badań, np. mających na celu określenie wpływu różnych farmaceutyków na te komórki.

Jedną z dróg prowadzących do opracowania bezpiecznych metod uzyskiwania komórek iPS może polegać na wykorzystaniu komórek, które wykazują endogenną ekspresję dotychczas stosowanych czynników. Przykładem mogą być neuronalne komórki macierzyste i progenitorowe, które syntetyzują białko Sox2, dzięki czemu ich przekształcenie w komórki iPS nie wymaga udziału tego czynnika (np. [11, 33, 34, 73]). W tym przypadku wydajność uzyskiwania iPS jest wyższa, niż gdy stosowany jest klasyczny zestaw genów. Sugeruje to, że zbyt wysoki poziom Sox2 może ograniczać proces reprogramowania [11, 73]. Neuronalne komórki macierzyste mogą również zostać przekształcone w komórki iPS za pomocą tylko dwóch czynników (*Oct3/4* i *Klf4* lub *Oct3/4* i *c-Myc*), a nawet tylko jednego (*Oct3/4*), choć wydajność tego procesu jest wtedy bardzo niska [33, 34, 72, 73]. Należy jednak pamiętać, że neuronalne komórki charakteryzuje zdolność do proliferacji oraz że oprócz Sox2 syntetyzują one także czynnik podobny do *c-Myc* – *N-Myc*. Wyniki tych i innych badań wskazują także, że o ile podczas reprogramowania komórek somatycznych geny *c-Myc*, *Sox2* i *Klf4* mogą zostać pominięte lub zastąpione przez inne czynniki, to obecność *Oct3/4* jest konieczna. Dotychczas nie zidentyfikowano żadnego wymiennika *Oct3/4*. Stosowano natomiast biologiczne lub chemiczne odpowiedniki pozostałych czynników reprogramujących (*c-Myc* – *Wnt3a*, *LIN28*; *Sox2* – *RepSox2*<sup>®</sup>; *Klf4* – *RepKlf4*<sup>®</sup>, *Esrrb*, *kenpaullon*, *Nanog*) [15, 27, 49, 54, 95]. Niektórzy badacze twierdzą także, że w cytoplazmie fibroblastów zgromadzony jest mRNA kodujący *Oct3/4*, *Sox2* i *Nanog* oraz że odpowiednio manipulując warunkami hodowli można będzie doprowadzić do translacji tych czynników [64]. Bez wątpliwości identyfikacja substancji chemicznych, które byłyby w stanie uaktywnić endogenną ekspresję wszystkich niezbędnych do reprogramowania czynników, będzie stanowiła kluczowy moment w pracach nad doskonaleniem technik uzyskiwania komórek iPS.

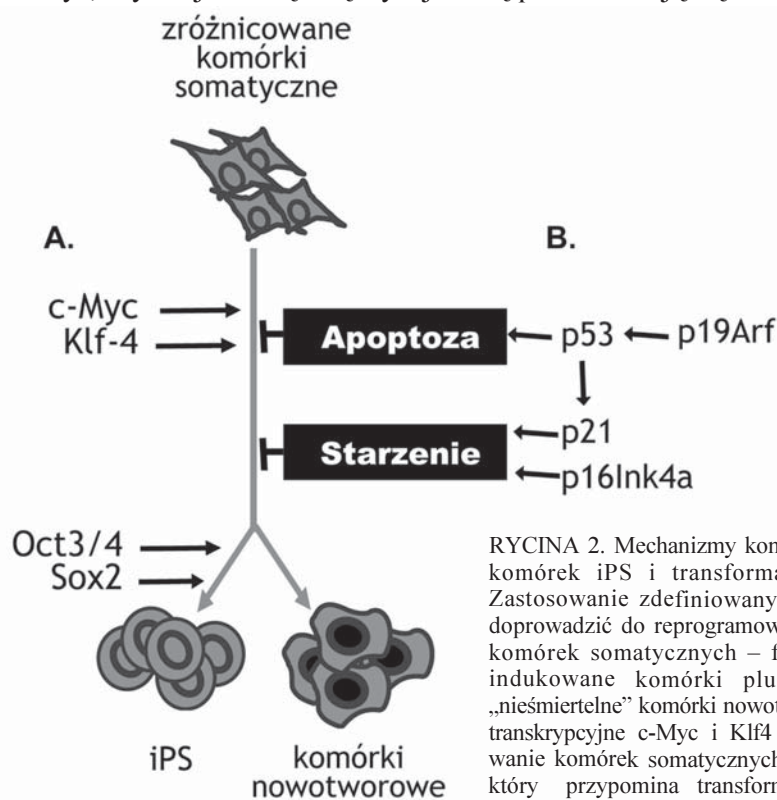
Wydajność uzyskiwania komórek iPS można również zwiększyć wykorzystując stosowane podczas uzyskiwania zarodkowych komórek macierzystych inhibitory

szlaków przekazywania sygnałów zaangażowanych w różnicowanie tych komórek. Wydajność reprogramowania ludzkich i mysich neuronalnych komórek macierzystych i progenitorowych była wyższa, gdy stosowano inhibitory kinaz MEK (ang. *MAP/ERK Kinase*), GSK3 (ang. *Glycogen Synthase Kinase 3*) oraz metylotransferazy histonów G9a [72, 73]. Zastosowanie inhibitorów MEK i GSK3 oraz TGF $\beta$  (ang. *Transforming Growth Factor  $\beta$* ) umożliwiło uzyskanie szczurzych komórek iPS [43]. Obecność tych substancji w pożywce hodowlanej ułatwia przekształcenie komórek pre-iPS w ostatecznie reprogramowane komórki iPS [72, 73]. Etap ten wydaje się kluczowy dla reprogramowania, podczas którego w komórce musi dojść do wyciszenia ekspresji genów typowych dla komórek zróżnicowanych i indukcji ekspresji genów warunkujących pluripotencję. Odpowiada za to precyzyjnie kontrolowana demetylacja DNA i acetylacja histonów [58]. W większości komórek procesy te nie przebiegają prawidłowo i dlatego zostają one zablokowane na stadium pre-iPS. Z tą teorią zgodne są wyniki doświadczeń, w których tempo i wydajność reprogramowania komórek znacząco (nawet stukrotnie) zwiększono stosując związki wpływające na stan metylacji chromatyny lub modyfikacji histonów, takie jak: 5-azacytydina, kwas walproinowy czy trichostatyna [26, 57, 58, 72]. Podobne wyniki uzyskano doprowadzając jednocześnie do nadekspresji UTF1 (ang. *Undifferentiated Transcription Factor 1*) – represora transkrypcji zmieniającego konformację chromatyny na typową dla komórek pluripotencjalnych, i wyciszenia ekspresji p53 [99].

