



Praca poglądowa/Review paper

# Komórki macierzyste i reprogramowanie komórek somatycznych – wybrane zagadnienia

## *Stem cells and somatic cells reprogramming – selected issues*

Joanna P. Wróblewska<sup>1,2\*</sup>, Andrzej Marszałek<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Department of Oncologic Pathology and Prophylactics, Poznan University of Medical Sciences, Poznan, Poland

<sup>2</sup> Department of Oncologic Pathology, Greater Poland Cancer Center, Poznan, Poland

\* Corresponding author

### Streszczenie

Historia badań nad komórkami macierzystymi (*embryonic stem cells, ES*) sięga początków XX wieku. Już wtedy obserwowano komórki, które w organizmie myszy tworzyły specyficzny, wysoce zróżnicowany guz nowotworowy - potworniak. Jednakże dopiero druga połowa XX wieku przyniosła znaczący postęp w badaniach, co zaowocowało uzyskaniem pierwszych linii komórek macierzystych w hodowli *in vitro*. Poznanie cech charakterystycznych i potencjału komórek ES wzbudziło ogromne nadzieje na wykorzystanie komórek macierzystych nie tylko w badaniach podstawowych, ale przede wszystkim w nowo rozwijającej się gałęzi medycyny – medycynie regeneracyjnej. Jednakże ze względu na etyczne kwestie związane ze sposobem pozyskiwania komórek ES, badania tego typu nie miały większych szans na powodzenie. Przełom nastąpił w 2006 roku, po opracowaniu metody uzyskiwania indukowalnych komórek pluripotentnych (*induced pluripotent stem cells, iPSC*) na drodze reprogramowania komórek somatycznych. Komórki IPS posiadają wszystkie zalety komórek ES, jednakże ich pozyskiwanie nie jest obarczone restrykcjami prawnymi i etycznym. Daje to nadzieję na szybki postęp badań z zakresu medycyny regeneracyjnej i terapii komórkowej, zwłaszcza w przypadku chorób dotychczas uznawanych za nieuleczalne.

### Abstract

History of research on stem cells (embryonic stem cells, ES) dates back to the early twentieth century. Even then, some cells were observed in mice to form a specific, highly differentiated tumor - teratoma. However, only the second half of the twentieth century saw a significant progress in the studies which resulted in obtaining the first stem cell lines cultured *in vitro*. Understanding the characteristics and potential of ES cells aroused great hopes for the use of stem cells not only in fundamental research, but mainly in the newly emerging branch of medicine, regenerative medicine. However, because of the ethical issues related to the way of obtaining ES cells, studies of this type do not have much chance of success. The breakthrough came in 2006, after the development of methods for obtaining inducible pluripotent stem cells (induced Pluripotent

Adres do korespondencji

Joanna Wróblewska

Zakład Patologii Nowotworów

Wielkopolskie Centrum Onkologii, ul. Garbary 15, 61-866 Poznań, Polska

Telefon. +48 618 850 795; Fax.+48 618 850 808

e-mail: [joanna.wroblewska@wco.pl](mailto:joanna.wroblewska@wco.pl)

stem cells, iPSCs) by reprogramming somatic cells. IPS cells have all the advantages of ES cells, but their acquisition is not subject to legal and ethical restrictions. This gives hope for rapid progress of research in the field of regenerative medicine and cell therapy, especially for diseases previously regarded as incurable.

*Słowa kluczowe:* indukowane komórki pluripotenne, embrionalne komórki macierzyste, proces reprogramowania, medycyna regeneracyjna, czynniki reprogramujące

*Keywords:* induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells, reprogramming process, regenerative medicine, reprogramming factors

*Skróty:* : IPS (indukowane komórki pluripotenne), ES (embrionalne komórki macierzyste), OSKM (OCT3/4: octamer-binding transcription factor 4, SOX2: sex-determining region Y – box 2, KLF4: Krüppel-like factor 4, C-MYC: c-mycelocytomatosis)

## Wstęp

Procesy zachodzące w trakcie rozwoju zarodkowego zwierząt kręgowych pozwalają na wykształcenie się z zygoty całego organizmu, zróżnicowanego pod względem budowy tkankowej i funkcji poszczególnych układów. Jakie są biologiczne i molekularne podstawy tego zjawiska? Co umożliwi wykształcenie się wyspecjalizowanych komórek z pojedynczej komórki? Zagadnienie to intrygowało naukowców z całego świata od dawna. Zadali oni pytanie nie tylko o przebieg procesu różnicowania się komórek w trakcie rozwoju embrionalnego, ale też o jego odwracalność. Czy przebiega on jednokierunkowo i nie ma możliwości aby cofnąć rozwój komórek, „zreprogramować” je do stanu macierzystości?

