

ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ REVIEW

Επαγόμενα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα Κυτταρική θεραπεία στην αναγεννητική Ιατρική και στον σχεδιασμό ανθρώπινων ασθενειών

Τα τελευταία έτη έχει εισαχθεί δυναμικά στον χώρο της επιστήμης η χρήση πολυδύναμων κυττάρων σε εφαρμογές τόσο του κλάδου της αναγεννητικής Ιατρικής όσο και της μοντελοποίησης πολλών ανθρώπινων ασθενειών. Πράγματι, τα ανθρώπινα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα φαίνεται να αποτελούν έναν τομέα πολλά υποσχόμενο στο πεδίο της Ιατρικής. Ωστόσο, υπάρχουν αρκετά μειονεκτήματα στη χρήση τους, τόσο ηθικά, όσο και πρακτικά. Γι' αυτόν τον λόγο, η έρευνα στο εν λόγω πεδίο συνεχίζεται σήμερα με εντατικό ρυθμό. Η επανάσταση στον χώρο ήλθε με την ανακάλυψη των Takahashi και Yamanaka το 2006, οι οποίοι έδειξαν ότι είναι δυνατό να προκύψουν πολυδύναμα κύτταρα από πλήρως διαφοροποιημένα κύτταρα. Αυτά τα πολυδύναμα κύτταρα αναφέρονται ως επαγόμενα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα. Τα συγκεκριμένα κύτταρα φαίνεται να μπορούν να υπερπηδήσουν κάποια από τα βασικά μειονεκτήματα των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων, όπως τους ηθικούς φραγμούς που διέπουν τη χρήση των τελευταίων, αλλά και τα προβλήματα περί πιθανής απόρριψης μοσχευμάτων κατά τις μεταμοσχεύσεις. Η χρήση της τεχνολογίας των επαγόμενων βλαστικών κυττάρων στην εποχή μας στρέφεται κυρίως προς δύο κατευθύνσεις: Στην αναγεννητική Ιατρική, όπου γίνονται προσπάθειες για την αναδημιουργία κατεστραμμένων ιστών και οργάνων, και στην ανάπτυξη του τομέα της εξατομικευμένης Ιατρικής, μέσω του σχεδιασμού ανθρώπινων νόσων με τη χρήση κυττάρων τα οποία λαμβάνονται απ' ευθείας από τον ασθενή. Μέχρι σήμερα, η έρευνα στο πεδίο των επαγόμενων πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων είναι ελπιδοφόρα, αν και υπάρχουν ακόμη περιορισμοί σχετικά με τη χρήση τους. Σκοπός της παρούσας ανασκόπησης είναι η εξέταση των πλεονεκτημάτων και των μειονεκτημάτων των επαγόμενων βλαστικών κυττάρων, καθώς και οι εφαρμογές τους στην αναγεννητική Ιατρική και στη μοντελοποίηση διαφόρων νόσων.

1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Το 2006, οι Takahashi και Yamanaka έδειξαν ότι είναι δυνατή η δημιουργία επαγόμενων πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων (induced pluripotent stem cells, iPSC) από ινοβλάστες ποντικών, εμβρυϊκής ή και ενήλικης προέλευσης, με τη χρήση των παραγόντων Sox2, Oct3/4, c-Myc και Klf4, οι οποίοι εισήχθησαν στα κύτταρα μέσω ρετροϊών. Αν και επαναστατική ανακάλυψη, υπήρχαν ακόμη κάποια ελαττώματα, αφού δεν κατόρθωσαν να δημιουργήσουν βιώσιμα χιμαιρικά ποντίκια μετά από μικροέγχυση κυττάρων iPSC σε βλαστοκύστη.¹ Το 2007, ωστόσο, τρεις διαφορετικές ομάδες έδειξαν, ανεξάρτητα, ότι είναι δυνατός ο επαναπρογραμμα-

