

İndüklenmiş pluripotent kök hücreler ve hücre tedavisi

Induced pluripotent stem cells and cell therapy

Banu İskender¹, Halit Canatan²

ÖZET

İnsan embriyonik kök hücreleri embriyonun blastosist aşamasındaki iç hücre kitlesinden elde edilir. Kendi kendilerini sınırsız yenileyebilme özelliklerinin yanında pluripotent olmaları, yani üç farklı embriyonik tabakadan köken alan hücre tiplerine farklılaşabilme potansiyelleri ile hücre tedavisine yönelik büyük umut vaat etmektedirler. Ancak derivasyonlarındaki etik ve yasal problemler nedeniyle, pluripotent özelliklerinin tedavi amaçlı kullanımı henüz gerçekleştirilememektedir. Son yıllarda, erişkin dokulardan elde edilen hücrelerin yeniden programlanarak embriyonik karakter taşıyan pluripotent özellikteki hücrelere dönüşebilecekleri gösterilmiştir. Böylelikle, yeniden programlanan somatik hücrelerin, in vitro olarak istenilen hücre tipine yönlendirilmiş farklılaştırılması ve rejeneratif tıp alanında kullanılma ihtimali kuvvetlenmiştir. Pluripotent özellik kazandırılan bu hücreler indüklenmiş pluripotent kök hücreler olarak tanımlanmış olsa da, pluripotent özelliğin mekanizması henüz tam anlamıyla açıklanmamıştır. Yine de, indüklenmiş pluripotent kök hücre teknolojisi, insan hastalık modellerinin çalışılması, yeni ilaç geliştirilmesi ve hücre tedavisine yönelik yeni yaklaşımlar önermesi açısından önem arz etmektedir. Kendi kendilerini yenileyebilmeleri ve insan vücudundaki tüm hücre tiplerine farklılaşabilme potansiyellerinin yanında, embriyonik kök hücrelerin neden olduğu etik kaygılardan uzak olmaları ve olası hücre tedavisi uygulamalarında hastaya özgü tasarlanabilecek olmaları nedeniyle son yıllarda bilim dünyasında büyük ilgi uyandırmaktadırlar. Bu derlemede geçmişten günümüze indüklenmiş pluripotent kök hücre teknolojisine ve bu hücre grubunun hücre tedavisindeki yerine değinilecektir.

Anahtar kelimeler: İndüklenmiş pluripotent kök hücreler, pluripotent kök hücreler, embriyonik kök hücreler, rejeneratif tıp

GİRİŞ

İnsan embriyonik kök hücreleri blastosist aşamasındaki embriyoların 'iç hücre kitlesi'nden elde edilirler ve kendi kendilerini sınırsız yenileyebilme potan-

ABSTRACT

Human embryonic stem cells are derived from the inner cell mass of a blastocyst-stage embryo. They hold a huge promise for cell therapy with their self-renewing ability and pluripotency, which is known as the potential to differentiate into all cell types originating from three embryonic germ layers. However, their unique pluripotent feature could not be utilised for therapeutic purposes due to the ethical and legal problems during derivation. Recently, it was shown that the cells from adult tissues could be reverted into embryonic state, thereby restoring their pluripotent feature. This has strengthened the possibility of directed differentiation of the reprogrammed somatic cells into the desired cell types in vitro and their use in regenerative medicine. Although these cells were termed as induced pluripotent cells, the mechanism of pluripotency has yet to be understood. Still, induced pluripotent stem cell technology is considered to be significant by proposing novel approaches in disease modelling, drug screening and cell therapy. Besides their self-renewing ability and their potential to differentiate into all cell types in a human body, they arouse a great interest in scientific world by being far from the ethical concerns regarding their embryonic counterparts and their unique feature of being patient-specific in prospective cell therapies. In this review, induced pluripotent stem cell technology and its role in cell-based therapies from past to present will be discussed. *J Clin Exp Invest* 2013; 4 (4): 550-561

Key words: Induced pluripotent stem cells, pluripotent stem cells, embryonic stem cells, regenerative medicine

siyelerinin yanında insan vücudundaki tüm hücre tiplerine farklılaşabilme yeteneğine sahiptirler [1]. Ancak insan embriyonik kök hücrelerinin derivasyonundaki etik sorunlar ve hücrelerin tedaviye yönelik kullanımları sırasında ortaya çıkabilecek immün ce-

¹ Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AD, Kayseri, Türkiye

² Erciyes Üniversitesi Betül-Ziya Eren Genom ve Kök Hücre Merkezi, Kayseri, Türkiye

Correspondence: Banu İskender,

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Melikgazi, Kayseri, Türkiye Email: banuiskender@yahoo.com

Received: 17.06.2013, Accepted: 20.07.2013

Copyright © JCEI / Journal of Clinical and Experimental Investigations 2013, All rights reserved

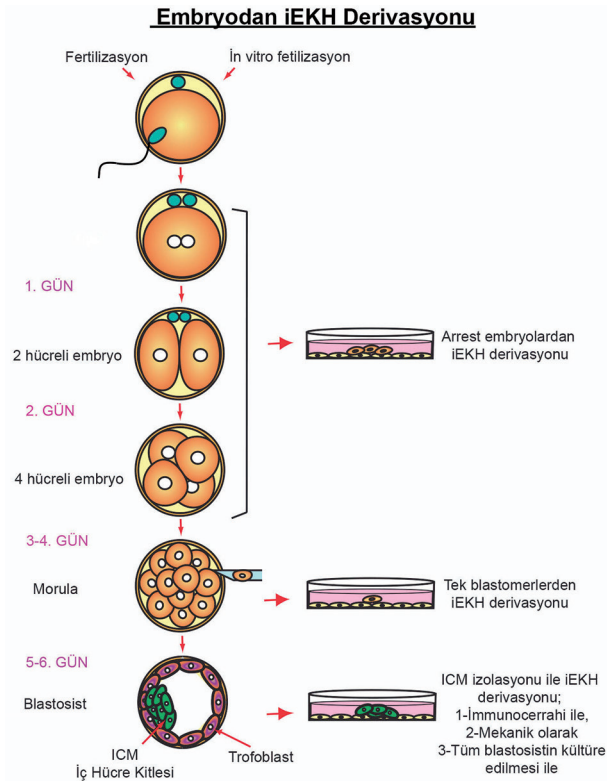
vap nedeniyle bu alandaki çalışmalar negatif yönde etkilenmiştir [2]. Öncesinde Gurdon'un amfibilerle başlattığı somatik çekirdek transferi deneylerinde, farklılaşmış hücre tiplerinin genetik içeriğinin değiştirilmeksizin, yalnızca gen ifadesi değiştirilerek hücrelerin yeniden programlanabileceği ve hücre farklılaşmasının tamamen geri çevrilebileceği gösterilmiştir [3]. Somatik hücrelerin embriyonik kök hücrelerle füzyonu sonrasında pluripotent özellik kazanmalarının ardından, embriyonik kök hücrelerin ve somatik çekirdek transferindeki oositin somatik hücrelere pluripotent özellik kazandırabilecek faktörleri içerdiği fikri gündeme gelmiştir [4,5]. 2006 yılında Takahashi ve Yamanaka, somatik çekirdek transferi deneylerinden yola çıkarak başlattıkları araştırma sonucunda, pluripotent özelliği sağlamakta önemli rol oynayan faktörlerin, farklılaşmış hücre tiplerinin yeniden programlanmasında kullanılabileceğini, fetal ve erişkin fare fibroblastlarına embriyonik özellik kazandırarak göstermişlerdir [6]. Takahashi ve Yamanaka'nın geliştirdiği bu teknikte, embriyonik kök hücre karakterinin oluşumu üzerinde rol oynadığı düşünülen 24 gen seçilmiş ve bu aday genlerden 4 tanesinin hem fare hem de insan somatik hücrelerindeki ektopik ekspresyonu ile farklılaşmış hücrelerin pluripotent özellik kazandığı görülmüştür [6,7]. Bu buluşun ardından, aralarında fare, insan, sıçan, tavşan, köpek, domuz ve primatların da bulunduğu birçok farklı organizmadan elde edilen terminal farklılaşmasını tamamlamış hücrelerin gen ifadesinin değiştirilmesi ile indüklenmiş pluripotent kök hücrelere dönüşebildiği gösterilmiştir [8-14]. Sonraki çalışmalar, kullanılan transkripsiyon faktörlerinin (Oct-4, Sox-2, Klf-4, c-Myc) sayısının azaltılması, onkojenik karakterdeki transkripsiyon faktörlerinin (Klf-4 ve c-Myc) kullanımının sınırlandırılması ile bu faktörlerin hücreye transfer edilme metodunun değiştirilerek indüklenmiş pluripotent kök hücrelere viral genomun entegrasyon riskinin azaltılması yönünde olmuştur. İndüklenmiş pluripotent kök hücrelerin üretiminde şimdiye kadar lentiviral, retroviral, epizomal vektörler, entegre olmayan adeno ve sendai virüsleri, Cre ve piggyBac transpozon sistemleri, plazmit, küçük kimyasal bileşenler, rekombinant proteinler kullanılmış ve oluşturulan tüm hücrelerin kullanılan metot farklılıklarına bakılmaksızın embriyonik hücre karakteri kazandıkları gösterilmiştir [3,8,10-12,15-20]. Yamanaka'nın belirlediği 4 transkripsiyon faktörü dışında, Nanog ve Lin28 de insan ve fare hücrelerinin yeniden programlanması sırasında kullanılmıştır [9,21]. Bu faktörlerden Oct-4, Sox-2 ve Nanog zaten embriyo ve embriyonik kök hücrelerdeki pluripotent özelliğin sağlanması için üretilen proteinleri kodlarlar [22-24]. c-Myc ve Klf-4'ün yeniden programlama sıra-