## Komórki macierzyste

Komórki macierzyste to pierwotne, niewyspecjalizowane komórki, posiadające szereg charakterystycznych cech, między innymi zdolność do różnicowania się w wyspecjalizowane komórki tworząc tkanki. Pierwsze obserwacje tego typu komórek dotyczyły potworniaków (teratom) – guzów powstających w jądrach lub jajnikach myszy. Już na początku lat 40 XX wieku stwierdzono, że występują w nich komórki, które mogą różnicować się we wszystkie tkanki budujące organizm. Kolejne badania potwierdziły te obserwacje, co więcej, udowodniono, że guzy tego typu powstają z komórek rozrodczych [1]. Eksperymenty te zainicjowały cały szereg prac, który doprowadził do uzyskania w 1981 roku pierwszej mysiej linii zarodkowych komórek macierzystych (embryonic stem cells, ES). Dokonali tego niezależnie od siebie Gail Martin [2] oraz Martin Evans (uhonorowany Nagrodą Nobla w 2007 roku) i Matthew Kaufman [3]. Kolejne badania pozwoliły na uzyskanie pierwszych ludzkich komórek macierzystych w 1998 roku. Niezależnie od pochodzenia, komórki macierzyste posiadają kilka cech wspólnych, definiujących ich macierzysty charakter. Należą do nich potencjał do różnicowania się – odpowiednio stymulowane, potrafiły różnicować się w dowolny typ komórek, zarówno *in vitro* jak i *in vivo*. Drugą niezwykle istotną cechą jest samoodnowa, czyli zdolność komórek do przejścia nieograniczonej liczby podziałów komórkowych, bez utraty zdolności do różnicowania. Te dwie właściwości komórek macierzystych wzbudziły ogromne nadzieje w kontekście wykorzystania ich potencjału w medycynie regeneracyjnej. Jednakże, ze względu na fakt, iż są one pozyskiwane z wężła zarodkowego blastocysty, co wiąże się z jej nieodwracalnym zniszczeniem, ich wykorzystanie w celach terapeutycznych wzbudza wiele kontrowersji etycznych i moralnych. Z tego względu, równoległe z badaniami nad wykorzystaniem potencjału komórek macierzystych trwały prace nad alternatywnymi metodami ich pozyskiwania.

## Reprogramowanie komórek somatycznych

Badania nad ideą procesu reprogramowania komórek rozpoczęły się około roku 1952 kiedy to dwóch badaczy, Briggs i King przeszczepili jądro komórki pochodzącej z blastuli żaby do oocyty pozbawionego własnego materiału genetycznego [4]. Otrzymali w ten sposób zarodek prawidłowo rozwijający aż do stadium kijanki. Wydajność tego procesu była jednak bardzo niska, jednakże znacząco wyższa niż w przypadku