p53 to odkryty 30 lat temu czynnik supresorowy nowotworów. Białko to, które uczestniczy w regulacji cyklu komórkowego, apoptozy oraz starzenia się komórek, okazało się odgrywać istotną rolę w procesie reprogramowania. p53 wpływa negatywnie na ekspresję kluczowego dla zachowania pluripotencji białka Nanog [45] oraz jest odpowiedzialny za syntezę p21 – inhibitora niezbędnych dla prawidłowego przebiegu cyklu komórkowego kinaz CDK (ang. *Cyclin Dependent Kinase*). Ponadto wykazano, że ekspresja p53 podlega kontroli Klf4 [31, 68], który także reguluje ekspresję Nanog [5]. Co niezwykle istotne, wykorzystywany do uzyskiwania komórek iPS onkogen c-Myc powoduje wzrost zarówno poziomu, jak i aktywności p53, a to z kolei prowadzi do zwiększenia syntezy inhibitora p21. Te wzajemne zależności między p53, p21, Klf4, Nanog i c-Myc okazały się być istotne dla procesów towarzyszących reprogramowaniu komórek. Wykazano bowiem, że keratynocyty, które charakteryzuje wyższa wydajność przekształcania w iPS, syntetyzują mniej p53 i p21 w porównaniu z „trudniejszymi” do reprogramowania fibroblastami [31]. Obniżenie poziomu ekspresji p21 [31] oraz p53 [31, 99] zwiększało wydajność uzyskiwania komórek iPS. Także komórki pozbawione obu alleli genu kodującego p53 (p53<sup>-/-</sup>), a więc niesyntetyzujące tego białka, łatwiej ulegały reprogramowaniu [24, 52]. Ponieważ jednak definitywne pozbawienie komórek genu kodującego p53 prowadziło do niestabilności genetycznej [52] i powstawania nowotworów [24], wydaje się, że jedynie przejściowe (np. przez zastosowanie RNAi) zahamowanie syntezy p53 może być rozważane jako metoda poprawiająca wydajność uzyskiwania komórek iPS [83].

Innym genem, którego poziom ekspresji może mieć kluczowe znaczenie dla wydajności uzyskiwania komórek iPS, jest gen *In4a/Arf*. Koduje on dwa białka:

p16<sup>Ink4a</sup> – inhibitor aktywnych w fazie G1 cyklu komórkowego kinaz CDK4/6 oraz białko p19<sup>Arf</sup> – pośrednio wpływające na ekspresję p53. Podczas uzyskiwania komórek iPS obserwuje się wyciszenie aktywności genu *In4a/Arf* [42]. Ponieważ zjawisko to zachodzi na początkowych etapach reprogramowania, wydaje się możliwe, że u jego podłoża leży oddziaływanie czynników indukujących pluripotencję z locus *In4a/Arf* [42, 83]. Komórki charakteryzujące się niższym poziomem lub też wcale niesyntetyzujące p19<sup>Arf</sup>, po zainfekowaniu wirusami kodującymi Oct3/4, Sox2, Klf4 i c-Myc, szybciej i z większą wydajnością przekształcają się w komórki iPS [83].



RYCINA 2. Mechanizmy kontrolujące uzyskiwanie komórek iPS i transformację nowotworową. Zastosowanie zdefiniowanych czynników może doprowadzić do reprogramowania zróżnicowanych komórek somatycznych – fibroblastów albo w indukowane komórki pluripotencjne albo w „nieśmiertelne” komórki nowotworowe: A – czynniki transkrypcyjne c-Myc i Klf4 indukują reprogramowanie komórek somatycznych w iPS w sposób, który przypomina transformację nowotworową. Oct3/4 i Sox2, pomimo że ich ekspresja zachodzi

także w komórkach nowotworowych, uważane są za czynniki specyficznie indukujące powstawanie komórek iPS; B – białko supresorowe nowotworów – p53, którego ekspresja może być indukowana przez p19<sup>Arf</sup>, bezpośrednio lub pośrednio ogranicza zarówno reprogramowanie fibroblastów w komórki iPS, jak i powstawanie komórek nowotworowych [24, 31, 42, 52, 83]. Za pośrednictwem inhibitora kinaz CDK – białka p21 wpływa ono na oba procesy indukując apoptozę lub starzenie się komórek. Inny inhibitor kinaz CDK – p16<sup>Ink4a</sup> także indukują starzenie się komórek. W efekcie upośledza to i proces powstawania komórek iPS i proces transformacji nowotworowej. Locus kodujący zarówno p19<sup>Arf</sup>, jak i p16<sup>Ink4a</sup> ulega wyciszeniu podczas reprogramowania komórek somatycznych w komórki iPS [31, 42, 83] (schemat [35] za zgodą *Nature Publishing Group*)

FIGURE 2. Mechanisms controlling iPS cells generation and cellular transformation. c-Myc and Klf4 play a role in both somatic cells reprogramming and transformation. Oct3/4 and Sox2 are assumed as specifically involved in reprogramming into iPS cells (A). p19Arf induces expression of p53 limiting both cellular reprogramming and transformation. It also, via p21 induces apoptosis and cellular senescence (together with p16Ink4a). Silencing of p19Arf and p16Ink4a loci facilitates generation of iPS cells ([35] copyright Nature Publishing Group)

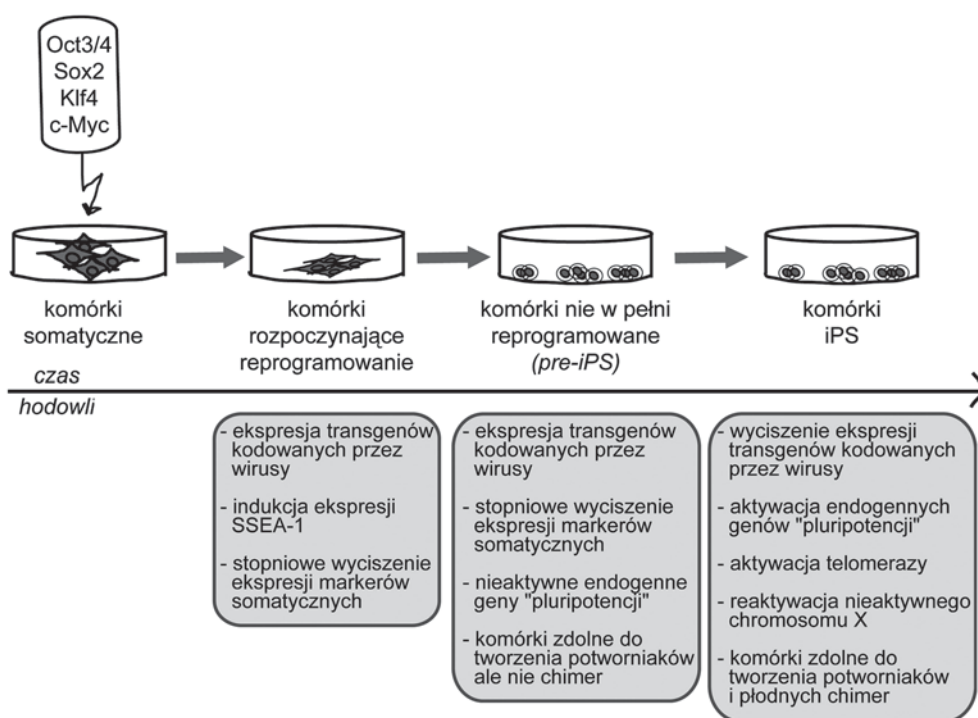
Brak syntezy białek p53 lub/i p16<sup>Ink4a</sup> oraz p19<sup>Arf</sup> ułatwia nie tylko uzyskiwanie komórek iPS, ale w warunkach fizjologicznych może prowadzić do „unieśmiertelnienia” komórki, a więc jej transformacji nowotworowej (ryc. 2) [35]. Tak więc poszukiwanie mechanizmów odpowiedzialnych za efektywne przeprogramowanie komórek somatycznych w komórki pluripotencjne odsłania nieznane dotychczas cechy wspólne komórek macierzystych i nowotworowych.

Przytoczone przykłady wskazują, że komórki iPS można uzyskać stosując różne metody. Bez względu jednak na sposób otrzymywania tych komórek, proces reprogramowania przebiega według podobnego, opisanego w kolejnym podrozdziale, schematu.