sında hücre çoğalması ile senesens ve apoptoz arasındaki dengeyi sağladığı ve Oct-4 ile Sox-2'nin kontrol ettikleri gen gruplarını baskılamaları ya da aktive etmelerine yardımcı oldukları düşünülmektedir [25,26]. Klf-4 ve c-Myc'nin embriyonik kök hücre fenotipinin oluşumuna katkıda bulunmalarının yanında özellikle tümör hücrelerinde yoğun bir şekilde eksprese edildikleri bilinmektedir [27,28]. Ancak onkojenik potansiyelleri olan bu iki transkripsiyon faktörünün yerine Lin28 ve Nanog'un kullanımı ile de indüklenmiş pluripotent kök hücrelerin oluşturulabileceği bilinmektedir [9]. İndüklenmiş pluripotent kök hücre üretiminin etkinliği, kullanılan transkripsiyon faktörlerine ve tekniğe göre değişmektedir. Örneğin; özellikle Nanog ve Oct-4'ün aktivasyonu ve kontrol ettikleri gen ekspresyonu sonrasında oluşturulan indüklenmiş pluripotent kök hücrelerin, embriyonik kök hücrelere hem epigenetik profilleri hem de farklılaşma potansiyelleri açısından daha çok benzedikleri görülmüştür [29,30]. Bu durum, her transkripsiyon faktörü tarafından kontrol edilen alternatif moleküler mekanizmaların çekirdeğin yeniden programlanmasını sağladığı ya da kullanılan faktörlerin birbirine benzer etkilerinin pluripotent özelliğin kazanılmasında rol aldığını düşündürmektedir. İlginçtir ki, fare ve insan embriyonik kök hücrelerinin pluripotent özelliğini sağlayan mekanizmalar birbirinden çok farklı olduğu bilinse de, fare ve insan somatik hücrelerinin yeniden programlanmasında kullanılan transkripsiyon faktörleri ve yöntemler pluripotent özelliğin ortak bir mekanizma ile kontrol edildiği fikrini gündeme getirmiştir [31]. Bugüne kadar indüklenmiş pluripotent kök hücre üretiminde umut vadeden gelişmeler olsa da, somatik hücrelere embriyonik karakter kazandırılması ve bu hücrelerin yönlendirilmiş farklılaştırılması halen çok yeni ve olası hücre tedavi uygulamaları için geliştirilmesi gereken bir teknoloji gibi görünmektedir. Bu amaçla pluripotent özelliğin ve bu özelliği kontrol eden sinyal yollarının iyi anlaşılması gereklidir.

Pluripotent özellik nedir?

Kök hücreler farklılaşma potansiyellerine göre unipotent, multipotent, pluripotent ve totipotent olarak gruplandırılırlar [32,33]. Unipotent kök hücreler bir tek farklılaşmış hücre tipini oluşturabilirler. Totipotent kök hücreler tüm embriyonik dokulardaki özelleşmiş hücrelerle birlikte plasenta gibi ekstraembriyonik dokulara farklılaşarak tam bir organizmayı oluşturabilirler [34]. Multipotent kök hücreler ise genelde kendileriyle aynı embriyonik tabakayı temsil eden, sınırlı sayıda hücre tipine farklılaşabilme potansiyeline sahiptirler [32]. Pluripotent özellik üç embriyonik tabakayı (endoderm, mezoderm, ektoderm) temsil eden hücre tiplerine farklılaşabilme özelliği olarak

tanımlanabilir. Embriyonik kök hücreler pluripotent olmalarının yanında sınırsız çoğalma ve kendi kendilerini yenileyebilme özellikleri ile birçok hastalığın tedavisinde kullanılacak somatik hücre stoğunu üretmekte kullanılabilirler [1]. Embriyonun blastosist evresindeki iç hücre kitlesinden elde edilen embriyonik kök hücreler endoderm, ektoderm ve mezodermi temsil eden hücre tiplerine farklılaşabilir ve hepatositler, sinir hücreleri, kalp kası hücreleri gibi terminal farklılaşmasını tamamlamış hücre tiplerini oluşturabilirler (Şekil 1).



Şekil 1. Embryodan pluripotent hücre elde edilmesi

İnsan embriyonik kök hücre üretimi fertilizasyon sonrası embriyonun farklı aşamalarından yapılabileceği gibi, en yaygın kullanılan yöntem blastosist evresindeki iç hücre kitlesinin izolasyonu ve in vitro ekspansiyonudur.

iEKH: insan embriyonik kök hücreleri; ICM: 'inner cell mass- iç hücre kitlesi.

Çekirdek transferi, hücre füzyonu ve transkripsiyon faktörlerinin ektopik ekspresyonlarının sağlandığı araştırmalara kadar, terminal farklılaşmasını tamamlamış hücrelerin kaderinin değişmeyeceği düşünülmekteydi. Ancak özelleşmiş somatik hücrelerin embriyonik hücrelerin içerdiği tüm genetik bilgiye sahip olduğu ve uygun koşullar sağlandığında (mikroçevre, gen ifadesinin değişimi vb.) emb-