wykorzystania jąder komórek somatycznych. Uczni doszli do wniosku, że różnicowanie się komórek w trakcie rozwoju embrionalnego jest zjawiskiem zmieniającym profil ekspresji genów w sposób nieodwracalny [5]. W latach 60 XX wieku eksperymenty te zostały powtórzone i rozszerzone przez Marie Di Berardino [6-8], a także przez Johna Gourдона [9-11]. Udowodnione zostało, że transplantacja jądra nawet wysoce zróżnicowanych komórek somatycznych takich jak naskórek czy limfocyt do pozbawionego własnego jądra oocytu płaza, prowadzi do skutecznego rozwoju embrionalnego. Po raz pierwszy wykazano więc, że nie tylko komórki zarodkowe, ale także komórki dorosłego organizmu posiadają informację genetyczną niezbędną do zainicjowania rozwoju embrionalnego. Również polski zespół Andrzeja Tarkowskiego z Zakładu Embriologii Uniwersytetu Warszawskiego podjął temat reprogramowania komórek. W latach 80 XX wieku prowadził badania polegające na zastąpieniu materiału genetycznego oocytu myszy jądrem z komórki somatycznej [12-14]. Chociaż badania te nie zakończyły się uzyskaniem klonu myszy, wniosły ogromny wkład wiedzy w zakresie remodelowaniu chromatyny w jądrach wprowadzanych do oocytu. Próby sklonowania ssaków podejmowano jeszcze kilkakrotnie, jednakże dopiero w roku 1996 nastąpił przełom w tej dziedzinie. Zespół Iana Wilmuta i Keitha Campbella wprowadził jądro komórki nabłonkowej gruczołu mlecznego owcy do oocytu pozbawionego jądra komórkowego. Rozwijający się zarodek wszczepiono matce zastępczej. Skutkiem tego eksperymentu było pierwsze w historii udane klonowanie ssaka – na świat przyszła owca o imieniu Dolly [15]. Kilka lat później w analogiczny sposób uzyskano pierwsze sklonowane myszy [16]. Badania te obaliły tezę o nieodwracalności losów komórki somatycznej i ostateczności zmian zachodzących w jądrze komórkowym w trakcie rozwoju embrionalnego.

## Indukowalne komórki pluripotentne

Przełomem w temacie pozyskiwania komórek macierzystych były prace badaczy z Japonii. W 2006 roku Kazutoshi Takahashi oraz Shinya Yamanaka, opublikowali pracę wskazującą na możliwość uzyskania komórek o charakterze macierzystym z mysich fibroblastów poprzez nadekspresję czterech czynników transkrypcyjnych [17]. Z wstępnie wyselekcjonowanych 24 czynników indukujących pluripotencję w komórkach somatycznych wybrano cztery: *OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4* oraz *C-MYC* (OSKM). Otrzymane komórki posiadały morfologię oraz profil ekspresji genów porównywalny do komórek embrionalnych i zostały nazwane indukowanymi pluripotentnymi komórkami macierzystymi (induced Pluripotent Stem cells, IPS). Rok później analogiczne komórki otrzymali oni z ludzkich fibroblastów [18]. Fakt, że komórki somatyczne mogą być reprogramowane do komórek pluripotentnych ma istotny wpływ na postrzeganie kierunku rozwoju terapii komórkami macierzystymi. Zastosowanie komórek IPS pozwala zmarginalizować dwie kluczowe kwestie związane z komórkami ES: odrzucanie przeszczepów allogenicznym oraz kontrowersje etyczne związane z niszczeniem embrionów w trakcie izolacji komórek macierzystych. Udane reprogramowanie fibroblastów pozwoliło rozszerzyć skalę badań na inne komórki somatyczne. Kolejne lata badań naukowców z całego świata pozwoliły na otrzymanie komórek IPS z komórek takich jak keratynocyty, amniocyty, hepatocyty, limfocyty B, astrocyty, komórki macierzyste i endotelialne krwi pępowinowej, melanocyty, mezenchymalne komórki macierzyste szpiku i inne [19]. W przypadku wykorzystania wyjściowo ludzkich macierzystych komórek neuronalnych udało się je odróżnicować w kierunku komórek IPS wykorzystując jedynie nadekspresję *OCT3/4* [20]. Komórki pochodzące z owodni reprogramowano jedynie przy użyciu genów *OCT3/4*, *SOX2* i *NANOG*, natomiast CD133-pozytywne komórki macierzyste z krwi pępowinowej wymagały nadekspresji jedynie czynników *OCT3/4* i *SOX2* [21]. Niezależnie jednak od wykorzystanej linii komórkowej problemem była i nadal jest niska wydajność tego procesu wahająca się w granicach 0,001 -1% [22].

Dalsze badania wykazały, że w odpowiednich warunkach możliwe jest zwiększenie wydajności reprogramowania komórek oraz wykorzystanie tylko trzech lub dwóch czynników transkrypcyjnych, co wymagało jednak modyfikacji warunków hodowli (na przykład poprzez stymulację kwasem walproinowym, maślanem sodu lub witaminą C) lub ingerencji w biologię komórki przez wyciszenie ekspresji genu *TP53*.