## MOLEKULARNE PODŁOŻE REPROGRAMOWANIA

Takahashi i Yamanaka zastosowali do reprogramowania mysich fibroblastów zestaw czterech czynników transkrypcyjnych: Oct3/4, Sox2, Klf4 oraz c-Myc [78]. Upřednio prowadzone badania wykazały, że kluczowy dla utrzymania pluripotencji Oct3/4 homodimeryzuje i także tworzy heterodimery z innymi czynnikami transkrypcyjnymi, m.in. z kolejnym „regulatorem pluripotencji” – Sox2. Pozostałe dwa czynniki transkrypcyjne Klf4 i c-Myc to onkogeny, które nie są niezbędne dla reprogramowania komórek somatycznych w komórki iPS, ale ich nadekspresja zdecydowanie zwiększa wydajność i przyspiesza ten proces.

Pierwsze mysie komórki iPS selekcjonowano na podstawie cech morfologicznych upodabniających je do komórek ES (niewielkie rozmiary, wysoki stosunek jądrowo-cytoplazmatyczny, tworzenie charakterystycznych kolonii *in vitro*) oraz zdolności do aktywacji genu *Fbx15*, kodującego jeden z czynników typowych dla komórek pluripotencyjnych. Z tych komórek iPS nie udało się jednak uzyskać zwierząt chimerowych, tak więc nie „przeszły” one kluczowego testu pluripotencji [78]. Niezdolność do tworzenia chimer wynikała prawdopodobnie z faktu, że w komórkach iPS uzyskanych przez Takahashi'ego i Yamanakę nie zaszła aktywacja ekspresji endogennych genów kodujących Oct3/4 i Nanog. Obserwowane cechy komórek pluripotencyjnych były warunkowane jedynie przez wprowadzone transgeny. Okazało się więc, że komórki te w mniejszym niż oczekiwano stopniu przypominały pluripotencjne zarodkowe komórki macierzyste. Dlatego w kolejnych badaniach selekcje komórek iPS prowadzono na podstawie ekspresji endogenego Oct3/4 lub Nanog [51, 61]. Komórki częściowo reprogramowane, a więc takie, które morfologicznie przypominały komórki ES, ale różniły się potencjałem do tworzenia chimer określono mianem komórek pre-iPS (ryc. 3). W komórkach tych promotory endogennych genów odpowiedzialnych za utrzymanie pluripotencji były tylko częściowo demetylowane i nie w pełni aktywne, natomiast wirusowe geny kodujące Oct3/4, Sox2, Klf4 i c-Myc pozostawały aktywne. Jednocześnie ulegały w nich ekspresji niektóre markery tkankowe, np. charakterystyczny dla tkanki mięśniowej szkieletowej czynnik transkrypcyjny Pax7 czy kluczowy dla prawidłowego funkcjonowania tkanki chrzęstnej czynnik Sox9 [58].



RYCINA 3. Etapy reprogramowania komórek somatycznych w komórki iPS. Wprowadzenie czynników reprogramujących do komórek somatycznych prowadzi do rozpoczęcia ich reprogramowania, czemu towarzyszy stopniowe wyciszenie ekspresji markerów somatycznych i rozpoczęcie ekspresji jednego z czynników charakterystycznych dla komórek ES – białka SSEA-1. W kolejnym etapie ekspresja transgenów prowadzi do aktywacji genów regulujących podziały komórkowe i dalszego wyciszenia genów „specyficznych tkankowo”. Ponieważ ze względu na metylację promotorów endogenne geny pluripotencji pozostają nieaktywne, komórki takie określane są jako „pre-iPS”. Wyciszenie ekspresji transgenów i aktywacja endogennych genów pluripotencji prowadzi do powstania w pełni reprogramowanych komórek określanymi jako iPS (zmodyfikowane wg [20])

FIGURE 3. Stages of reprogramming of somatic cells into iPS cells. Introduction of reprogramming factors initiates silencing of tissue specific genes and induces expression of genes characteristic for pluripotent cells such as SSEA-1 and also encoding crucial cell cycle regulators. Since endogenous pluripotency markers are not expressed yet, such partially reprogrammed cells are termed pre-iPS. Silencing of transgene expression and activation of endogenous pluripotency markers leads to the generation of true iPS cells (modified from [20])

Dotychczas oprócz klasycznego zestawu genów zastosowanych przez Yamanakę i Takahashi'ego, do reprogramowania komórek myszy stosowano także inne zestawy. Wykazano, że z mysich fibroblastów można uzyskać komórki iPS stosując jedynie Oct3/4, Sox2 oraz Klf4 [88]. Jak już wspomniano, inne rodzaje komórek, np. komórki neuronalne reprogramowano jeszcze „uboższymi koktajlami” transgenów. Ludzkie komórki iPS uzyskano stosując te same czynniki – Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc [77], ale także wykorzystując Oct3/4, Sox2 razem z genami Nanog, kodującym czynnik kluczowy dla zachowania pluripotencji i LIN28 – markerem ludzkich komórek ES [95], jak również zestaw Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc równocześnie z kodującym ludzką telomerazę genem *h-TERT* i antygenem T wirusa SV40 [95].



Bez względu na zastosowany zestaw transgenów uzyskanie komórek iPS to proces przebiegający etapowo. Aby mogło dojść do pełnego reprogramowania mysich fibroblastów, geny wprowadzone za pomocą wektorów wirusowych muszą ulegać ekspresji co najmniej przez 12 dni [4]. Oprócz zmian morfologii na typową dla komórek ES dochodzi wtedy do rearanżacji chromatyny, a co za tym idzie znaczących zmian w transkrypcji. Procesowi temu towarzyszą globalne zmiany w metylacji lizyny 4 i 27 histonu H3, demetylacja regionów promotorowych Oct3/4 i Nanog oraz, jeżeli reprogramowane są komórki żeńskie, reaktywacja nieaktywnego w tych komórkach chromosomu X [51, 89]. Przekształcanie komórek somatycznych w komórki iPS wymaga, oprócz indukcji ekspresji czynników pluripotencji, wyciszenia syntezy czynników charakterystycznych dla komórek zróżnicowanych. Wykazano, że w fibroblastach w ciągu 3–5 dni po zaindukowaniu ekspresji transgenów dochodzi do obniżenia ekspresji białek charakterystycznych dla tych komórek – Thy-1 i kolagenu. Co istotne, aktywność genu *c-Myc* wpływa na przyspieszenie tego procesu [59].

Znaczenie zarówno *c-Myc*, jak i onkogenu *Klf4* w reprogramowaniu komórek somatycznych było szeroko dyskutowane. Wydaje się możliwe, że czynniki te indukują procesy analogiczne do tych towarzyszących transformacji nowotworowej komórek somatycznych. W efekcie fibroblasty zyskują zdolność do intensywnych podziałów komórkowych, a tym samym upodabniają się nie tylko do komórek nowotworowych, ale i do komórek ES. *c-Myc* rekrutując acetylotransferazę histonów może powodować modyfikację chromatyny, a to z kolei może ułatwiać reprogramowanie. Brambrink i współpracownicy przeanalizowali zmiany ekspresji markerów pluripotencji w czasie reprogramowania komórek somatycznych [4]. Wykazali, że po 3 dniach od zaindukowania ekspresji transgenów w populacji reprogramowanych komórek indukowana jest synteza alkalicznej fosfatazy, której aktywność charakteryzuje komórki pluripotentne, takie jak komórki ES czy pierwotne komórki płciowe. Około 9 dnia reprogramowania dochodzi do syntezy kolejnego markera komórek pluripotentnych – glikoproteiny powierzchniowej SSEA1 (ang. *Stage-Specific Embryonic Antigen-1*). Ekspresja endogennych genów kodujących Oct3/4 i Nanog była wykrywana dopiero około 16 dnia od wprowadzenia transgenów.