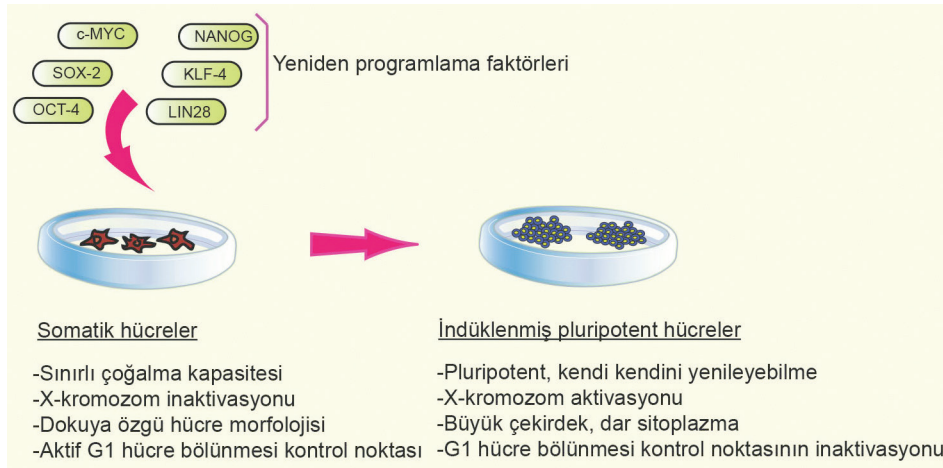
riyonik karakterdeki hücrelere dönüşebilecekleri gösterilmiştir [6,35,36]. İn vitro ve in vivo embriyonik kök hücrelerin pluripotent özelliği Nanog, Sox-2 ve Oct-4 transkripsiyon faktörlerinin eşzamanlı ekspresyonlarına dayanır ancak in vivo embriyonik kök hücrelerin pluripotent özelliği bu hücrelerin kendi kendilerini yenileyememeleri nedeniyle gelişimin ilerleyen aşamalarında kaybolmaktadır [37]. İn vitro embriyonik kök hücrelerin ise besleyici hücrelerle kültüre edildiklerinde pluripotent karakterlerini sınırsız bölünebilme kapasiteleri ile korudukları gösterilmiştir [38]. Normal karyotipini koruyarak kendi kendini yenileyebilen embriyonik kök hücrelerin pluripotent özellikleri, in vivo olarak ağır kombine immün yetmezlik sendromu (SCID) gösteren farelerin testis kapsülüne enjekte edilmeleri sonrasında, üç germ tabakasını temsil eden hücreleri içeren teratoma oluşturmaları ile gösterilir [39,40]. İn vitro farklılaşma potansiyeli ise uygun kültür koşullarının (besleyici hücreler, büyüme faktörleri) ortamdandırılması ile embriyonik kök hücrelerin üç boyutlu agregatları yani 'embrioid cisimcikleri' oluşturmaları ile gösterilebilir. Embrioid cisimcikler morfolojik olarak, merkezi kavitenin primitif endoderm benzeri hücre katmanıyla çevrelediği hücre yığınlarına benzerler ve ortalama 21 gün sonrasında endoderm, mezoderm ve ektoderm tabakalarına ait hücre tiplerine özgün moleküler belirteçleri eksprese ederler [41,42]. Embriyonik kök hücrelerin kültür ortamında ve iç hücre kitlesinde epigenetik yönden de farklılık gösterdikleri bilinmektedir. İn vitro pluripotent hücrelerin genomlarında yüksek metilasyon görülürken, embriyogenezde iç hücre kitlesini oluşturan hücrelerde metilasyonun düşük derecede olduğu gösterilmiştir [43].

Pluripotent hücreler fare embriyosunun farklı aşamalarından elde edilebilirler. Epiblast kök hücreleri olarak adlandırılan bu hücre grubu embriyo implantasyonundan sonra (5.5-7.5 günler) iç hücre kitlesinden farklılaşarak epiblastı oluşturan epitelial hücrelerden elde edilirler. İnsan embriyonik kök hücreleri gibi in vitro kültür ortamında FGF2 (Fibroblast büyüme faktörü 2) ve Aktivin desteğine ihtiyaç duyarlar, pluripotenttirler ve embrioid cisimcik-teratoma oluşumu gösterirler [44]. Her ne kadar pluripotent hücreler olarak değerlendirilseler de sınırlı farklılaşma potansiyelleri vardır, X kromozomu inaktivasyonu gösterirler ve kimerik canlı oluşturmada embriyonik kök hücreler kadar etkin değildir [45]. Fare embriyosundaki (8.5 gün) primordial germ hücrelerinin de embriyonik kök hücrelere benzer karakterde olduğu ve in vitro kültür sonrasında teratoma ve kimerik canlı oluşturma potansiyeline sahip olduğu gösterilmiştir [46]. Tüm bu pluripotent hücre tiplerinde, pluripotent özelliğin kontrolü ve

devamının sağlanmasında rol alan evrensel bir mekanizmanın var olup olmadığı henüz bilinmemekle birlikte, şimdiye kadar birçok intrinsik ve ekstrinsik faktörün pluripotent özelliği sağlanması için gerekli olduğu tespit edilmiştir.

Oct-4 tüm pluripotent hücrelerde eksprese edilen POU (Pit-1, Oct-1, Oct-2, and Unc-86) domaini içeren transkripsiyon faktörüdür ve ekstraembriyonik dokuların oluşması ile ekspresyonunun düştüğü görülmüştür [22,47]. Başlangıçta tüm blastomerlerde görülen ekspresyon, blastosist evresinde iç hücre kitlesindeki hücrelerle sınırlı kalır ve erişkin memeli organizmalarda Oct-4 ekspresyonu yalnızca germ hücrelerinde görülür [48]. Oct-4 ekspresyon kaybı, fare embriyolarında gelişimin durmasına, iç hücre kitlesindeki hücrelerin pluripotent özelliklerini kaybetmelerine ve yalnızca trofektodermin gelişmesine neden olur [22]. Oct-4'ün aşırı ekspresyonu ise endodermal ve mezodermal farklılaşma ile sonuçlanır [49]. Sox-2 de, Oct-4 gibi pluripotent özelliğin sağlanması için gereklidir. Sox-2 ekspresyonu oositte

başlar, iki hücreli embriyoda görülür, 4 ve 8 hücreli aşamalardan morula evresine kadar ekspresyonu artarak devam eder ve blastosist evresinde iç hücre kitlesinde görülmekle birlikte bazı trofektoderm hücrelerinde de eksprese edildiği bilinmektedir [23,50]. Preimplantasyon fare embriyolarında Sox-2 ekspresyonunun inhibisyonu morula aşamasından öteye geçilememesiyle sonuçlanır [50]. İn vitro Sox-2 inhibisyonu sonucunda ise trofektoderm farklılaşması görülür [51]. Sox-2 ve Oct-4'ün dimer oluşturarak aralarında Nanog'un da olduğu birçok genin ekspresyonunu yönettiği bilinmektedir [52]. Nanog ekspresyonu morula aşamasında başlar, blastosist evresinde iç hücre kitlesindeki hücrelerde görülür ve sonrasında ekspresyonu epiblastla sınırlı kalır [53,54]. Nanog'un aşırı ekspresyonu fare ve insan embriyonik kök hücrelerinde büyüme faktörü eklenmesine gerek kalmadan in vitro pluripotent özelliğin korunması için yeterlidir [54,55]. Buna karşın, Nanog gen delesyonu ile ekstraembriyonik dokulara farklılaşma ve Oct-4, SSEA-4 transkripsiyonlarında azalma görülür [54,56].



Şekil 2. Somatik hücrelerin yeniden programlanarak pluripotent özellik kazanmaları.

Mitsui ve ark. (2003) fare embriyonik ve epiblast kök hücrelerinde pluripotent olmayan hücrelere oranla artmış ekspresyonu görülen 20 civarında geni belirlemesiyle başlayan çalışmalar sonrasında Takahashi ve Yamanaka'nın fare fibroblastlarında bu faktörlerin farklı kombinasyonlarını kullanarak somatik hücrelerden indüklenmiş pluripotent kök hücreler elde etmeleriyle, pluripotent özelliğin intrinsik kontrol mekanizmasına ait önemli ipuçları elde edilmiştir [6,54]. Oct-4, Sox-2, Klf-4, c-Myc, Lin 28 ve Nanog somatik hücrelerin yeniden programlanmasında kullanılan başlıca transkripsiyon faktörleri olarak belirlense de, özellikle histon modifikasyonlarını değiştiren kimyasal maddelerin ve hücrelerin bulunduğu kültür koşullarının (sitokinler, büyüme faktörleri, serum, besleyici hücreler vb.)

da pluripotent özelliğin kazanılması ve korunması için önemli olduğu görülmüştür (Şekil 2) [16,57-59]. Hücre dışı faktörlerin pluripotent özelliği nasıl etkilediği henüz bilinmemekle birlikte, bu sinyallerin pluripotent özellik genlerini aktive ettiği ve farklılaşmayı sağlayan genleri baskıladığı düşünülmektedir [58,60]. Örneğin; LIF aracılı sinyal mekanizmasının transkripsiyon faktörü STAT3'ü ve ona bağlı pluripotent özellikle ilgili genleri aktive ettiği bilinmektedir [61,62]. Yine, TGFβ/Aktin/Nodal ve BMP (kemik morfogenetik protein) sinyal yollarının embriyonik kök hücrelerin ve pluripotent özelliğin sağlanmasında rol aldığı bilinmektedir [63]. TGFβ/Aktin/Nodal sinyal mekanizmasının Smad 2/3 fosforilasyonuna neden olarak Oct-4 ve Nanog gibi pluripotent özellikle ilgili genlerin ekspresyonunu etkilediği gösteril-

miştir [64,65]. Nodal, pluripotent insan embriyonik kök hücrelerinde aşırı eksprese edilir ve farklılaşma sonrasında Nodal gen ifadesinde azalma görülür [66]. Aktivin, pluripotent kök hücrelerin in vitro kültür ortamında kullanılan fare embriyonik kök hücrelerinden elde edilen besiyeri içeriğinde yüksek oranda bulunmaktadır [63,67]. Aktivin in vitro kültür ortamından uzaklaştırılması insan embriyonik kök hücrelerin pluripotent özelliklerini kaybedip farklılaşmalarıyla sonuçlanır [67]. Aktivin pluripotent özellik üzerindeki bu etkisi, Nanog gen ifadesini direkt olarak Smad 2/3 fosforilasyonunu etkileyerek düzenlemesine bağlıdır [68]. BMP-4 sinyal yolağının ise insan embriyonik kök hücrelerinde Oct-4 ve Nanog ekspresyonunu azalttığı ve farklılaşmayı indüklediği gösterilmiştir [69].