Kwas walproinowy jest inhibitorem deacetylazy histonów, jego zastosowanie w trakcie procesu reprogramowania zwiększa poziom acetylacji histonu H3 na lizynie9 (H3K9), znaczące rozluźnienie jej zwartej struktury oraz w następstwie zwiększoną rekrutację czynników transkrypcyjnych i wzrost aktywności transkrypcyjnej. Podobne, lecz słabsze działanie wykazują także 5-azacytydyna, trichostatyna

oraz sole kwasu masłowego [23].

Gen *TP53* będący swoistym „strażnikiem genomu” pełni funkcję genu supresorowego transformacji nowotworowej. W odpowiedzi na zwiększoną ekspresję onkogenów w komórce lub uszkodzenia DNA innego pochodzenia blokuje podział komórki w punkcie kontrolny G1/S cyklu komórkowego, umożliwiając zadziałanie systemów naprawy DNA lub wprowadza komórkę na szlak programowanej śmierci – apoptozy. Podobieństwo procesu reprogramowania i transformacji nowotworowej zasugerowało istotną rolę białka p53 w odróżnicowywaniu komórek somatycznych w kierunku komórek IPS. Dalsze badania wykazały, iż dwa z czterech czynników transkrypcyjnych Yamanaki – *C-MYC* i *KLF4* – będące onkogenami, aktywują ścieżkę sygnałową p53 w trakcie procesu reprogramowania, co jest jedną z przyczyn jego niskiej wydajności. Przejściowe wyciszenie ekspresji genu *TP53* pozwala nie tylko na znaczące zwiększenie ilości otrzymywanych kolonii IPS przy reprogramowaniu z użyciem 4 czynników transkrypcyjnych, ale też na generację komórek IPS z wykorzystaniem nadekspresji tylko genów *SOX2* i *OCT4* [24].

Wraz z włączaniem do badań coraz to szerszego spektrum komórek zwrócono też uwagę na metody dostarczania genów do komórek, jako czynnik mający istotny wpływ na wydajność i bezpieczeństwo reprogramowania. Pierwotnie wykorzystywane wektory retrowirusowe, pomimo relatywnie wysokiej wydajności, mają zdolność do infekowania tylko komórek aktywnie proliferujących. Problem ten rozwiązało zastosowanie wektorów lentiwirusowych, które dodatkowo umożliwiają stworzenie systemów regulowanej ekspresji transgenów. Oba te wektory integrują z genomem transdukowanej komórki, co może niekorzystnie wpływać na stabilność genomu komórki, oraz stwarzać zagrożenie w przypadku aplikacji klinicznych komórek IPS wygenerowanych z ich użyciem. Wektory adenowirusowe cechuje niska wydajność reprogramowania komórek oraz ograniczona możliwość kontroli poziomu ekspresji transgenów [25]. Również wektory episomalne oriP/EBNA oparte na wirusie Epstein-Baara cechują się bardzo niską wydajnością reprogramowania. Wirus Sendai, pomimo relatywnie wysokiej wydajności reprogramowania, stwarza problem w postaci usunięcia go z otrzymanych komórek IPS [26]. Nieznacznie wyższą wydajnością charakteryzują się wektory plazmidowe, ale ze względu na brak możliwości ich replikacji w komórce wymagają one kilkukrotnej transfekcji w trakcie procesu reprogramowania, aby utrzymać stały poziom nadekspresji czynników transkrypcyjnych [27]. Wektory episomalne oriP/EBNA oparte na wirusie Epstein-Baara mają zdolność do samoreplikacji, jednakże wydajność reprogramowania z ich użyciem jest ekstremalnie niska, na poziomie 0,003% [28]. Wektory integrujące charakteryzują się wyższą wydajnością, możliwe jest także regulowanie ekspresji transgenów oraz jego wycięcie z miejsca integracji. W tym celu stosuje się system Cre-loxP, w którym miejsce loxP umieszczone jest w regionie 3’LTR wektora. W trakcie integracji jest ono duplikowane do regionu 5’LTR, co skutkuje integracją transgenów flankowanego dwoma miejscami loxP, co umożliwia jego wycięcie przy pomocy rekombinazy Cre [29]. Drugą metodą jest wykorzystanie transpozonu piggyBAC, który po integracji ulega wycięciu przez naturalnie występujący enzym transpozazę [30]. Opracowane także zostały systemy dostarczania genów nie oparte na DNA, polegające na bezpośrednim dostarczeniu mRNA czynników transkrypcyjnych lub koktajlu rekombinowanych białek zmodyfikowanych w taki sposób, aby były aktywnie pobierane przez komórki [19, 31]. Ostatnie badania nad wpływem miRNA na kontrolę ekspresji genów markerowych pluripotencji w komórkach ES zasugerowały możliwość reprogramowania komórek somatycznych z ich wykorzystaniem. Szczególny wpływ wykazano w przypadku miRNA rodziny miR-302 [32].