Jak już wspomniano, aktywność egzogennych Oct3/4, Sox2 i Nanog prowadzi do wyciszenia genów kodujących czynniki regulujące różnicowanie komórek oraz „uruchomienia” ekspresji genów charakterystycznych dla komórek pluripotentnych. U podłoża tego mechanizmu leży pośrednia i bezpośrednia rekrutacja białek PcG (Polycomb), które zaangażowane są w wyciszenie ekspresji wielu genów indukujących różnicowanie [89]. Indukcja intensywnych podziałów komórkowych reprogramowanej komórki jest konieczna, aby mogło dojść do zmian w metylacji chromatyny ułatwiających aktywację nieaktywnych dotychczas genów. Przykładowo, utrata aktywności genu *Oct3/4*, która zachodzi w różnicujących podczas rozwoju komórkach zarodkowych, wiąże się z metylacją histonu H3 na lizynie 9 w obszarze promotora tego genu [14]. Z kolei utrata metylacji w tym obszarze i aktywacja endogennego *Oct3/4* towarzyszy reprogramowaniu. Nie tylko zmiany w metylacji histonu H3, ale także metylacja cytozyny wchodzącej w skład tzw. wysp CpG w promotorach genów kodujących inne niż *Oct3/4* markery pluripotencji przyczyniają się do

inaktywacji tych genów. Zniesienie metylacji tych promotorów towarzyszy reprogramowaniu fibroblastów [51, 61, 89]. Ponadto, aktywność promotorów genów kodujących *Oct3/4*, *Sox2* i *Nanog* podlega autoregulacji. Przykładowo, *Oct3/4* może oddziaływać zarówno z promotorem *Oct3/4*, jak i *Sox2* oraz *Nanog* [3, 47]. Zaindukowana przez wprowadzenie transgenów ekspresja endogennych czynników *Oct3/4*, *Sox2* i *Klf4* promuje aktywację kluczowego dla utrzymania pluripotencji genu *Nanog*, dzięki czemu w komórkach iPS ekspresja tego genu utrzymywana jest na poziomie podobnym do obserwowanego w zarodkowych komórkach macierzystych [61, 89].

Komórki utrzymują pluripotencję dzięki zachowaniu równowagi pomiędzy ekspresją określonych genów regulowaną przez skomplikowany układ różnych czynników transkrypcyjnych. Zaburzenie tej równowagi prowadzi do różnicowania komórek. Reprogramowanie komórek polega więc na zniesieniu zróżnicowanego fenotypu komórek poprzez stopniowe „budowanie” w nich sieci oddziaływań charakterystycznych dla komórek niezróżnicowanych i umożliwiających utrzymanie w nich stanu pluripotencji.

## PRZYSZŁOŚĆ KOMÓREK iPS

Uzyskanie indukowanych pluripotentnych komórek otworzyło nowy rozdział w badaniach mających na celu opracowanie nowatorskich metod terapii komórkowych schorzeń degeneracyjnych (np. chorób neurodegeneracyjnych, dystrofii mięśniowych) czy nieodwracalnych uszkodzeń tkanek (np. zawału mięśnia sercowego, urazów rdzenia kręgowego) (praca przeglądowa Kurpisz w tym numerze PBK str 209). Na szybkie tempo badań koncentrujących się na opracowywaniu metod ukierunkowanego różnicowania komórek iPS stymulująco wpłynęła wiedza o sposobach różnicowania mysich i ludzkich komórek ES. Stosując i modyfikując opracowane uprzednio techniki udało się *in vitro* przekształcić komórki iPS w komórki o potencjale hematopoetycznym (np. [40, 70], makrofagi i komórki dendrytyczne [71], syntetyzujące insulinę komórki  $\beta$  trzustki [97], adipocyty [80], komórki śródbłonna i kardiomiocyty (np. [55, 56, 60, 70], neurony [8, 30, 38, 90] czy też komórki siatkówki [63]. Ponieważ komórki iPS, podobnie jak komórki ES, można modyfikować genetycznie [22, 101], w przyszłości dostępne mogą się stać terapie prowadzące do wymiany zmutowanego genu na gen funkcjonujący prawidłowo. Różnicowanie tak „naprawionych” komórek i przeszczepienie ich choremu – dawcy komórek, z których uzyskano iPSy, dawałoby szansę na efektywną terapię. Dotychczas skuteczność tego typu zabiegów wykazano jedynie na modelach zwierzęcych. W ten sposób wyleczone zostały myszy cierpiące na anemię sierpowatą [19] oraz hemofilię typu A [92], udało się także poprawić stan szczurów cierpiących na odpowiednik ludzkiej choroby Parkinsona [90]. Badania te budzą więc wielkie nadzieje na uzyskanie komórek, które mogłyby być przeszczepione choremu bez zagrożenia ich odrzucenia. Oczywiście będzie to możliwe, o ile opracowane zostaną takie metody różnicowania, które zapewnią powstawanie homogennej populacji komórek. Należy bowiem

pamiętać, że wprowadzenie do organizmu chorego niezróżnicowanej, pluripotentnej komórki iPS może doprowadzić do rozwoju potworniaków.

Komórki iPS otwierają też nowe perspektywy w badaniach nad molekularnymi mechanizmami rozwoju chorób o podłożu genetycznym, a co za tym idzie mających na celu opracowanie terapii tych chorób. Dotychczas przeprowadzono wiele doświadczeń, w których analizowano komórki pochodzące od chorych. Zazwyczaj jednak były to komórki unieśmiertelnione, a więc takie, w których doszło do powstania dodatkowych mutacji i które miały charakter komórek nowotworowych, dzięki czemu możliwe było ich utrzymanie w hodowli *in vitro* przez nieograniczony wręcz czas. Alternatywne metody uzyskiwania komórek, które były wykorzystywane w tego typu badaniach, polegały na manipulowaniu ekspresją wybranych genów w komórkach ES albo metodami prowadzącymi do trwałego (przykładowo [82, 102]), albo przejściowego wyciszenia ekspresji danego genu (np. siRNA [81]). Możliwe okazało się także uzyskiwanie linii komórek ES z ludzkich zarodków będących nosicielami określonej mutacji (przykładowo [85]). Opracowanie technik uzyskiwania komórek iPS umożliwiło jednak dostęp do komórek, których genom nie zawiera dodatkowych „unieśmiertelniających” mutacji, a ponadto, które otrzymuje się z wykorzystaniem bardzo podobnych metod, bez konieczności wykorzystywania ludzkich zarodków. Dotychczas zespół kierowany przez George'a Daley'a uzyskał takie komórki z fibroblastów pochodzących od pacjentów cierpiących na: ciężki, złożony niedobór odporności spowodowany mutacją w genie deaminazy adenyzykowej – ADA-SCID (ang. *Adenosine Deaminase Deficiency-Related Severe Combined Immunodeficiency*), wrodzoną lipomatozę trzustki – SBDS (ang. *Shwachman-Bodian-Diamond Syndrome*), chorobę Gauchera (typ III), dystrofie mięśniowe Duchenne'a i Beckera, chorobę Parkinsona, Huntingtona, młodzieńczą postać cukrzycy oraz zespół Downa [39, 65]. Jak twierdzą autorzy cytowanej pracy, dostęp do komórek uzyskanych od chorych zapewnia unikatową możliwość porównania *in vitro* powstawania tkanek normalnych i tych funkcjonujących nieprawidłowo, a co za tym idzie daje szansę na badanie rozwoju choroby i opracowanie metod jej leczenia [65]. Tego typu analizy przeprowadzone już zostały z wykorzystaniem komórek iPS uzyskanych z fibroblastów pacjentów cierpiących na stwardnienie zanikowe boczne – ALS (ang. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*) [8] oraz rdzeniowy zanik mięśni [9]. Okazało się, że komórki iPS pacjentów chorych na ALS są w stanie różnicować *in vitro* w neurony ruchowe, jednak wkrótce degenerują podobnie jak neurony chorego. Komórki iPS uzyskano również z fibroblastów chorych cierpiących na jedną z dziedzicznych neuropatii przejawiającą się brakiem neuronów czuciowych i autonomicznych [38]. Podłożem choroby jest mutacja w genie *IKBKAP* (ang. *I-K-B Kinase Complex-Associated Protein*) prowadząca do nieprawidłowego składania mRNA kodującego białko IKAP (ang. *IKK-Complex-Associated Protein*), co z kolei prowadzi do zaburzeń w migracji określonych typów komórek. Komórkami najbardziej „dotkniętymi” przez tę mutację są komórki prekursorowe grzebienia nerwowego oraz neurony obwodowe. Uzyskane komórki iPS wykorzystano nie tylko do oceny ich zdolności do różnicowania w neurony, ale także w badaniach mających na celu przetestowanie skuteczności