Pluripotent özelliğin terminal farklılaşmasını tamamlamış somatik hücrelere kazandırılması yeniden programlama faktörleri kullanılarak gerçekleştirilebilir. İndüklenmiş pluripotent hücreler embriyonik pluripotent hücrelerdeki kendi kendini sınırsız yenileyebilme ve embriyonik dokulara farklılaşabilme özelliklerine sahip olmalarına rağmen epigenetik farklılıklar nedeniyle tam anlamıyla bir yeniden programlama bugünkü mevcut sistemlerle mümkün gibi görünmemektedir.

FGF-2 (fibroblast büyüme faktörü), insan embriyonik kök hücrelerinin pluripotent özelliğinin korunmasında etkili diğer dış faktördür. FGF ailesine ait ligandlar tirozin kinaz aktivitesine sahip dört farklı reseptör üzerinden etkilerini göstererek MAPK, ERK (ekstrasellüler sinyalle düzenlenen kinaz) 1/2, PI-3K/Akt (fosfatidilinozitol-3' kinaz/Akt) gibi hücre içi sinyal moleküllerini aktive ederler [70,71]. Bu moleküller insan embriyonik kök hücre farklılaşması, çoğalması ve pluripotent özelliğini etkileyen gen ifadesini düzenlerler [63]. İn vitro insan embriyonik kök hücre kültüründe FGF-2 takviyesi pluripotent özelliğin devamı için şarttır ve pluripotent insan embriyonik kök hücrelerinin, FGF reseptörleri ile ligandlarını ifade ettiği gösterilmiştir [72-75]. Aktivin A'nın asıl etkisinin, BMP'nin baskılanmasının yanında insan embriyonik kök hücrelerinde FGF-2 ekspresyonunun indüklenmesiyle gösterildiği bilinmektedir [76]. FGF-2'nin pluripotent özellik üzerinde pozitif etkilerinin gösterebilmesi aynı zamanda aktif bir TGFβ/Aktivin/Nodal sinyal mekanizmasına bağlıdır. Aktivin, Nodal ve TGF-β1 reseptörleri olan ALK-4, -7 ve -5'in inhibisyonu sonucunda farklılaşan insan embriyonik kök hücrelerin pluripotent karakteri, besiyerine FGF-2 desteğine rağmen kurtarılamaz [77]. Bu durum, ne FGF-2'nin ne de Aktivin A'nın tek başına in vitro pluripotent kök hücre kültürünü destekleyemediğini göstermektedir [68,78]. FGF-2 ile aktive olan

sinyal moleküllerinden PI-3K/Akt'nin inhibisyonu, insan embriyonik kök hücrelerde pluripotent özelliğin kaybına neden olur [79,80]. PI-3K sinyal yolu Aktivin ve Nodal'ın insan embriyonik kök hücreleri üzerindeki farklılaştırma etkisini baskılayarak pluripotent özelliğin korunmasına yardımcı olur [81]. Birbirinden bağımsız iki dış faktörün pluripotent özelliğin devamını sağlamak için bir denge içerisinde çalışması gereklidir. Son yıllarda bu mekanizma PI-3K/Akt'nin doğrudan Raf molekülüne bağlanıp Raf/MEK/ERK sinyal yolağını baskılaması ve bunun üzerine GSK3β'nin inaktivasyonunun artarak düşük β-katenin seviyesine neden olmasıyla açıklanmıştır. Azalan β-katenin seviyesi Smad 2/3 aracılı mezodermal farklılaşmaya izin vermez ve bu şekilde pluripotent özellik devam ettirilmiş olur [82,83]. Özetle, in vitro kültür sistemlerinde kullanılan FGF ve Aktivin moleküllerinin aktive ettikleri sinyal mekanizmaları ortaklaşa çalışarak pluripotent özelliğin korunmasında görev alırlar, in vitro kültür ortamında bu faktörler arasındaki dengenin artma ya da azalma yönünde bozulması halinde pluripotent özellik kaybolarak, farklılaşma ile ilgili sinyal mekanizmaları aktive edilir. Tüm bu bilgiler ışığında, pluripotent özelliğin son derece karmaşık bir mekanizma ile yönetildiği söylenebilir. Bu nedenle indüklenmiş pluripotent kök hücre üretilmesinde yalnızca genetik faktörlerin değil, hücre dışı faktörlerin de etkisinin hesaba katılması, uzun süreli ve karyotipik olarak normal pluripotent hücre dizilerinin elde edilmesi ve tedaviye yönelik kullanımları açısından önemlidir.

Birçok somatik hücre yeniden programlanabilir

Yeniden programlama için uygun hücre tipinin seçilmesi hastaya özel hücre üretimi ve hücre tedavisinde gözönünde bulundurulması gereken önemli bir konudur. Teorik olarak en ideal hücre tipi, mümkün olan en az invazif yöntemle elde edilebilecek ve yeniden programlanma etkinliği yüksek olan hücrelerdir. Şimdiye kadar fibroblastlar başta olmak üzere birçok farklı hücre tipi yeniden programlanmıştır. Dermal fibroblastlar, özellikle riski düşük materyal eldesi ve kolay in vitro kültürleri ile indüklenmiş pluripotent kök hücre üretimi için ideal olsa da, yeniden programlanma etkinlikleri %0.01'in altındadır [16,84]. Dermal fibroblastların yeniden programlanmadaki düşük etkinlikleri, diğer hücre tiplerine göre terminal farklılaşmanın ileri aşamalarında bulunmaları, bu nedenle pluripotent özelliği yeniden kazanmaları için daha fazla enerji harcanmasını gerektirmelerinden kaynaklanmaktadır [85]. Bu nedenle dermal fibroblastların yeniden programlanması sonrası indüklenmiş pluripotent kolonilerin üretilmesi için en az 4 haftalık bir sürenin geçmesi gereklidir. Nöral kök hücrelerin tek bir transkripsiyon faktörü

kullanılarak (Oct-4) yeniden programlanabilecekleri gösterilmiş olsa da, teknikte sağlayacağı bu üstünlüğe rağmen, elde edilmesi zor bir hücre grubu oldukları için araştırmalarda tercih edilme olasılıkları düşüktür [86]. Sünnet derisinden elde edilebilen keratinositler kolay ulaşılabilecek bir hücre grubu olmasına karşın, in vitro kültürde çoğaltılmaları sınırlıdır. Ancak yenidoğan ya da juvenil keratinositlerin yeniden programlanma etkinlikleri dermal fibroblastlara oranla 100 kat daha fazladır [87,88]. CD34+ periferik kan hücreleri de Yamanaka faktörleri kullanılarak yeniden programlanabilir [89]. İlk çalışmalarda periferik kandaki CD34+ hücre sayısını artırmak amacıyla hastalar birçok yan etkisi olabilen G-CSF mobilizasyonuna tabi tutulmuşlardır [90]. Amniyotik sıvıdan elde edilen CD34+ hücrelerin tek bir transkripsiyon faktörü (Oct-4) kullanılarak pluripotent kök hücre elde edilmesi ile onkojenik karakterdeki transkripsiyon faktörleri Klf-4 ve c-Myc ortamdan eline edilerek hem güvenli hem de etkin bir yeniden programlanma tekniğinin indüklenmiş pluripotent kök hücre elde etmekte kullanılabileceği gösterilmiştir [91]. Son dönemdeki çalışmalarda tasarlanan ve viral entegrasyon riski içermeyen yeniden programlama stratejileri sonucundaki indüklenmiş pluripotent kök hücre eldesinin, literatürdeki benzer çalışmalardan yüksek olduğu gösterilmiştir [92-94]. Adipoz doku kök hücreleri adipoz dokudan lipoaspirasyon sonrasında kolaylıkla elde edilebilen heterojen multipotent projenitör hücre grubudur [95]. Multipotent oldukları için dermal fibroblastlara oranla farklılaşmanın daha erken aşamalarında bulunurlar ve yeniden programlanma için daha ideal bir hücre grubunu temsil ederler. Adipoz doku kök hücreleri her yaş grubundaki bireyden yeterli sayıda elde edilebilir ve yeniden programlama öncesi in vitro kültür ekspansiyonuna gerek duyulmaz [96]. Adipoz doku kök hücrelerinin yeniden programlanma etkinliği dermal fibroblastlara oranla yaklaşık olarak 20 kat daha fazla ve iki kat daha hızlıdır. Farklı çalışmalarda etkinliği yüksek olan bu sistemin güvenilirliğini de artırmak amacıyla, c-Myc transkripsiyon faktörü kullanmadan ve viral olmayan metotlar kullanılarak indüklenmiş pluripotent kök hücreler üretilerek bu hücrelerin olası hücre tedavisinde kullanımlarına bir adım daha yaklaşmıştır [97,98].