### **Indukowalne komórki macierzyste – cechy charakterystyczne**

Niezależnie od metody reprogramowania, każda linia komórek IPS musi zostać scharakteryzowana pod względem molekularnym i funkcjonalnym, aby potwierdzić jej pluripotentny charakter. Weryfikuje się go na wiele sposobów, wykazując molekularne, fenotypowe i funkcjonalne podobieństwa pomiędzy komórkami IPS i ES. Niezwykle charakterystyczna jest ich morfologia - mysie komórki IPS rosną w postaci kolonii wysklepionych ku górze, o kopułowym kształcie. Ludzkie komórki macierzyste tworzą płaskie, 2-4 warstwowe kolonie o wyraźnych krawędziach. Charakteryzuje je wysoki stosunek objętościowy jądra do cytoplazmy oraz obecność wyraźnych jąder. Komórki ES posiadają nieograniczony potencjał proliferacyjny, jeden cykl komórkowy trwa około 35 godzin [33]. Najbardziej podstawowym testem molekularnym jest oznaczenie aktywności alkalicznej fosfatazy – jest to najwcześniejszy marker postępu procesu reprogramowania,



jej wysoka aktywność jest obserwowana w komórkach o charakterze embrionalnym. Jest to jednak test wysoce niespecyficzny. W pełni odróżnicowane komórki wykazują profil ekspresji genów markerowych pluripotencji (OCT3/4, SOX2, NANOG, SSEA3, SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81, DNMT3B i REX1) na poziomie porównywalnym do komórek ES, tracąc jednocześnie ekspresję markerów typowych dla komórek wyjściowych w procesie reprogramowania. Najbardziej wiarygodnymi testami potwierdzającymi pluripotencję komórek IPS są analizy funkcjonalne, polegające na przetestowaniu ich potencjału do różnicowania się *in vitro* oraz *in vivo*. Najważniejsze z nich, stosowane w przypadku komórek zwierzęcych, najczęściej mysich, to uzyskiwanie zwierząt chimericznych oraz test tetraploidalnej komplementacji. Pierwsza z nich polega na wszczepieniu analizowanych komórek do blastocyst, w obrębie węzła zarodkowego. W pełni pluripotencjne komórki będą zdolne do zasiedlenia węzła zarodkowego i brania udziału w rozwoju wszystkich tkanek organizmu myszy. Modyfikacją tej metody jest technika tetraploidalnej komplementacji, dzięki której z zarodka rozwija się mysz w całości wywodząca się z testowanych komórek. W odróżnieniu od tworzenia myszy chimericznych, komórki IPS wszczepiane są do tetraploidalnej blastocysty, która bez ich udziału nie jest w stanie wytworzyć żadnej tkanki, poza błonami płodowymi. Wynikiem tego testu potwierdzającym embrionalny charakter jest urodzenie się żywej i płodnej myszy [34]. Wykorzystanie powyższego testu w przypadku komórek ludzkich jest niewykonalne z etycznych i technicznych względów. Potencjał ludzkich komórek można przetestować wszczepiając je podskórną, domięśniowo lub do jąder myszom z obniżoną odpornością (typu Nude, NOD/SCID lub SCID). Środowisko w jakim się znajdują, umożliwia komórkom o charakterze embrionalnym spontaniczne różnicowanie się i uformowanie guzów typu teratoma, zbudowanych z tkanek wywodzących się z trzech listków zarodkowych mezo-, ekto- i endodermy [35]. Analizy *in vitro* obejmują tworzenie tak zwanych ciał embrionalnych – sferycznych struktur, przypominających embrion w trakcie gastrulacji, mających potencjał do różnicowania się w komórki wywodzące się z trzech listków zarodkowych, oraz bezpośrednie różnicowanie komórek IPS poprzez modyfikację warunków hodowlanych. Zastosowanie odpowiednich czynników wzrostu, cytokin i suplementów umożliwia uzyskanie komórek dojrzałych lub progenitorowych, takich jak kardiomiocyty, progenitory komórek neuronalnych i neurony, hepatocyty, chondrocyty, komórki B trzustki i wiele innych. Proces reprogramowania nie pozostaje bez wpływu na integralność genomu komórek. Jednym z punktów weryfikacji linii IPS jest określenie ich kariotypu. Niezależnie od metody generacji komórek IPS w trakcie hodowli mogą pojawić się aberracje chromosomowe, zarówno liczbowe – głównie są to trisomie chromosomów 8 i 13 - jak i strukturalne (amplifikacje i translokacje) [36].