potencjalnych leków, których zastosowanie doprowadziłoby do zniesienia skutków mutacji w genie *IKBKAP* [38]. Inne zespoły badawcze uzyskały i analizują komórki iPS z komórek chorych na chorobę Parkinsona [74], a także chorych cierpiących na przewlekłą chorobę mieloproliferacyjną [93]. Nawet te nieliczne przykłady świadczą dobitnie o tym, jak potężnym narzędziem w badaniach powstawania tego typu schorzeń oraz opracowywania potencjalnych terapii mogą być komórki iPS.

## PODSUMOWANIE

Uzyskanie pierwszych indukowanych komórek pluripotencjalnych bez wątpienia otworzyło nowy rozdział w historii nauki i medycyny. Po pierwsze, osiągnięcie to przyniosło odpowiedź na fundamentalne pytania biologii o możliwości i granice zmian tożsamości danej komórki. Ponadto, rozbudziło na nowo nadzieje związane z możliwością wykorzystania komórek macierzystych w medycynie regeneracyjnej. Przez wiele lat poszukiwano bowiem komórek, które podobnie jak zarodkowe komórki macierzyste byłyby zdolne do wielokierunkowego różnicowania, ale które pochodziłyby także z niebudzącego kontrowersji etycznych źródła. Komórki iPS spełniają oba te warunki a ponadto są dostępne i uniwersalne, gdyż mogą być uzyskane z wielu różnych typów komórek i z różnych organizmów. Mimo że technologia iPS wymaga jeszcze „dopracowania”, obserwowany w ostatnich trzech latach postęp w badaniach nad tymi komórkami pozwala wierzyć, że wkrótce staną się one potężnym narzędziem w terapiach komórkowych.

## LITERATURA

- [1] AOI T, YAE K, NAKAGAWA M, ICHISAKA T, OKITA K, TAKAHASHI K, CHIBA T, YAMANAKA S. Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science* 2008; **321**: 699–702.
- [2] BOLAND MJ, HAZEN JL, NAZOR KL, RODRIGUEZ AR, GIFFORD W, MARTIN G, KUPRIYANOV S, BALDWIN KK. Adult mice generated from induced pluripotent stem cells. *Nature* 2009; **461**: 91–94.
- [3] BOYER LA, LEE TI, COLE MF, JOHNSTONE SE, LEVINE SS, ZUCKER JP, GUENTHER MG, KUMAR RM, MURRAY HL, JENNER RG, GIFFORD DK, MELTON DA, JAENISCH R, YOUNG RA. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 2005; **122**: 947–956.
- [4] BRAMBRINK T, FOREMAN R, WELSTEAD GG, LENGNER CJ, WERNIG M, SUH H, JAENISCH R. Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. *Cell Stem Cell* 2008; **2**: 151–159.
- [5] CHAN KK, ZHANG J, CHIANY, CHAN YS, SIM HS, TAN KS, OH SK, NG HH, CHOO AB. KLF4 and PBX1 Directly Regulate NANOG Expression in Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells* 2009; **41**: 2114–2125.
- [6] CIEMERYCH MA. Zarodkowe komórki macierzyste – w poszukiwaniu pluripotencji. *Post Biol Kom* 2008; **35**: 183–205.
- [7] DI BERARDINO MA. Origin and progress of nuclear transfer in nonmammalian animals. *Methods Mol Biol* 2006; **348**: 3–32.
- [8] DIMOS JT, RODOLFA KT, NIAKAN KK, WEISENTHAL LM, MITSUMOTO H, CHUNG W, CROFT GF, SAPHIER G, LEIBEL R, GOLAND R, WICHTERLE H, HENDERSON CE, EGGAN K. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* 2008; **321**: 1218–1221.