Göbek kordonundan elde edilen CD133+ kan hücreleri de yalnızca Oct-4 ve Sox-2 kullanılarak yeniden programlanabilir [99,100]. Göbek kordonundan elde edilen hücreler yenidoğandan elde edildikleri için somatik mutasyona uğramış olma ihtimalleri düşüktür, bu nedenle yeniden programlama için uygun hücre grubunu oluştururlar. Ancak hematopoietik kök hücreleri de içeren bu heterojen hücre grubundan hastaya özel indüklenmiş pluripotent

kök hücre tasarlanması yalnızca doğum sonrası kordon bankacılığı yapılmış bireylere uygulanabilir [101,102]. Göbek kordonundan elde edilen mononükleer hücrelerin yeniden programlanma etkinliği fibroblastlardan 100 kat daha fazladır ve bir-üç haftaya kadar daha kısa sürer [103]. Göbek kordonundan elde edilen hücreler periferik kan hücrelerinde uygulanan herhangi bir seleksiyon ya da hücre tipine yönelik zenginleştirmeye gerek kalmadan yeniden programlanabilir [103-105].

İndüklenmiş pluripotent kök hücrelerin kullanım alanları ve gelecekteki yaklaşımlar

İndüklenmiş pluripotent kök hücrelerle ilgili ilk çalışmalar hasarlı dokunun yeniden programlanmış hücrelerin, transplantasyonu sonrasında istenilen hücre tipine dönüşerek tamir edilebileceği fikriyle başlamıştır. Hastadan elde edilecek indüklenmiş pluripotent kök hücrelerin rejeneratif tıp alanında kullanımı, bugüne kadar geliştirilen yeniden programlama teknikleri konak hücre genomuna entegrasyon riski taşıyan lentiviral ve retroviral vektörlerin kullanımına dayandığı için, hayvan modelleri dışında mümkün olmamıştır. Transgenlerin yeniden programlanacak hücrelerde ektopik ekspresyonu hücre tedavisinde kullanılması hedeflenen indüklenmiş pluripotent kök hücreler için istenmeyen sonuçlara neden olabilir. Her ne kadar şimdiye kadarki çalışmalarda dermal fibroblastlar, mide ve karaciğer gibi farklı hücre tiplerinden elde edilen indüklenmiş pluripotent kök hücrelerdeki klonlarda hiçbir ortak viral genom entegrasyon bölgesi saptanmamış olsa da, indüklenmiş pluripotent kök hücre eldesinde güvenli tekniklerin geliştirilmesi şarttır [106,107].

Henüz hücre tedavisinde kullanımları için erken olsa da, indüklenmiş pluripotent kök hücreler kişiye özel ilaç tasarımı ve tedavi yönteminin geliştirilmesi için uygun hastalık modelleri geliştirilmesinde kullanılmaktadır. Örneğin; indüklenmiş pluripotent kök hücrelerin uzun QT sendromu hastalık modelleri oluşturulmasında kullanılabildiği gösterilmiştir. Potasyum kanallarının oluşumundan sorumlu genlerdeki mutasyonlarla ilişkili bir kardiyak bozukluk olan uzun-QT sendromunda, hastalarda ortaya çıkan klinik çeşitlilik genetik değişkenliğe bağlanmaktadır. Hastalardan elde edilen dermal fibroblastların yeniden programlanmasıyla, bu hücrelerin fonksiyonel kalp kası hücrelerine dönüşebildiği gösterilmiştir [108]. Hastalığın tüm elektrofizyolojik özelliklerini gösteren bu hücrelerde hastalık fenotipinin potasyum kanal blokerlarıyla kötüleştiği, kalsiyum ve geç sodyum kanal blokerları kullanıldığında iyileştiği gösterilmiştir [109,110].

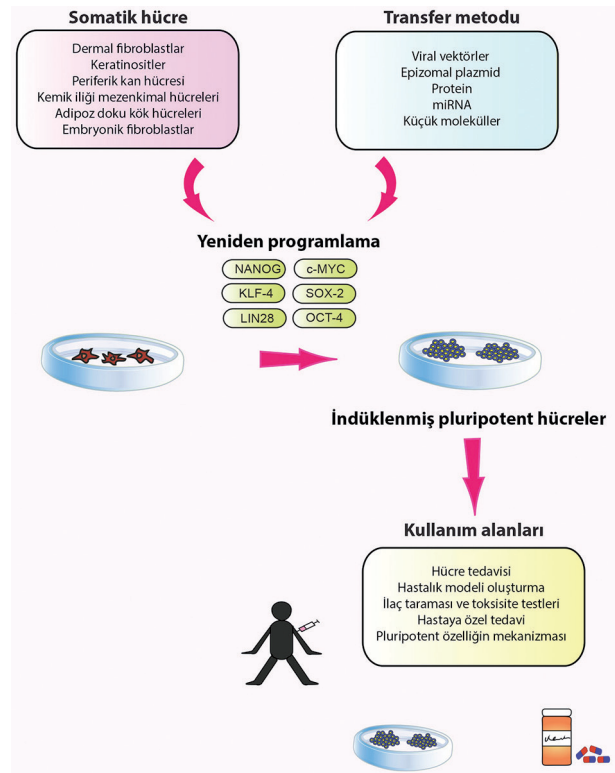
Her ne kadar birçok hastalıkla ilgili değişik mutasyonlar saptanmışsa da, hastalıklarda primer olarak etkilenen hücre grubu ve mutasyonların patolojiyle ilgisi tam olarak anlaşılamamıştır. Bu amaçla indüklenmiş pluripotent kök hücreler kullanılarak Down Sendromu, β -talasemi, Alzheimer, Parkinson ve Huntington gibi birçok hastalığın modelleri oluşturulmuştur. Böylelikle hastalık etiyolojisinin in vitro takibi ve kullanılacak ilaç etkisinin tedavi öncesinde gösterilmesi sağlanmıştır [111-114]. İndüklenmiş pluripotent kök hücrelerin klinik uygulamalarda kullanılabilmesi için genoma müdahale edilmeden, karyotipik olarak uzun süre stabil kalabilen yeniden programlanmış hücreler oluşturulmalı ve bu hücrelerin istenilen doku tipine yönelik etkin farklılaştırmaları sağlanmalıdır. Şimdilik sadece hayvan modellerinde olmakla birlikte, gen terapisi ve indüklenmiş pluripotent kök hücre teknolojisi kullanılarak orak hücreli anemi, Fankoni anemisi ve hemofilinin tedavi edilebileceğini gösteren birçok çalışma mevcuttur [115-117]. Yine, indüklenmiş pluripotent kök hücrelerin retina hücrelerine farklılaştırılmasının ardından fare ve domuz gibi hayvan modellerine transplantasyonu sonucunda tümör gelişimi göstermeyerek görme fonksiyonunu düzelttiğini gösteren çalışmalar, benzer modelin insan uygulamaları için umut vadeden bir gelişmedir [118, 119].