## Zastosowanie komórek macierzystych – teoria i praktyka

Charakterystyczne cechy komórek macierzystych umożliwiają ich szerokie zastosowanie w badaniach podstawowych dotyczących różnicowania, rozwoju embrionalnego czy chorób genetycznych o nieznaną etiologię; w badaniach toksykologicznych oraz medycynie regeneracyjnej. Kardiomiocyty otrzymane z komórek pluripotencyjnych mogą służyć jako model badawczy czynności skurczowej komórek, czasu potencjału czynnościowego mięśnia komór, przepływu jonów wapnia czy też biochemicznych analiz specyficznych kanałów jonowych [37]. Chondrocyty i ich progenitory otrzymane na drodze różnicowania *in vitro* pozwalają na badania nad regeneracją chrząstki stawowej. Ponadto, komórki macierzyste umożliwiają poznanie wpływu radioterapii stosowanej w leczeniu onkologicznym na zdolność tych komórek do różnicowania. Kolejną możliwością zastosowania komórek IPS są badania mechanizmów molekularnych chorób o podłożu genetycznym, dla których stworzenie komórkowego modelu *in vitro* nie jest możliwe bez wykorzystania technologii IPS. Są to choroby degeneracyjne i/lub wielogenowe. W pierwszym przypadku nie jest możliwe pobranie i hodowla *in vitro* komórek dotkniętych patologią ze względu na przedwczesną śmierć komórki. W drugim przypadku trudno jest odtworzyć faktyczny genotyp i fenotyp choroby, zwłaszcza, gdy nie wszystkie geny zaangażowane w procesy chorobotwórcze zostały zidentyfikowane [38]. Dotychczas uzyskano wiele różnych typów komórek z fibroblastów pobranych od pacjentów chorujących na: dystrofię mięśniową Beckera i Duchenne'a, zespół Downa, chorobę Huntingtona, Parkinsona czy też cukrzycę typu pierwszego [39]. Zastosowanie komórek IPS daje możliwość spersonalizowanego badania rozwoju choroby i opracowania optymalnej metody leczenia. Ogromne nadzieje budzi możliwość wykorzystania komórek IPS w medycynie regeneracyjnej (np. w przypadku urazów rdzenia kręgowego, zawału mięśnia sercowego). Do tej pory uzyskano komórki  $\beta$  trzustki syntetyzujące insulinę [40], kardiomiocyty [41], komórki śródbłonna

[42], neurony [43], chondrocyty [44] oraz wiele innych. Komórki IPS, otrzymane z komórek chorego, można modyfikować genetycznie, co daje możliwość naprawy defektu genetycznego komórek, dalszego ich różnicowania, a w końcu przeszczepienia dawcy. Należy podkreślić, że transplantacja autologiczna zmniejsza zagrożenie immunologicznego odrzucenia przeszczepu [45]. Metody te z powodzeniem są stosowane w modelach zwierzęcych. Terapię genową na bazie komórek IPS udało się przeprowadzić u myszy chorujących na anemię sierpowatą [46] czy hemofilię typu A [47].

## **Podsumowanie**

Badania nad procesem reprogramowania i komórkami pluripotentnymi pozwalają na pełne zrozumienie procesów zachodzących w trakcie rozwoju embrionalnego i związanych z nim potencjalnych patologii. Dodatkowo, opracowanie technologii wydajnego otrzymywania komórek IPS daje nadzieje na wykorzystanie ich w przyszłości nie tylko w medycynie regeneracyjnej, ale także w modelowaniu i leczeniu chorób do tej pory uznawanych za nieuleczalne. Metody manipulacji genomem pozwalają na usunięcie z komórek IPS wygenerowanych od pacjenta, mutacji odpowiedzialnej za chorobę, a następnie wykorzystaniem ich w spersonalizowanej terapii pacjenta. Jednakże, zanim komórki IPS będą powszechnie stosowane jako metoda terapeutyczna, konieczne jest przeprowadzenie wielu badań, pozwalających na pełne poznanie ich charakteru, możliwość a przede wszystkim niebezpieczeństw jakie może nieść ich zastosowanie.