- [9] EBERT AD, YU J, ROSE FF, JR., MATTIS VB, LORSON CL, THOMSON JA, SVENDSEN CN. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature* 2009; **457**: 277–280.
- [10] EMINLI S, FOUZIA, STADTFELD M, MAHERALI N, AHFELDT T, MOSTOSLAVSKY G, HOCK H, HOCHEDLINGER K. Differentiation stage determines potential of hematopoietic cells for reprogramming into induced pluripotent stem cells. *Nat Genet* 2009; **41**: 968–976.
- [11] EMINLI S, UTIKAL J, ARNOLD K, JAENISCH R, HOCHEDLINGER K. Reprogramming of neural progenitor cells into induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2 expression. *Stem Cells* 2008; **26**: 2467–2474.
- [12] ESTEBAN MA, XU J, YANG J, PENG M, QIN D, LI W, JIANG Z, CHEN J, DENG K, ZHONG M, CAI J, LAI L, PEI D. Generation of induced pluripotent stem cell lines from Tibetan miniature pig. *J Biol Chem* 2009; **284**: 17634–17640.
- [13] EZASHI T, TELUGU BP, ALEXENKO AP, SACHDEV S, SINHA S, ROBERTS RM. Derivation of induced pluripotent stem cells from pig somatic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; **106**: 10993–10998.
- [14] FELDMAN N, GERSON A, FANG J, LI E, ZHANG Y, SHINKAI Y, CEDAR H, BERGMAN Y. G9a-mediated irreversible epigenetic inactivation of Oct-3/4 during early embryogenesis. *Nat Cell Biol* 2006; **8**: 188–194.
- [15] FENG B, JIANG J, KRAUS P, NG JH, HENG JC, CHAN YS, YAW LP, ZHANG W, LOH YH, HAN J, VEGA VB, CACHEUX-RATABOUL V, LIM B, LUFKIN T, NG HH. Reprogramming of fibroblasts into induced pluripotent stem cells with orphan nuclear receptor Esrrb. *Nat Cell Biol* 2009; **11**: 197–203.
- [16] GIORGETTI A, MONTSERRAT N, AASEN T, GONZALEZ F, RODRIGUEZ-PIZA I, VASSENA R, RAYAA, BOUE S, BARRERO MJ, CORBELLABA, TORRABADELLA M, VEIGAA, IZPISUA BELMONTE JC. Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood using OCT4 and SOX2. *Cell Stem Cell* 2009; **5**: 353–357.
- [17] GONZALEZ F, BARRAGAN MONASTERIO M, TISCORNIA G, MONTSERRAT PULIDO N, VASSENA R, BATLLE MORERA L, RODRIGUEZ PIZA I, IZPISUA BELMONTE JC. Generation of mouse-induced pluripotent stem cells by transient expression of a single nonviral polycistronic vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; **106**: 8918–8922.
- [18] HANNA J, MARKOULAKI S, SCHORDERET P, CAREY BW, BEARD C, WERNIG M, CREYGHTON MP, STEINE EJ, CASSADY JP, FOREMAN R, LENGNER CJ, DAUSMAN JA, JAENISCH R. Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. *Cell* 2008; **133**: 250–264.
- [19] HANNA J, WERNIG M, MARKOULAKI S, SUN CW, MEISSNER A, CASSADY JP, BEARD C, BRAMBRIK T, WU LC, TOWNES TM, JAENISCH R. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPSC cells generated from autologous skin. *Science* 2007; **318**: 1920–1923.
- [20] HOCHEDLINGER K, PLATH K. Epigenetic reprogramming and induced pluripotency. *Development* 2009; **136**: 509–523.
- [21] HOCHEDLINGER K, YAMADA Y, BEARD C, JAENISCH R. Ectopic expression of Oct-4 blocks progenitor-cell differentiation and causes dysplasia in epithelial tissues. *Cell* 2005; **121**: 465–477.
- [22] HOCKEMEYER D, SOLDNER F, BEARD C, GAO Q, MITALIPOVA M, DEKELVER RC, KATIBAH GE, AMORAR, BOYDSTON EA, ZEITLER B, MENG X, MILLER JC, ZHANG L, REBAREJ, GREGORY PD, URNOV FD, JAENISCH R. Efficient targeting of expressed and silent genes in human ESCs and iPSCs using zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol* 2009; **27**: 851–857.
- [23] HOCKEMEYER D, SOLDNER F, COOK EG, GAO Q, MITALIPOVA M, JAENISCH R. A drug-inducible system for direct reprogramming of human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell* 2008; **3**: 346–353.
- [24] HONG H, TAKAHASHI K, ICHISAKA T, AOI T, KANAGAWA O, NAKAGAWA M, OKITA K, YAMANAKA S. Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway. *Nature* 2009; **460**: 1132–1135.
- [25] HOWE SJ, MANSOUR MR, SCHWARZWAELDER K, BARTHOLOMAE C, HUBANK M, KEMPSKI H, BRUGMAN MH, PIKE-OVERZET K, CHATTERS SJ, DE RIDDER D, GILMOUR KC, ADAMS S, THORNHILL SI, PARSLEY KL, STAAL FJ, GALE RE, LINC DC, BAYFORD J, BROWN L, QUAYE M, KINNON C, ANCLIFF P, WEBB DK, SCHMIDT M, VON KALLE C, GASPAR HB, THRASHERAJ. Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients. *J Clin Invest* 2008; **118**: 3143–3150.
- [26] HUANGFU D, MAEHR R, GUO W, EIJKELENBOOM A, SNITOW M, CHEN AE, MELTON DA. Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat Biotechnol* 2008; **26**: 795–797.



- [27] ICHIDA J. Reprogramming Somatic Cells to Pluripotency using Small Molecules. Human Pluripotent Stem Cell Symposium, Dublin, Ireland 2009: 8.
- [28] KAJI K, NORRBY K, PACAA, MILEIKOVSKY M, MOHSENI P, WOLTJEN K. Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature* 2009; **458**: 771–775.
- [29] KANGL L, WANG J, ZHANG Y, KOU Z, GAO S. iPS cells can support full-term development of tetraploid blastocyst-complemented embryos. *Cell Stem Cell* 2009; **5**: 135–138.
- [30] KARUMBAYARAM S, NOVITCH BG, PATTERSON M, UMBACH JA, RICHTER L, LINDGREN A, CONWAY AE, CLARK AT, GOLDMAN SA, PLATH K, WIEDAU-PAZOS M, KORNBLUM HI, LOWRY WE. Directed differentiation of human-induced pluripotent stem cells generates active motor neurons. *Stem Cells* 2009; **27**: 806–811.
- [31] KAWAMURA T, SUZUKI J, WANG YV, MENENDEZ S, MORERA LB, RAYA A, WAHL GM, BELMONTE JC. Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming. *Nature* 2009; **460**: 1140–1141.
- [32] KIM D, KIM CH, MOON JI, CHUNG YG, CHANG MY, HAN BS, KO S, YANG E, CHA KY, LANZAR R, KIM KS. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell* 2009; **4**: 472–476.
- [33] KIM JB, SEBASTIANO V, WU G, ARAUZO-BRAVO MJ, SASSE P, GENTILE L, KO K, RUAU D, EHRICH M, VAN DEN BOOM D, MEYER J, HUBNER K, BERNEMANN C, ORTMEIER C, ZENKE M, FLEISCHMANN BK, ZAEHRES H, SCHOLER HR. Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell* 2009; **136**: 411–419.
- [34] KIM JB, ZAEHRES H, WU G, GENTILE L, KO K, SEBASTIANO V, ARAUZO-BRAVO MJ, RUAU D, HAN DW, ZENKE M, SCHOLER HR. Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature* 2008; **454**: 646–650.
- [35] KRIZHANOVSKY V, LOWE SW. Stem cells: The promises and perils of p53. *Nature* 2009; **460**: 1085–1086.
- [36] KUNISATO A, WAKATSUKI M, KODAMA Y, SHINBA H, ISHIDA I, NAGAO K. Generation of induced pluripotent stem (iPS) cells by efficient reprogramming of adult bone marrow cells. *Stem Cells Dev* 2009; doi: 10.1089/scd.2009.0149.
- [37] LACOSTE A, BERENSHTEYN F, BRIVANLOU AH. An efficient and reversible transposable system for gene delivery and lineage-specific differentiation in human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 2009; **5**: 332–342.
- [38] 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. Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. *Nature* 2009; **461**: 402–406.
- [39] LENGERKE C, DALEY GQ. Disease models from pluripotent stem cells. *Ann NY Acad Sci* 2009; **1176**: 191–196.
- [40] LENGERKE C, GRAUER M, NIEBUHR NI, RIEDT T, KANZ L, PARK IH, DALEY GQ. Hematopoietic development from human induced pluripotent stem cells. *Ann NY Acad Sci* 2009; **1176**: 219–227.
- [41] LI C, ZHOU J, SHI G, MA Y, YANG Y, GU J, YU H, JIN S, WEI Z, CHEN F, JIN Y. Pluripotency can be rapidly and efficiently induced in human amniotic fluid-derived cells. *Hum Mol Genet* 2009; **18**: 4340–4349.
- [42] LI H, COLLADO M, VILLASANTE A, STRATI K, ORTEGA S, CANAMERO M, BLASCO MA, SERRANO M. The Ink4/Arf locus is a barrier for iPS cell reprogramming. *Nature* 2009; **460**: 1136–1139.
- [43] LI W, WEI W, ZHU S, ZHU J, SHI Y, LIN T, HAO E, HAYEK A, DENG H, DING S. Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors. *Cell Stem Cell* 2009; **4**: 16–19.
- [44] LIAO J, CUI C, CHEN S, REN J, CHEN J, GAO Y, LI H, JIA N, CHENG L, XIAO H, XIAO L. Generation of induced pluripotent stem cell lines from adult rat cells. *Cell Stem Cell* 2009; **4**: 11–15.
- [45] LIN T, CHAO C, SAITO S, MAZUR SJ, MURPHY ME, APPELLA E, XU Y. p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing Nanog expression. *Nat Cell Biol* 2005; **7**: 165–171.
- [46] LIU H, ZHU F, YONG J, ZHANG P, HOU P, LI H, JIANG W, CAI J, LIU M, CUI K, QU X, XIANG T, LU D, CHI X, GAO G, JI W, DING M, DENG H. Generation of induced pluripotent stem cells from adult rhesus monkey fibroblasts. *Cell Stem Cell* 2008; **3**: 587–590.
- [47] LOH YH, ZHANG W, CHEN X, GEORGE J, NG HH. Jmjd1a and Jmjd2c histone H3 Lys 9 demethylases regulate self-renewal in embryonic stem cells. *Genes Dev* 2007; **21**: 2545–2557.