Hastalık modellerinin indüklenmiş pluripotent kök hücreler kullanılarak yapılabilmesi hem hastalığın seyri hakkında bilgi sahibi olunmasını sağlayacak hem de edinilen genetik bilginin yanında ortaya çıkabilecek olası hastalık fenotipleri de saptanabilecektir. Yalnızca kalıtsal değil aynı zamanda hastalığın sporadik formları için de hastalık modelleri oluşturularak, hayvan modelleri ve klinik çalışmalarla gerçekleştirilemeyen kişiye özel tedavi geliştirilmesinin yolu açılacaktır (Şekil 3).

Farklı somatik hücre tipleri yeniden programlama faktörlerinin değişik kombinasyonları kullanılarak indüklenmiş pluripotent hücreler üretilebilir. İndüklenmiş pluripotent hücre üretiminde kullanılan transfer metotları, tekniğin etkinliğini ve son ürün verimini değiştirmektedir. İndüklenmiş pluripotent hücrelerin in vitro yönlendirilmiş farklılaşmasıyla farklılaşmanın temel mekanizmaları çalışılabilir gibi, hastalık modelleri oluşturulabilir, hastalığa ve kişiye özgü ilaç ve hücre tedavisi stratejileri geliştirilebilir.

İndüklenmiş pluripotent kök hücre teknolojisinin klinik uygulamalarda hayata geçirilmesinin önündeki en büyük engel, elde edilen indüklenmiş pluripotent kök hücre dizilerinin tümünde pluripo-

tent özelliği kontrol eden ana faktörler dışındaki gen ifadelerinin, epigenetik düzenlenmelerinin ve farklılaşma potansiyellerinin değişiklik göstermesidir [120,121]. Bu durum lentiviral ya da retroviral vektörler gibi genom entegrasyon ihtimali olmayan vektörler kullanılarak geliştirilen indüklenmiş pluripotent kök hücrelerde de aynıdır [122]. İndüklenmiş pluripotent kök hücrelerdeki gen ifadesinin başlangıç hücre popülasyonu ve embriyonik kök hücrelerinkinden farklı olduğu bilinmekle birlikte bu farklılığın indüklenmiş pluripotent kök hücrelerin yönlendirilmiş farklılaşmasını etkileyip etkilemediği henüz bilinmemektedir [120]. Kullanılan transkripsiyon faktörleri, yöntem, gen transfer vektörlerindeki farklılıkların yanında, in vitro kültür mikroçevresinin de indüklenmiş pluripotent kök hücre dizileri arasındaki farklılıkları artırdığı gözlenmiştir [32, 123, 124].



Şekil 3. Yeniden programlama ve indüklenmiş pluripotent hücrelerin kullanım alanları.

Şimdiye kadar indüklenmiş pluripotent kök hücreler kullanılarak birçok başarılı hastalık modeli geliştirilmiş ve hayvan hastalık modellerinde hücrelerin tedavi edici özellikleri gösterilmişse de, klinik uygulamalar öncesinde indüklenmiş pluripotent kök hücre üretiminde standart ve güvenli bir metodun geliştirilmesi gerekmektedir.

SONUÇ

İndüklenmiş pluripotent kök hücre teknolojisi bugün Yamanaka'nın tasarladığı ilk halinden çok ileride ve geliştirilen gen transfer yöntemleri ve sınırlı sayıda faktör kullanımı ile hücre tedavisine bir o kadar daha yakındır. Ancak halen yeniden programlanmanın moleküler mekanizması tam olarak aydınlatılamamış ve kullanılan faktörlerin her birinin rolü çözülememiştir. Şimdiye kadar farklı somatik hücre tiplerinden üretilen indüklenmiş pluripotent kök hücrelerin, embriyonik kök hücrelerle aynı morfolojik özellikleri gösterdikleri, gen ifadelerinin benzer olduğu, in vivo teratoma oluşturma ve kimerik canlı üretebilme yetenekleri ile pluripotent özelliğin temel şartlarını sağladıkları bilinse de, bu iki hücre tipinin farklılaşma yeteneklerinin aynı olup olmadığı tartışma konusudur. Cevaplanması gereken bir diğer soru, yeniden programlanma sırasında epigenetik hafızanın tamamen silinip silinmediğidir. Embriyonik kök hücrelerle indüklenmiş pluripotent kök hücrelerin kromatin modifikasyonlarında görülen farklılıkların yeniden programlama etkinliği üzerindeki etkileri belirlenmelidir. İndüklenmiş pluripotent kök hücreler embriyonik kök hücrelerin neden olduğu etik kaygılardan uzak olsa da, üretimleri sırasında kullanılan viral vektörlerin hücrelere kazandırabileceği tümörjenik potansiyel göz ardı edilmemelidir. Hastaya özel tasarlanabilecek olmaları ve immün cevap oluşturma problemlerinden uzak olmaları indüklenmiş pluripotent kök hücreleri son dönemdeki bilimsel araştırmaların merkezine yerleştirirse de, indüklenmiş pluripotent kök hücrelerin halen embriyonik kök hücrelere ideal bir alternatif sağlayıp sağlayamayacağı sorusu cevaplandırılmamıştır. İndüklenmiş pluripotent kök hücre üretimi için uygun yöntemlerin geliştirilememesi, eksik ya da bozuk yeniden programlanmayla sonuçlanabilir ve bu durum hücrelerin olası transplantasyonu sonrası teratoma oluşumuna neden olabilir. Bu nedenle, indüklenmiş pluripotent kök hücrelerin hücre tedavisinde uygulamalarının hayata geçirilebilmesi için pluripotent özelliğin kontrol mekanizmalarının anlaşılması ve indüklenmiş pluripotent kök hücrelerin hem güvenli hem de etkin bir şekilde üretilmelerine olanak veren yeni stratejilerin geliştirilmesi gereklidir.

Kısaltmalar: BMP kemik morfojenik protein, TGF- β ;transforming büyüme faktör- β , FGF-2; fibroblast büyüme faktörü, PI-3K/Akt fosfatidylinositol 3' -kinase-Akt, ERK Ekstraselüler düzenlenen kinaz, SCID Ağır combine immune yetmezlik

KAYNAKLAR

1. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;282:1145-1147.
2. Condic ML, Rao M. Alternative sources of pluripotent stem cells: ethical and scientific issues revisited. *Stem Cells Dev* 2010;19:1121-1129.
3. Gurdon JB, Melton DA. Nuclear reprogramming in cells. *Science* 2008;322:1811-1815.
4. Cowan CA, Atienza J, Melton DA, Eggan K. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science* 2005;309:1369-1373.
5. Wilmot I, Schnieke AE, Mcwhir J, Campbell KHS. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997;385:810-813.
6. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;126:663-676.
7. 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.
8. Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, et al. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* 2008;322:945-949.
9. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007;318:1917-1920.
10. Fusaki N, Ban H, Nishiyama A, et al. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2009;85:348-462.
11. Okita K, Hong H, Takahashi K, Yamanaka S. Generation of mouse-induced pluripotent stem cells with plasmid vectors. *Nat Protoc* 2010;5:418-428.
12. Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, et al. piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* 2009;458:766-770.
13. Osteil P, Tapponnier Y, Markossian S, et al. Induced pluripotent stem cells derived from rabbits exhibit some characteristics of naïve pluripotency. *Biol Open* 2013;2:613-628.
14. Liu H, Zhu F, Yong J, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from adult rhesus monkey fibroblasts. *Cell Stem Cell* 2008;3:587-590.
15. Jia F, Wilson KD, Sun N, et al. A nonviral minicircle vector for deriving human iPS cells. *Nat Methods* 2010;7:197-199.
16. Huangfu D, Osafune K, Maehr R, et al. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat Biotechnol* 2008;26:1269-1275.
17. Kim D, Kim CH, Moon JI, et al. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of