τισμός ινοβλαστών ποντικών σε iPSC, αλλά και η δημιουργία βιώσιμων χιμαιρικών ποντικών. Χρησιμοποιήθηκαν και πάλι οι τέσσερις προαναφερθέντες παράγοντες, αλλάζοντας εν τούτοις το γονίδιο δείκτη για τον μετασχηματισμό, από το Fbx στο Nanog.²⁻⁴ Άλλο σπουδαίο βήμα που αξίζει να αναφερθεί είναι η δημιουργία iPSC από ανθρώπινα κύτταρα. Αυτό συνέβη το ίδιο έτος, από δύο ομάδες που εργάστηκαν ανεξάρτητα. Και στις δύο εργασίες προέκυψαν iPSC από ανθρώπινα κύτταρα. Ωστόσο, η σημαντική διαφορά ήταν ότι η μια ομάδα χρησιμοποίησε τους παράγοντες Sox2, Oct3/4, c-Myc και Klf4,⁵ ενώ η άλλη ομάδα χρησιμοποίησε τους παράγοντες Sox2, Oct3/4, Nanog και LIN28.⁶ Μια άλλη ενδιαφέρουσα έρευνα δημοσιεύθηκε στο *Science* το 2008,

ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ 2019, 36(3):300-311
ARCHIVES OF HELLENIC MEDICINE 2019, 36(3):300-311

Ε. Μωυσιδίου,
Μ. Γουλιελμάκη,
Ι. Χριστοδούλου,
Β. Ζουμπουρλής

Μονάδα Βιοϊατρικών Εφαρμογών,
Ινστιτούτο Βιολογίας, Φαρμακευτικής
Χημείας και Βιοτεχνολογίας, Εθνικό
Ίδρυμα Ερευνών, Αθήνα

Induced pluripotent stem cells: Cell
therapy in regenerative medicine
and modeling of human disease

Abstract at the end of the article

Λέξεις ευρητηρίου

Αναγεννητική Ιατρική
Επαγόμενα πολυδύναμα
βλαστικά κύτταρα
Επαναπρογραμματισμός
Κυτταρική θεραπεία
Μοντελοποίηση νόσων

Υποβλήθηκε 27.3.2018
Εγκρίθηκε 2.4.2018

δείχνοντας ότι είναι δυνατή η χρήση αδενοϊών, οι οποίοι δεν ενσωματώνονται στο γονιδίωμα των κυττάρων, για τον σχηματισμό επαγόμενων βλαστικών κυττάρων.⁷ Το ίδιο έτος επιτεύχθηκε επίσης για πρώτη φορά η δημιουργία επαγόμενων βλαστικών κυττάρων χωρίς τη χρήση ιικών φορέων, αλλά με τη βοήθεια πλασμιδίου.⁸ Στη συνέχεια, το 2009, μια ομάδα σκέφθηκε ότι θα ήταν καλύτερα να εισαχθούν οι απαραίτητες πρωτεΐνες για τον επαναπρογραμματισμό των κυττάρων απ' ευθείας μέσα στα κύτταρα, έτσι ώστε να αποφευχθούν εξωγενείς γενετικές τροποποιήσεις των κυττάρων. Κατόρθωσαν να διαπεράσουν τις πρωτεΐνες που προέκυψαν από τα γονίδια των τεσσάρων παραγόντων Sox2, Oct3/4, c-Myc και Klf4 μέσα από τη μεμβράνη των σωματικών κυττάρων, με τη βοήθεια ενός τομέα πολυαργινίνης προσκολλημένο στο καρβοξυτελικό άκρο των προαναφερθεισών πρωτεϊνών.⁹ Άλλο βήμα που αξίζει αναφοράς στην ιστορική αναδρομή είναι η χρήση microRNAs για τον επαναπρογραμματισμό των κυττάρων και την προαγωγή πολυδυναμίας.^{10,11} Τέλος, να αναφερθεί ότι εκτός από τον επαναπρογραμματισμό κυττάρων με τη χρήση παραγόντων όπως οι Sox2, Oct3/4, c-Myc και Klf4, γίνονται βήματα και για επαναπρογραμματισμό κυττάρων με μεταφορά πυρήνων σε ωάρια που έχουν διατηρήσει το γενετικό τους υλικό.¹²

2. ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΤΩΝ iPSC ENANTI ΤΩΝ EMBRYΪΚΩΝ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Τα επαγόμενα βλαστικά κύτταρα αντικαθιστούν σταδιακά τα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα (embryonic stem cells, ESC) στο πεδίο της έρευνας και υπάρχουν διάφοροι λόγοι γι' αυτό. Αρχικά, τα iPSC έχουν αρκετά κοινά με τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα, όπως παρόμοια πρότυπα μεθυσίωσης, αρκετά κοινά γονίδια και πρωτεΐνες, ικανότητα σχηματισμού τερατωμάτων και χιμαιρικών οργανισμών, καθώς και την ικανότητα διαφοροποίησης σε κύτταρα και των τριών κυτταρικών στιβάδων.¹ Το γεγονός ότι τα iPSC φέρουν παρεμφερείς ιδιότητες με τα ESC, τα καθιστά ικανά να χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο στον τομέα της έρευνας και της αναγεννητικής Ιατρικής. Αυτό όμως το οποίο έχει στρέψει την προσοχή όλων στα επαγόμενα πολυδύναμα κύτταρα είναι ότι υπερβαίνουν κάποια μειονεκτήματα που έχει η χρήση των ανθρώπινων εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων όπως τα ηθικά και τα θρησκευτικά διλήμματα τα οποία εγείρει η χρήση τους, εφόσον απαιτείται η καταστροφή ανθρώπινων εμβρύων.¹³ Για του λόγου το αληθές, υπάρχουν πολλές νομοθεσίες, οι οποίες μάλιστα διαφέρουν αρκετά στις διάφορες χώρες, για τους χειρισμούς που επιτρέπονται ή δεν επιτρέπονται σ' ό,τι αφορά στα ανθρώπινα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα

(hESC). Όπως είναι εύλογο, χρησιμοποιούνται κυρίως hESC τα οποία έχουν προκύψει από κηύσεις που τερματίστηκαν. Επίσης, θα πρέπει να έχει ληφθεί γνώση και συναίνεση από τους άμεσα ενδιαφερόμενους για τη χρησιμοποίησή τους.¹³ Καθίσταται αμέσως αντιληπτό ότι υπάρχουν αρκετά εμπόδια για την εύρεση hESC προς χρήση. Αντίθετα, τα iPSC δεν υπόκεινται σε τέτοιους περιορισμούς, εφόσον είναι εύκολη η παρασκευή τους και αποτελούν μια περισσότερο διαθέσιμη πηγή πολυδυναμίας. Ένα άλλο πρόβλημα που φαίνεται ότι υπερβαίνουν τα iPSC, και ίσως και το πλέον σημαντικό, είναι η απόρριψη μοσχευμάτων από εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα λόγω μη επαρκούς ανοσοσυμβατότητας.¹⁴ Εφόσον τα επαγόμενα βλαστικά κύτταρα μπορούν να δημιουργηθούν ύστερα από συγκομιδή σωματικών κυττάρων του ενδιαφερόμενου λήπτη, το μόσχευμα θα είναι συμβατό με τον λήπτη και οι πιθανότητες για ανοσοαπόρριψη είναι μηδαμινές. Έτσι ξεπερνιέται το θέμα της δυσκολίας εύρεσης οργάνων και μοσχευμάτων, αφού δεν υπάρχει πλέον το πρόβλημα των ολιγάριθμων δοτών, ή των εξουθενωτικών ελέγχων αυτών για μεταδοτικές ασθένειες και ανοσοσυμβατότητες. Παράλληλα, κάτι τέτοιο θα μπορούσε να μειώνει ή και να μηδενίζει τους χρόνους αναμονής στους καταλόγους για εύρεση δότη, παρέχοντας περισσότερες ελπίδες για επιβίωση στον λήπτη, αφού οι διαδικασίες θα κινούνται ταχύτερα. Επίσης, τα iPSC ανοίγουν σταδιακά τον δρόμο για την εξατομικευμένη Ιατρική, εφόσον είναι πλέον δυνατή η λήψη σωματικών κυττάρων από ασθενείς, τα οποία στη συνέχεια θα μετατραπούν σε iPSC και, τελικά, θα διαφοροποιηθούν στις κυτταρικές σειρές που αντιπροσωπεύουν την εκάστοτε νόσο. Με αυτόν τον τρόπο παρέχεται η ευκαιρία αφ' ενός για μελέτη της νόσου *in vitro*, ακριβώς όπως αυτή εκφράζεται στον εκάστοτε ασθενή, και αφ' ετέρου για διερεύνηση και έλεγχο νέων πιθανών φαρμακευτικών προϊόντων και θεραπειών. Γίνεται αντιληπτό ότι με τη νέα τεχνολογία των iPSC σημειώνονται σημαντικές πρόοδοι σε πολλούς τομείς, όπως η αναγεννητική Ιατρική αλλά και η εξατομικευμένη Ιατρική μέσω της μοντελοποίησης και του σχεδιασμού αρκετών ανθρώπινων ασθενειών, γεγονός το οποίο έως τώρα ήταν αρκετά δύσκολο να επιτευχθεί. Σίγουρα υπάρχουν και προβλήματα σ' ό,τι αφορά στη χρήση των iPSC. Ωστόσο, με την πάροδο του χρόνου η έρευνα στον εν λόγω τομέα έχει αποφέρει καρπούς και έχουν ανευρεθεί αρκετοί τρόποι για την υπερπήδηση των αρχικών μειονεκτημάτων.

3. ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ iPSC

Εκτός από τα πλεονεκτήματα των επαγόμενων βλαστικών κυττάρων, έχουν παρατηρηθεί και αρκετά μειο-

νεκτήματα, τα οποία τα καθιστούν μέχρι στιγμής σχετικά ακατάλληλα για άμεση χρήση στην κλινική πράξη. Ένα βασικό μειονέκτημα των iPSC είναι η χρήση ιικών φορέων για τη μεταφορά των απαραίτητων γονιδίων στα σωματικά κύτταρα. Στις πρώτες προσπάθειες δημιουργίας iPSC είτε από κύτταρα ποντικού είτε από ανθρώπινα κύτταρα, χρησιμοποιήθηκαν ρετροϊοί λόγω της υψηλότερης αποδοτικότητάς τους κατά τη μεταγωγή απ' ό,τι άλλοι φορείς.¹ Ωστόσο, η απόδοση της μεταγωγής εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον ρυθμό διαίρεσης των κυττάρων τα οποία χρησιμοποιούνται, εφόσον οι ρετροϊοί χρειάζονται κύτταρα με υψηλό ρυθμό πολλαπλασιασμού για ενσωμάτωση. Γι' αυτόν τον λόγο, η δημιουργία iPSC από ανθρώπινους ινοβλάστες έχει απόδοση μόλις 0,02%.¹⁵ Γενικά, η χρήση των ρετροϊών είναι βολική. Ωστόσο δεν πρέπει να παραβλέπεται ο κίνδυνος απορρύθμισης της διαδικασίας μεταγραφής κατά την εισαγωγή των ιών στα σωματικά κύτταρα¹⁶ και ο κίνδυνος καρκινογένεσης.^{17,18} Ένα ακόμη πολύ σημαντικό μειονέκτημα της χρήσης ρετροϊών είναι ότι έχει δείχθει πως είναι πιθανό να αρχίσει ξανά η έκφραση των γονιδίων που μεταφέρθηκαν με τη χρήση των ιών στα κύτταρα, τα οποία προέκυψαν από τα επαγόμενα βλαστικά κύτταρα.² Όπως είναι εύλογο, η πιθανότητα να υπάρχει έκτοπη έκφραση των *Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, και ιδιαίτερα του *c-Myc* που λειτουργεί ως πρωτο-ογκογονίδιο, είναι σοβαρός ανασταλτικός παράγοντας για τη χρήση των iPSC.