## **Konflikt interesu / Conflict of interest**

Nie występuje / None

## **Finansowanie / Financial support**

Artykuł finansowany w ramach grantu wewnętrznego Wielkopolskiego Centrum Onkologii w Poznaniu, nr 11/04/2017/ZP/WCO/0015. / This work was supported by the Greater Poland Cancer Centre intramural grant no 11/04/2017/ZP/WCO/0015.

## **Etyka / Ethics**

Treści przedstawione w artykule są zgodne z zasadami Deklaracji Helsińskiej, dyrektywami EU oraz ujednoliconymi wymaganiami dla czasopism biomedycznych.

## **Piśmiennictwo / References**

- [1] Jackson EB, Brues AM. Studies on a Transplantable Embryoma of the Mouse. *Cancer Research*. 1941;1:494-498.
- [2] Martin GR. 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*. 1981;78:7634-7638.
- [3] Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981;292:154-156.
- [4] Briggs R, King TJ. Transplantation of Living Nuclei From Blastula Cells into Enucleated Frogs' Eggs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1952;38:455-463.
- [5] King TJ, Briggs R. Serial transplantation of embryonic nuclei. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. 1956;21:271-290.
- [6] Di Berardino MA, Orr NH. Genomic potential of erythroid and leukocytic cells of *Rana pipiens* analyzed by nuclear transfer into diplotene and maturing oocytes. *Differentiation; research in biological diversity*. 1992;50:1-13.
- [7] DiBerardino MA, Hoffner NJ. Gene reactivation in erythrocytes: nuclear transplantation in oocytes and eggs of *Rana*. *Science*. 1983;219:862-864.

- [8] DiBerardino MA, Mizell M, Hoffner NJ et al. Frog larvae cloned from nuclei of pronephric adenocarcinoma. Differentiation; research in biological diversity. 1983;23:213-217.
- [9] Gurdon JB. Multiple genetically identical frogs. *The Journal of heredity*. 1962;53:5-9.
- [10] Gurdon JB. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *Journal of embryology and experimental morphology*. 1962;10:622-640.
- [11] Gurdon JB. Adult frogs derived from the nuclei of single somatic cells. *Developmental biology*. 1962;4:256-273.
- [12] Tarkowski AK. Nucleo-cytoplasmic interactions in oogenesis and early embryogenesis in the mouse. *Progress in clinical and biological research*. 1982;85 Pt A:407-416.
- [13] Tarkowski AK, Balakier H. Nucleo-cytoplasmic interactions in cell hybrids between mouse oocytes, blastomeres and somatic cells. *Journal of embryology and experimental morphology*. 1980;55:319-330.
- [14] Czolowska R, Waksmundzka M, Kubiak JZ et al. Chromosome condensation activity in ovulated metaphase II mouse oocytes assayed by fusion with interphase blastomeres. *Journal of cell science*. 1986;84:129-138.
- [15] Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*. 1997;385:810-813.
- [16] Wakayama T, Perry AC, Zuccotti M et al. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*. 1998;394:369-374.
- [17] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*. 2006;126:663-676.
- [18] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131:861-872.
- [19] Bayart E, Cohen-Haguener O. Technological overview of iPS induction from human adult somatic cells. *Current gene therapy*. 2013;13:73-92.
- [20] Kim JB, Greber B, Arauzo-Bravo MJ et al. Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4. *Nature*. 2009;461:649-643.
- [21] Ho PJ, Yen ML, Lin JD et al. Endogenous KLF4 expression in human fetal endothelial cells allows for reprogramming to pluripotency with just OCT3/4 and SOX2--brief report. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2010;30:1905-1907.
- [22] Lai MI, Wendy-Yeo WY, Ramasamy R et al. Advancements in reprogramming strategies for the generation of induced pluripotent stem cells. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2011;28:291-301.
- [23] Huangfu D, Maehr R, Guo W et al. Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nature biotechnology*. 2008;26:795-797.
- [24] Menendez S, Camus S, Izpisua Belmonte JC. p53: guardian of reprogramming. *Cell cycle*. 2010;9:3887-3891.
- [25] Zhou W, Freed CR. Adenoviral Gene Delivery Can Reprogram Human Fibroblasts to Induced Pluripotent Stem Cells. *STEM CELLS*. 2009;27:2667-2674.
- [26] Nishimura K, Sano M, Ohtaka M et al. Development of defective and persistent Sendai virus vector: a unique gene delivery/expression system ideal for cell reprogramming. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286:4760-4771.
- [27] Okita K, Hong H, Takahashi K et al. Generation of mouse-induced pluripotent stem cells with plasmid vectors. *Nat Protocols*. 2010;5:418-428.
- [28] Su R, Neises A, Zhang X-B. Generation of iPS Cells from Human Peripheral Blood Mononuclear Cells Using Episomal Vectors: Humana Press; 2014:1-13.
- [29] Sommer CA, Sommer AG, Longmire TA et al. Excision of Reprogramming Transgenes Improves the Differentiation Potential of iPS Cells Generated with a Single Excisable Vector. *STEM CELLS*. 2010;28:64-74.
- [30] Woltjen K, Michael IP, Mohseni P et al. piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2009;458:766-770.
- [31] Robinton DA, Daley GQ. The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature*. 2012;481:295-305.
- [32] Lin S-L, Chang DC, Lin C-H et al. Regulation of somatic cell reprogramming through inducible mir-302