- reprogramming proteins. *Cell Stem Cell* 2009;4:472-476.
18. Pandian GN, Nakano Y, Sato S, et al. A synthetic small molecule for rapid induction of multiple pluripotency genes in mouse embryonic fibroblasts. *Sci Rep* 2012;2:544.
 19. Zhang Z, Gao Y, Gordon A, et al. Efficient generation of fully reprogrammed human iPS cells via polycistronic retroviral vector and a new cocktail of chemical compounds. *PLoS One* 2011;6:e26592.
 20. Li W, Ding S. Small molecules that modulate embryonic stem cell fate and somatic cell reprogramming. *Trends Pharmacol Sci* 2010;31:36-45.
 21. Yan X, Qin H, Qu C, et al. iPS cells reprogrammed from human mesenchymal-like stem/progenitor cells of dental tissue origin. *Stem Cells Dev* 2010;19:469-480.
 22. Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, et al. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 1998;95:379-391.
 23. Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, et al. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev* 2003;17:126-140.
 24. Chambers I, Silva J, Colby D, et al. Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature* 2007;450:1230-1234.
 25. Adhikary S, Eilers M. Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:635-645.
 26. Rowland BD, Bernardis 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.
 27. Li Y, McClintick J, Zhong L, et al. Murine embryonic stem cell differentiation is promoted by SOCS-3 and inhibited by the zinc finger transcription factor Klf4. *Blood* 2005;105:635-637.
 28. Cartwright P, McLean C, Sheppard A, et al. LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development* 2005;132:885-896.
 29. Wernig M, Meissner A, Foreman R, et al. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 2007;448:318-324.
 30. Maherali N, Sridharan R, Xie W, et al. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell* 2007;1:55-70.
 31. Rao M. Conserved and divergent paths that regulate self-renewal in mouse and human embryonic stem cells. *Dev Biol* 2004;275:269-286.
 32. Kuijk EW, Chuva de Sousa Lopes SM, Geijsen N, et al. The different shades of mammalian pluripotent stem cells. *Hum Reprod Update* 2011;17:254-271.
 33. Tarnowski M, Sieron AL. Adult stem cells and their ability to differentiate. *Med Sci Monit* 2006;12:154-163.
 34. Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, et al. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol* 2000;18:399-404.
 35. Blau HM, Chiu CP, Webster C. Cytoplasmic activation of human nuclear genes in stable heterocaryons. *Cell* 1983;32:1171-1180.
 36. 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.
 37. Nichols J, Smith A. Naive and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell* 2009;4:487-492.
 38. Pera MF, Reubinoff B, Trounson A. Human embryonic stem cells. *J Cell Sci* 2000;113:5-10.
 39. Keller G. Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine. *Genes Dev* 2005;19:1129-1155.
 40. Stojkovic M, Lako M, Stojkovic P, et al. Derivation of human embryonic stem cells from day-8 blastocysts recovered after three-step in vitro culture. *Stem Cells* 2004;22:790-797.
 41. Khoo ML, McQuade LR, Smith MS, et al. Growth and differentiation of embryoid bodies derived from human embryonic stem cells: effect of glucose and basic fibroblast growth factor. *Biol Reprod* 2005;73:1147-1156.
 42. Itskovitz-Eldor J, Schuldiner M, Karsenti D, et al. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Mol Med* 2000;6:88-95.
 43. Meissner A, Mikkelsen TS, Gu H, et al. Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. *Nature* 2008;454:766-770.
 44. Brons IG, Smithers LE, Trotter MW, et al. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* 2007;448:191-195.
 45. Tesar PJ, Chenoweth JG, Brook FA, et al. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* 2007;448:196-199.
 46. Matsui Y, Zsebo K, Hogan BL. Derivation of pluripotent embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell* 1992;70:841-847.
 47. Johnson BV, Rathjen J, Rathjen PD. Transcriptional control of pluripotency: decisions in early development. *Curr Opin Genet Dev* 2006;16:447-454.
 48. Boyer LA, Mathur D, Jaenisch R. Molecular control of pluripotency. *Curr Opin Genet Dev* 2006;16:455-462.
 49. Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* 2000;24:372-376.
 50. Keramari M, Razavi J, Ingman KA, et al. Sox2 is essential for formation of trophoblast in the preimplantation embryo. *PLoS One* 2010;5:e13952.
 51. Masui S, Nakatake Y, Toyooka Y, et al. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol* 2007;9:625-635.

52. Rodda DJ, Chew JL, Lim LH, et al. Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. *J Biol Chem* 2005;280:24731-24737.
53. Hart AH, Hartley L, Ibrahim M, Robb L. Identification, cloning and expression analysis of the pluripotency promoting Nanog genes in mouse and human. *Dev Dyn* 2004;230:187-198.
54. Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, et al. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 2003;113:631-642.
55. Darr H, Mayshar Y, Benvenisty N. Overexpression of NANOG in human ES cells enables feeder-free growth while inducing primitive ectoderm features. *Development* 2006;133:1193-1201.
56. Hyslop L, Stojkovic M, Armstrong L, et al. Downregulation of NANOG induces differentiation of human embryonic stem cells to extraembryonic lineages. *Stem Cells* 2005;23:1035-1043.
57. Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 2008;26:101-106.
58. Feng B, Jiang J, Kraus P, et al. Reprogramming of fibroblasts into induced pluripotent stem cells with orphan nuclear receptor Esrrb. *Nat Cell Biol* 2009;11:197-203.
59. Feng B, Ng JH, Heng JC, Ng HH. Molecules that promote or enhance reprogramming of somatic cells to induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2009;4:301-312.
60. Peerani R, Rao BM, Bauwens C, et al. Niche-mediated control of human embryonic stem cell self-renewal and differentiation. *EMBO J* 2007;26:4744-4755.
61. Chen X, Xu H, Yuan P, et al. Integration of external signaling pathways with the core transcriptional network in embryonic stem cells. *Cell* 2008;133:1106-1117.
62. Sekkaï D, Gruel G, Herry M, et al. Microarray analysis of LIF/Stat3 transcriptional targets in embryonic stem cells. *Stem Cells* 2005;23:1634-1642.
63. Stewart RS, Stojkovic M, Lako M. Mechanisms of self-renewal in human embryonic stem cells. *Eur J Cancer* 2006;42:1257-1272.
64. James D, Levine AJ, Besser D, Hemmati-Brivanlou A. TGFbeta/activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. *Development* 2005;132:1273-1282.
65. Xu RH, Sampsel-Barron TL, Gu F, et al. NANOG is a direct target of TGFbeta/activin-mediated SMAD signaling in human ESCs. *Cell Stem Cell* 2008;3:196-206.
66. Vallier L, Reynolds D, Pedersen RA. Nodal inhibits differentiation of human embryonic stem cells along the neuroectodermal default pathway. *Dev Biol* 2004;275:403-421.
67. Beattie GM, Lopez AD, Bucay N, et al. Activin A maintains pluripotency of human embryonic stem cells in the absence of feeder layers. *Stem Cells* 2005;23:489-495.
68. Vallier L, Mendjan S, Brown S, et al. Activin/Nodal signalling maintains pluripotency by controlling Nanog expression. *Development* 2009;136:1339-1349.
69. Zhang P, Li J, Tan Z, et al. Short-term BMP-4 treatment initiates mesoderm induction in human embryonic stem cells. *Blood* 2008;111:1933-1941.
70. Lanner F, Rossant J. The role of FGF/Erk signaling in pluripotent cells. *Development* 2010;137:3351-3360.
71. Dailey L, Ambrosetti D, Mansukhani A, Basilico C. Mechanisms underlying differential responses to FGF signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005;16:233-247.
72. Dvorak P, Dvorakova D, Koskova S, et al. Expression and potential role of fibroblast growth factor 2 and its receptors in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2005;23:1200-1211.
73. Ding VMY, Boersema PJ, Foong LY, et al. Tyrosine phosphorylation profiling in FGF-2 stimulated human embryonic stem cells. *PLoS One* 2011;6:e17538.
74. Amit M, Shariki C, Margulets V, Itskovitz-Eldor J. Feeder layer- and serum-free culture of human embryonic stem cells. *Biol Reprod* 2004;70:837-845.
75. Wang G, Zhang H, Zhao Y, et al. Noggin and bFGF cooperate to maintain the pluripotency of human embryonic stem cells in the absence of feeder layers. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;330:934-942.
76. Xiao L, Yuan X, Sharkis SJ. Activin A maintains self-renewal and regulates fibroblast growth factor, Wnt, and bone morphogenic protein pathways in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2006;24:1476-1486.
77. Vallier L, Alexander M, Pedersen RA. Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. *J Cell Sci* 2005;118:4495-4509.
78. Baxter MA, Camarasa MV, Bates N, et al. Analysis of the distinct functions of growth factors and tissue culture substrates necessary for the long-term self-renewal of human embryonic stem cell lines. *Stem Cell Res* 2009;3:28-38.
79. Armstrong L, Hughes O, Yung S, et al. The role of PI3K/AKT, MAPK/ERK and NFkappabeta signalling in the maintenance of human embryonic stem cell pluripotency and viability highlighted by transcriptional profiling and functional analysis. *Hum Mol Genet* 2006;15:1894-1913.
80. Pyle AD, Lock LF, Donovan PJ. Neurotrophins mediate human embryonic stem cell survival. *Nat Biotechnol* 2006;24:344-350.
81. McLean AB, D'Amour KA, Jones KL, et al. Activin A efficiently specifies definitive endoderm from human embryonic stem cells only when phosphatidylinositol 3-kinase signaling is suppressed. *Stem Cells* 2007;25:29-38.
82. Chen YG, Li Z, Wang XF. Where PI3K/Akt meets Smads: the crosstalk determines human embryonic stem cell fate. *Cell Stem Cell* 2012;10:231-232.