- [48] LOWRY WE, RICHTER L, YACHECHKO R, PYLE AD, TCHIEU J, SRIDHARAN R, CLARK AT, PLATH K. Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 2883–2888.
- [49] LYSSIOTIS CA, FOREMAN RK, STAERK J, GARCIA M, MATHUR D, MARKOULAKI S, HANNA J, LAIRSON LL, CHARETTE BD, BOUCHEZ LC, BOLLONG M, KUNICK C, BRINKER A, CHO CY, SCHULTZ PG, JAENISCH R. Reprogramming of murine fibroblasts to induced pluripotent stem cells with chemical complementation of Klf4. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; **106**: 8912–8917.
- [50] MAHERALI N, AHFELDT T, RIGAMONTI A, UTIKAL J, COWAN C, HOCHEDLINGER K. A high-efficiency system for the generation and study of human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2008; **3**: 340–345.
- [51] MAHERALI N, SRIDHARAN R, XIE W, UTIKAL J, EMINLI S, ARNOLD K, STADTFELD M, YACHECHKO R, TCHIEU J, JAENISCH R, PLATH K, HOCHEDLINGER K. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell* 2007; **1**: 55–70.
- [52] MARION RM, STRATI K, LI H, MURGAM, BLANCO R, ORTEGA S, FERNANDEZ-CAPETILLO O, SERRANO M, BLASCO MA. A p53-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure iPS cell genomic integrity. *Nature* 2009; **460**: 1149–1153.
- [53] MARKOULAKI S, HANNA J, BEARD C, CAREY BW, CHENGAW, LENGNER CJ, DAUSMAN JA, FU D, GAO Q, WU S, CASSADY JP, JAENISCH R. Transgenic mice with defined combinations of drug-inducible reprogramming factors. *Nat Biotechnol* 2009; **27**: 169–171.
- [54] MARSON A, FOREMAN R, CHEVALIER B, BILODEAU S, KAHN M, YOUNG RA, JAENISCH R. Wnt signaling promotes reprogramming of somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell* 2008; **3**: 132–135.
- [55] MARTINEZ-FERNANDEZ A, NELSON TJ, YAMADA S, REYES S, ALEKSEEV AE, PEREZ-TERZIC C, IKEDA Y, TERZIC A. iPS Programmed Without c-MYC Yield Proficient Cardiogenesis for Functional Heart Chimerism. *Circ Res* 2009; **105**: 648–656.
- [56] MAURITZ C, SCHWANKE K, REPPPEL M, NEEF S, KATSIRNTAKI K, MAIER LS, NGUEMO F, MENKE S, HAUSTEIN M, HESCHELER J, HASENFUSS G, MARTIN U. Generation of functional murine cardiac myocytes from induced pluripotent stem cells. *Circulation* 2008; **118**: 507–517.
- [57] MEISSNER A, WERNIG M, JAENISCH R. Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 2007; **25**: 1177–1181.
- [58] MIKKELSEN TS, HANNA J, ZHANG X, KU M, WERNIG M, SCHORDERET P, BERNSTEIN BE, JAENISCH R, LANDER ES, MEISSNER A. Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature* 2008; **454**: 49–55.
- [59] NAKAGAWA M, KOYANAGI M, TANABE K, TAKAHASHI K, ICHISAKA T, AOI T, OKITA K, MOCHIDUKI Y, TAKIZAWA N, YAMANAKA S. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 2008; **26**: 101–106.
- [60] NARAZAKI G, UOSAKI H, TERANISHI M, OKITA K, KIM B, MATSUOKA S, YAMANAKA S, YAMASHITA JK. Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells. *Circulation* 2008; **118**: 498–506.
- [61] OKITA K, ICHISAKA T, YAMANAKA S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 2007; **448**: 313–317.
- [62] OKITA K, NAKAGAWA M, HYENJONG H, ICHISAKA T, YAMANAKA S. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* 2008; **322**: 949–953.
- [63] OSAKADA F, JIN ZB, HIRAMI Y, IKEDA H, DANJYO T, WATANABE K, SASAI Y, TAKAHASHI M. *In vitro* differentiation of retinal cells from human pluripotent stem cells by small-molecule induction. *J Cell Sci* 2009; **122**: 3169–3179.
- [64] PAGE RL, AMBADY S, HOLMES WF, VILNER L, KOLE D, KASHPUR O, HUNTRESS V, VOJTIC I, WHITTON H, DOMINKO T. Induction of Stem Cell Gene Expression in Adult Human Fibroblasts without Transgenes. *Cloning Stem Cells* 2009; **11**: 417–426.
- [65] PARK IH, ARORA N, HUO H, MAHERALI N, AHFELDT T, SHIMAMURAA, LENSCH MW, COWAN C, HOCHEDLINGER K, DALEY GQ. Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* 2008; **134**: 877–886.
- [66] PARK IH, LEROU PH, ZHAO R, HUO H, DALEY GQ. Generation of human-induced pluripotent stem cells. *Nat Protoc* 2008; **3**: 1180–1186.
- [67] PARK IH, ZHAO R, WEST JA, YABUUCHI A, HUO H, INCE TA, LEROU PH, LENSCH MW, DALEY GQ. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 2008; **451**: 141–146.