Όπως προαναφέρθηκε, τα επαγόμενα βλαστικά κύτταρα έχουν αρκετά κοινά με τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα. Όμως, έχουν παρατηρηθεί και κάποιες διαφορές, οι οποίες μπορεί να έχουν μεγάλη σημασία. Παραδείγματος χάρη, αν και τα iPSC έχουν την ικανότητα σχηματισμού τερατωμάτων και χιμαιρών, συγκριτικά πάντα με τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα, η ικανότητά τους αυτή είναι μειωμένη.¹⁹ Επιπρόσθετα, για να δημιουργηθούν iPSC που φέρουν σίγουρα τις ιδιότητες των ESC, πρέπει να ελεγχθεί η ικανότητά τους για πολυδυναμία, σχηματισμό τερατωμάτων και χιμαιρικών οργανισμών. Καθίσταται σαφές ότι δεν είναι δυνατό να διενεργηθεί αυτός ο έλεγχος σε ανθρώπινα iPSC, εφόσον τίθενται θέματα βιοηθικής για τη δημιουργία χιμαιρών με ανθρώπινα κύτταρα. Άλλες έρευνες έχουν δείξει ότι υπάρχουν παρεκκλίνοντα πρότυπα υπερμεθυλίωσης και υπομεθυλίωσης σε νησίδες CpG σε iPSC, συγκριτικά με τα κύτταρα από τα οποία προήλθαν.²⁰ Αυτές οι διαφορές στη μεθυλίωση είναι ανησυχητικές γιατί δεν αποτελούν κάτι παροδικό. Έχει παρατηρηθεί να μεταδίδονται σε μεγάλη συχνότητα κατά τη διαφοροποίηση των iPSC σε τροφοβλάστη,²¹ ενώ, παράλληλα, έχει προταθεί μηχανισμός που υποστηρίζει ότι υπάρχει ανεπαρκής μεθυλίωση κατά τον επαναπρογραμματισμό των iPSC.²² Άλλο θέμα το οποίο θα πρέπει να διερευνηθεί είναι η αποσαφήνιση της ύπαρξης ή

μη επιγενετικής μνήμης στα iPSC. Μέχρι τώρα τα στοιχεία δείχνουν ότι υπάρχει, αφού όταν δημιουργούνται iPSC από μια συγκεκριμένη κυτταρική σειρά, φαίνεται πως αυτά τα iPSC διαφοροποιούνται πιο εύκολα στη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά απ' ό,τι σε άλλες.²³