83. Li L, Wang S, Jezierski A, et al. A unique interplay between Rap1 and E-cadherin in the endocytic pathway regulates self-renewal of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2010;28:247-257.
84. Park IH, Lerou PH, Zhao R, et al. Generation of human-induced pluripotent stem cells. *Nat Protoc* 2008;3:1180-1186.
85. Yamanaka S. Elite and stochastic models for induced pluripotent stem cell generation. *Nature* 2009;460:49-52.
86. Kim JB, Greber B, Araúzo-Bravo MJ, et al. Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4. *Nature* 2009;461:649-643.
87. Aasen T, Raya A, Barrero MJ, et al. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol* 2008;26:1276-1284.
88. Streckfuss-Bömeke K, Wolf F, Azizian A, et al. Comparative study of human-induced pluripotent stem cells derived from bone marrow cells, hair keratinocytes, and skin fibroblasts. *Eur Heart J* 2012;Epub ahead of print.
89. Loh YH, Agarwal S, Park IH, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from human blood. *Blood* 2009;113:5476-5479.
90. Cashen AF, Lazarus HM, Devine SM. Mobilizing stem cells from normal donors: is it possible to improve upon G-CSF? *Bone Marrow Transplant* 2007;39:577-588.
91. Liu T, Zou G, Gao Y, et al. High efficiency of reprogramming CD34⁺ cells derived from human amniotic fluid into induced pluripotent stem cells with Oct4. *Stem Cells Dev* 2012;21:2322-2332.
92. Su RJ, Baylink DJ, Neises A, et al. Efficient Generation of Integration-Free iPS Cells from Human Adult Peripheral Blood Using BCL-XL Together with Yamanaka Factors. *PLoS One* 2013;8:e64496.
93. Merling RK, Sweeney CL, Choi U, et al. Transgene-free iPSCs generated from small volume peripheral blood nonmobilized CD34⁺ cells. *Blood* 2013;121:e98-107.
94. Okita K, Yamakawa T, Matsumura Y, et al. An efficient nonviral method to generate integration-free human-induced pluripotent stem cells from cord blood and peripheral blood cells. *Stem Cells* 2013;31:458-466.
95. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002;13:4279-4295.
96. Sun N, Panetta NJ, Gupta DM, et al. Feeder-free derivation of induced pluripotent stem cells from adult human adipose stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:15720-15725.
97. Qu X, Liu T, Song K, et al. Induced pluripotent stem cells generated from human adipose-derived stem cells using a non-viral polycistronic plasmid in feeder-free conditions. *PLoS One* 2012;7:e48161.
98. Aoki T, Ohnishi H, Oda Y, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from human adipose-derived stem cells without c-MYC. *Tissue Eng Part A* 2010;16:2197-2206.
99. Meng X, Neises A, Su RJ, et al. Efficient reprogramming of human cord blood CD34⁺ cells into induced pluripotent stem cells with OCT4 and SOX2 alone. *Mol Ther* 2012;20:408-416.
100. Giorgetti A, Montserrat N, Rodriguez-Piza I, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood cells with only two factors: Oct4 and Sox2. *Nat Protoc* 2010;5:811-820.
101. Haase A, Olmer R, Schwanke K, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood. *Cell Stem Cell* 2009;5:434-441.
102. Nishishita N, Takenaka C, Fusaki N, Kawamata S. Generation of human induced pluripotent stem cells from cord blood cells. *J Stem Cells* 2011;6:101-108.
103. Hu K, Yu J, Suknutha K, et al. Efficient generation of transgene-free induced pluripotent stem cells from normal and neoplastic bone marrow and cord blood mononuclear cells. *Blood* 2011;117:e109-119.
104. Loh YH, Hartung O, Li H, et al. Reprogramming of T cells from human peripheral blood. *Cell Stem Cell* 2010;7:15-19.
105. Staerk J, Dawlaty MM, Gao Q, et al. Reprogramming of human peripheral blood cells to induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2010;7:20-24.
106. Aoi T, Yae K, Nakagawa M, et al. Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science* 2008;321:699-702.
107. Winkler T, Cantilena A, Métais JY, et al. No evidence for clonal selection due to lentiviral integration sites in human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 2010;28:687-694.
108. Moretti A, Bellin M, Welling A, et al. Patient-specific induced pluripotent stem-cell models for long-QT syndrome. *N Engl J Med* 2010;363:1397-1409.
109. Itzhaki I, Maizels L, Huber I, et al. Modelling the long QT syndrome with induced pluripotent stem cells. *Nature* 2011;471:225-229.
110. Matsa E, Rajamohan D, Dick E, et al. Drug evaluation in cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells carrying a long QT syndrome type 2 mutation. *Eur Heart J* 2011;32:952-962.
111. Juopperi TA, Kim WR, Chiang CH, et al. Astrocytes generated from patient induced pluripotent stem cells recapitulate features of Huntington's disease patient cells. *Mol Brain* 2012;5.
112. Fan Y, Luo Y, Chen X, et al. Generation of human β -thalassemia induced pluripotent stem cells from amniotic fluid cells using a single excisable lentiviral stem cell cassette. *J Reprod Dev* 2012;58:404-409.
113. Ooi L, Sidhu K, Poljak A, et al. Induced pluripotent stem cells as tools for disease modelling and drug discovery in Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 2013;120:103-111.
114. Byers B, Lee HL, Reijo Pera R. Modeling Parkinson's disease using induced pluripotent stem cells. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2012;12:227-234.

115. Raya A, Rodríguez-Pizà I, Guenechea G, et al. Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells. *Nature* 2009;460:53-59.
116. 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.
117. Xu D, Alipio Z, Fink LM, et al. Phenotypic correction of murine hemophilia A using an iPS cell-based therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:808-813.
118. Zhou L, Wang W, Liu Y, et al. Differentiation of induced pluripotent stem cells of swine into rod photoreceptors and their integration into the retina. *Stem Cells* 2011;29:972-980.
119. Mellough CB, Sernagor E, Moreno-Gimeno I, et al. Efficient stage-specific differentiation of human pluripotent stem cells toward retinal photoreceptor cells. *Stem Cells* 2012;30:673-686.
120. Marchetto MC, Yeo GW, Kainohana O, et al. Transcriptional signature and memory retention of human-induced pluripotent stem cells. *PloS One* 2009;4:e7076.
121. Ghosh Z, Wilson KD, Wu Y, et al. Persistent donor cell gene expression among human induced pluripotent stem cells contributes to differences with human embryonic stem cells. *PloS One* 2010;5:e8975.
122. Ramos-Mejia V, Muñoz-Lopez M, Garcia-Perez JL, Menendez P. iPSC lines that do not silence the expression of the ectopic reprogramming factors may display enhanced propensity to genomic instability. *Cell Res* 2010;20:1092-1095.
123. Newman AM, Cooper JB. Lab-specific gene expression signatures in pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2010;7:258-262.
124. Lowry WE. Does transcription factor induced pluripotency accurately mimic embryo derived pluripotency? *Curr Opin Genet Dev* 2012;22:429-434.