- [68] ROWLAND BD, BERNARDS R, PEEPER DS. The KLF4 tumour suppressor is a transcriptional repressor of p53 that acts as a context-dependent oncogene. *Nat Cell Biol* 2005; **7**: 1074–1082.
- [69] ROWLAND BD, PEEPER DS. KLF4, p21 and context-dependent opposing forces in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; **6**: 11–23.
- [70] SCHENKE-LAYLAND K, RHODES KE, ANGELIS E, BUTYLKOVA Y, HEYDARKHAN-HAGVALL S, GEKAS C, ZHANG R, GOLDHABER JI, MIKKOLA HK, PLATH K, MACLELLAN WR. Reprogrammed mouse fibroblasts differentiate into cells of the cardiovascular and hematopoietic lineages. *Stem Cells* 2008; **26**: 1537–1546.
- [71] SENJU S, HARUTA M, MATSUNAGA Y, FUKUSHIMA S, IKEDA T, TAKAHASHI K, OKITA K, YAMANAKA S, NISHIMURA Y. Characterization of dendritic cells and macrophages generated by directed differentiation from mouse induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 2009; **27**: 1021–1031.
- [72] SHI Y, DO JT, DESPONTS C, HAHM HS, SCHOLER HR, DING S. A combined chemical and genetic approach for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2008; **2**: 525–528.
- [73] SILVA J, BARRANDON O, NICHOLS J, KAWAGUCHI J, THEUNISSEN TW, SMITH A. Promotion of reprogramming to ground state pluripotency by signal inhibition. *PLoS Biol* 2008; **6**: e253.
- [74] SOLDNER F, HOCKEMEYER D, BEARD C, GAO Q, BELL GW, COOK EG, HARGUS G, BLAK A, COOPER O, MITALIPOVA M, ISACSON O, JAENISCH R. Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell* 2009; **136**: 964–977.
- [75] STADTFELD M, BRENNAND K, HOCHEDLINGER K. Reprogramming of pancreatic beta cells into induced pluripotent stem cells. *Curr Biol* 2008; **18**: 890–894.
- [76] STADTFELD M, NAGAYA M, UTIKAL J, WEIR G, HOCHEDLINGER K. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* 2008; **322**: 945–949.
- [77] TAKAHASHI K, TANABE K, OHNUKI M, NARITA M, ICHISAKA T, TOMODA K, YAMANAKA S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; **131**: 861–872.
- [78] TAKAHASHI K, YAMANAKA S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; **126**: 663–676.
- [79] TARKOWSKI AK, MALESZEWSKI M, ROGULSKA T, CIEMERYCH MA, BORSUK E. Mammalian and avian embryology at Warsaw University (Poland) from XIX century to the present. *Int J Dev Biol* 2008; **52**: 121–134.
- [80] TAURA D, NOGUCHI M, SONE M, HOSODA K, MORI E, OKADA Y, TAKAHASHI K, HOMMA K, OYAMADA N, INUZUKA M, SONOYAMA T, EBIHARA K, TAMURA N, ITOH H, SUEMORI H, NAKATSUJI N, OKANO H, YAMANAKA S, NAKAO K. Adipogenic differentiation of human induced pluripotent stem cells: comparison with that of human embryonic stem cells. *FEBS Lett* 2009; **583**: 1029–1033.
- [81] TULPUL A, DALEY GQ. Efficient gene knockdowns in human embryonic stem cells using lentiviral-based RNAi. *Methods Mol Biol* 2009; **482**: 35–42.
- [82] URBACHA, SCHULDINER M, BENVENISTY N. Modeling for Lesch-Nyhan disease by gene targeting in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2004; **22**: 635–641.
- [83] UTIKAL J, POLO JM, STADTFELD M, MAHERALI N, KULALERT W, WALSH RM, KHALIL A, RHEINWALD JG, HOCHEDLINGER K. Immortalization eliminates a roadblock during cellular reprogramming into iPS cells. *Nature* 2009; **460**: 1145–1148.
- [84] VARAS F, STADTFELD M, DE ANDRES-AGUAYO L, MAHERALI N, DI TULLIO A, PANTANO L, NOTREDAME C, HOCHEDLINGER K, GRAF T. Fibroblast-derived induced pluripotent stem cells show no common retroviral vector insertions. *Stem Cells* 2009; **27**: 300–306.
- [85] VERLINSKY Y, STRELCHENKO N, KUKHARENKO V, RECHITSKY S, VERLINSKY O, GALAT V, KULIEV A. Human embryonic stem cell lines with genetic disorders. *Reprod Biomed Online* 2005; **10**: 105–110.
- [86] WAKAYAMA T, PERRY AC, ZUCCOTTI M, JOHNSON KR, YANAGIMACHI R. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 1998; **394**: 369–374.
- [87] WERNIG M, LENGNER CJ, HANNA J, LODATO MA, STEINE E, FOREMAN R, STAERK J, MARKOULAKI S, JAENISCH R. A drug-inducible transgenic system for direct reprogramming of multiple somatic cell types. *Nat Biotechnol* 2008; **26**: 916–924.
- [88] WERNIG M, MEISSNER A, CASSADY JP, JAENISCH R. c-Myc is dispensable for direct reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell* 2008; **2**: 10–12.

- [89] WERNIG M, MEISSNERA, FOREMAN R, BRAMBRINK T, KU M, HOCHEDLINGER K, BERNSTEIN BE, JAENISCH R. *In vitro* reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 2007; **448**: 318–324.
- [90] WERNIG M, ZHAO JP, PRUSZAK J, HEDLUND E, FU D, SOLDNER F, BROCCOLI V, CONSTANTINE-PATON M, ISACSON O, JAENISCH R. Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 5856–5861.
- [91] WOLTJEN K, MICHAEL IP, MOHSENI P, DESAI R, MILEIKOVSKY M, HAMALAINEN R, COWLING R, WANG W, LIU P, GERTSENSTEIN M, KAJI K, SUNG HK, NAGY A. piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* 2009; **458**: 766–770.
- [92] XU D, ALIPIO Z, FINK LM, ADCOCK DM, YANG J, WARD DC, MA Y. Phenotypic correction of murine hemophilia A using an iPS cell-based therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; **106**: 808–813.
- [93] YE Z, ZHAN H, MALI P, DOWEY S, WILLIAMS DM, JANG YY, DANG CV, SPIVAK JL, MOLITERNO AR, CHENG L. Human induced pluripotent stem cells from blood cells of healthy donors and patients with acquired blood disorders. *Blood* 2009; **114**: 5473–5480.
- [94] YU J, HU K, SMUGA-OTTO K, TIAN S, STEWART R, SLUKVIN, II, THOMSON JA. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science* 2009; **324**: 797–801.
- [95] 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. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007; **318**: 1917–1920.
- [96] YUSA K, RAD R, TAKEDA J, BRADLEY A. Generation of transgene-free induced pluripotent mouse stem cells by the piggyBac transposon. *Nat Methods* 2009; **6**: 363–369.
- [97] ZHANG D, JIANG W, LIU M, SUI X, YIN X, CHEN S, SHI Y, DENG H. Highly efficient differentiation of human ES cells and iPS cells into mature pancreatic insulin-producing cells. *Cell Res* 2009; **19**: 429–438.
- [98] ZHAO XY, LI W, LV Z, LIU L, TONG M, HAI T, HAO J, GUO CL, MA QW, WANG L, ZENG F, ZHOU Q. iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation. *Nature* 2009; **461**: 86–90.
- [99] ZHAO Y, YIN X, QIN H, ZHU F, LIU H, YANG W, ZHANG Q, XIANG C, HOU P, SONG Z, LIU Y, YONG J, ZHANG P, CAI J, LIU M, LI H, LI Y, QU X, CUI K, ZHANG W, XIANG T, WU Y, ZHAO Y, LIU C, YU C, YUAN K, LOU J, DING M, DENG H. Two supporting factors greatly improve the efficiency of human iPSC generation. *Cell Stem Cell* 2008; **3**: 475–479.
- [100] ZHOU H, WU S, JOO JY, ZHU S, HAN DW, LIN T, TRAUGER S, BIEN G, YAO S, ZHU Y, SUZDAK G, SCHOLER HR, DUAN L, DING S. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* 2009; **4**: 381–384.
- [101] ZOU J, MAEDER ML, MALI P, PRUETT-MILLER SM, THIBODEAU-BEGANNY S, CHOU BK, CHEN G, YE Z, PARK IH, DALEY GQ, PORTEUS MH, JOUNG JK, CHENG L. Gene targeting of a disease-related gene in human induced pluripotent stem and embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 2009; **5**: 97–110.
- [102] ZWAKA TP, THOMSON JA. Homologous recombination in human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2003; **21**: 319–321.

*Dr hab. Maria Anna Ciemerych,  
Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski  
Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa,  
e-mail: ciemerych@biol.uw.edu.pl*