Εκτός από την παρέκκλιση σε πρότυπα μεθυλίωσης και τα ερωτήματα που αυτή θέτει, υποδεικνύεται ότι τα iPSC φέρουν περισσότερες μεταλλάξεις απ' ό,τι τα κύτταρα από τα οποία προέκυψαν.²⁴ Συγκεκριμένα, σε μελέτη που διενεργήθηκε σε 22 ανθρώπινες σειρές επαγόμενων πολυδύναμων κυττάρων (hiPSC) τα οποία είχαν δημιουργηθεί με διαφορετικούς τρόπους, βρέθηκε σε επίπεδο εξωνίων ότι είχαν κατά μέσο όρο 6 σημειακές μεταλλάξεις ανά εξώνιο. Περίπου οι μισές από αυτές μπορούσαν να ανιχνευτούν και στα κύτταρα από τα οποία προήλθαν τα iPSC.²⁵ Πλέον πρόσφατες μελέτες δείχνουν ωστόσο ότι ο αριθμός των μεταλλάξεων που προκύπτουν στα επαγόμενα βλαστικά κύτταρα εξαρτάται τόσο από τον τρόπο παραγωγής τους, όσο και από την κυτταρική σειρά προέλευσής τους.²⁶ Για παράδειγμα, βρέθηκε ότι εάν ο επαναπρογραμματισμός των κυττάρων γίνει με μεταφορά πυρήνων σε ωάρια αντί να γίνει χρήση ρετροϊών, το ποσοστό των μεταλλάξεων που θα προκύψουν στα iPSC είναι πολύ χαμηλότερο, ενώ σημαντικό ρόλο διαδραματίζει και η επιλογή της κυτταρικής σειράς η οποία θα χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή των iPSC.²⁶ Αξίζει επίσης να τονιστεί ότι η πολυδυναμία στην καλλιέργεια είναι γενικά μια κατάσταση που ευνοεί τον έντονο πολλαπλασιασμό και το εν λόγω γεγονός από μόνο του ευνοεί τη δημιουργία *de novo* μεταλλάξεων. Γι' αυτόν τον λόγο, τα πολυδύναμα κύτταρα θα πρέπει να επανεξετάζονται τακτικά όσο βρίσκονται σε συνθήκες καλλιέργειας, για τυχαίες μεταλλάξεις, λόγω του αυξημένου κινδύνου καρκινογένεσης.²⁷

Το τελευταίο σημείο στο οποίο πρέπει να δοθεί σημασία, επειδή αποτελεί σημαντικό μειονέκτημα της τεχνολογίας των iPSC, είναι το ίδιο το set γονιδίων που χρησιμοποιείται για τον επαναπρογραμματισμό. Όπως προαναφέρθηκε, το βασικό set γονιδίων για επαναπρογραμματισμό που χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά αποτελείται από τα γονίδια *Sox2*, *Oct3/4*, *c-Myc* και *Klf4*.¹ Τα επίπεδα του μεταγραφικού παράγοντα *Oct3/4* συνιστούν έναν κρίσιμο παράγοντα για τη διατήρηση των ιδιοτήτων αυτοανανέωσης και πολλαπλασιασμού των ESC, καθώς μια σχεδόν διπλάσια αύξηση στα επίπεδά του οδηγεί στη διαφοροποίηση των κυττάρων σε πρωτογενές ενδόδερμα και μεσόδερμα, ενώ εάν η έκφρασή του κατασταλεί, τα κύτταρα οδηγούνται σε επίπεδο τροφοεκτοδέρματος.^{28,29}

Το *Sox2* (sex determining region Y-box 2) είναι επίσης ένας μεταγραφικός παράγοντας, αναγκαίος για τη διατή-

ρηση της πολυδυναμίας στα ESC, αλλά και για τη διαφοροποίηση των νευρικών βλαστικών κυττάρων. Συγκεκριμένα, το *Sox2* μαζί με το *Oct3/4* αποτελούν κύρια συστατικά ενός πολύπλοκου συστήματος ελέγχου γονιδίων υπεύθυνων για πολυδυναμία, μεταξύ αυτών και του ίδιου του *Oct3/4*.^{30,31}

Ο Klf4 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που εμπλέκεται σε πολλές διεργασίες όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, η απόπτωση, ο επαναπρογραμματισμός σωματικών κυττάρων και η διατήρηση της πολυδυναμίας.¹ Παρουσιάζει υψηλή έκφραση στα ESC, η οποία όμως όταν μειωθεί οδηγεί στη διαφοροποίησή τους. Αντίθετα, όταν εκφραστεί έκτοπα, παρατηρείται επιβράδυνση της διαφοροποίησης.³² Έχει βρεθεί ότι είναι σε θέση να διατηρεί τη λειτουργία τελομεράσης, με αποτέλεσμα να διατηρεί την πολλαπλασιαστική ικανότητα καρκινικών βλαστικών κυττάρων (cancer stem cells, CSC).³³ Αυτό υποδεικνύει ότι ο συγκεκριμένος παράγοντας μπορεί να υποβοηθή την καρκινική ανάπτυξη. Συγκεκριμένα, ο Klf4 εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα σε καρκινικές κυτταρικές σειρές μαστού, αλλά και παχέος εντέρου και ειδικά για τον καρκίνο παχέος εντέρου, knockdown του Klf4 οδηγεί σε μείωση της ικανότητας των κυττάρων για μετάσταση.^{34,35}