- expression. *Nucleic Acids Research*. 2011;39:1054-1065.
- [33] Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS et al. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Developmental biology*. 2000;227:271-278.
- [34] Masip M, Veiga A, Izpisua Belmonte JC et al. Reprogramming with defined factors: from induced pluripotency to induced transdifferentiation. *Molecular Human Reproduction*. 2010;16:856-868.
- [35] Wesselschmidt RL. The teratoma assay: an in vivo assessment of pluripotency. *Methods in molecular biology*. 2011;767:231-241.
- [36] Lund RJ, Narva E, Lahesmaa R. Genetic and epigenetic stability of human pluripotent stem cells. *Nature reviews Genetics*. 2012;13:732-744.
- [37] Cantz T, Martin U. Induced pluripotent stem cells: characteristics and perspectives. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2010;123:107-126.
- [38] Chen C, Xiao SF. Induced pluripotent stem cells and neurodegenerative diseases. *Neurosci Bull*. 2011;27:107-114.
- [39] Lengerke C, Daley GQ. Disease models from pluripotent stem cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2009;1176:191-196.
- [40] Zhang D, Jiang W, Liu M et al. Highly efficient differentiation of human ES cells and iPS cells into mature pancreatic insulin-producing cells. *Cell Res*. 2009;19:429-438.
- [41] Lim SY, Sivakumaran P, Crombie DE et al. Trichostatin A Enhances Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells to Cardiogenic Cells for Cardiac Tissue Engineering. *Stem Cells Translational Medicine*. 2013;2:715-725.
- [42] Hoxha E, Kishore R. Induced pluripotent cells in cardiovascular biology: epigenetics, promises, and challenges. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2012;111:27-49.
- [43] Matsui T, Akamatsu W, Nakamura M et al. Regeneration of the damaged central nervous system through reprogramming technology: Basic concepts and potential application for cell replacement therapy. *Exp Neurol*. 2012; pii: S0014-4886(12)00378-0.
- [44] Suchorska WM, Augustyniak E, Richter M et al. Comparison of Four Protocols to Generate Chondrocyte-Like Cells from Human Induced Pluripotent Stem Cells (hiPSCs). *Stem Cell Rev and Rep*. 2016:1-10.
- [45] Cherry ABC, Daley GQ. Reprogrammed Cells for Disease Modeling and Regenerative Medicine. *Annual Review of Medicine*. 2013;64:277-290.
- [46] Hanna J, Wernig M, Markoulaki S et al. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science*. 2007;318:1920-1923.
- [47] Xu D, Alipio Z, Fink LM et al. Phenotypic correction of murine hemophilia A using an iPS cell-based therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:808-813.