Ο τελευταίος παράγοντας που θα συζητηθεί είναι το γονίδιο *c-Myc*. Είναι μεταγραφικός παράγοντας που εμπλέκεται στον κυτταρικό κύκλο, στην απόπτωση αλλά και στον κυτταρικό μετασχηματισμό. Επειδή σε πολλά είδη καρκίνου το γονίδιο αυτό βρίσκεται μόνιμα ενεργοποιημένο, το *c-Myc* θεωρείται πρωτο-ογκογονίδιο. Αυτό από μόνο του δημιουργεί έναν κίνδυνο, όταν χρησιμοποιείται η έκφρασή του για τον επαναπρογραμματισμό κυττάρων.

Από τα παραπάνω γίνεται αντιληπτό ότι πρέπει να συνεχιστούν οι προσπάθειες για τη βελτίωση της τεχνολογίας των iPSC, τόσο σε επίπεδο των παραγόντων που χρησιμοποιούνται, όσο και σε επίπεδο του τρόπου επίδρασης των παραγόντων στα κύτταρα. Έχει διενεργηθεί ήδη αρκετή έρευνα στον τομέα και παρακάτω θα αναφερθούν τρόποι για τη βελτίωση κάποιων από τα προαναφερθέντα μειονεκτήματα.

4. ΜΕΘΟΔΟΙ ΒΕΛΤΙΩΣΗΣ ΤΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΩΝ IPSC

Όπως προαναφέρθηκε, ο επαναπρογραμματισμός κυττάρων με ιούς οι οποίοι ενσωματώνονται στο γονιδίωμα, όπως οι ρετροϊοί, προκαλεί αρκετά προβλήματα. Γι' αυτό έχουν διενεργηθεί έρευνες για την επίτευξη επαναπρογραμματισμού χωρίς τη χρήση τέτοιων ιών.

Μια από τις μεθόδους που δεν απαιτούν ενσωμάτωση του φορέα είναι η χρήση αδενοϊών. Αυτό δοκιμάστηκε

πρώτα σε κυτταρικές σειρές ποντικών,⁷ ενώ ακολούθησε και η δημιουργία iPSC από ανθρώπινους εμβρυϊκούς ινοβλάστες.³⁶ Άλλοι φορείς που χρησιμοποιήθηκαν με επιτυχία ήταν οι ιοί Sendai, οι οποίοι είναι RNA ιοί και δεν ενσωματώνονται στο γονιδίωμα,³⁷ καθώς και πλασμιδιακοί φορείς.⁸ Μια ακόμη πολύ καλή προσέγγιση είναι και η χρήση επισωματικών πλασμιδιακών φορέων που προέρχονται από τον ιό Epstein-Barr. Με τη χρήση των συγκεκριμένων φορέων δεν μένουν ίχνη του φορέα ή των γονιδίων τα οποία μεταφέρθηκαν μετά τον επαναπρογραμματισμό των κυττάρων, σε αντίθεση με άλλες τεχνικές. Ωστόσο, σε αυτή την προσέγγιση απαιτούνται επτά διαφορετικοί παράγοντες (Oct4, Sox2, NANOG, LIN28, c-Myc, KLF4 και IRES2) για την επίτευξη καλύτερης απόδοσης μεταγωγής και επίσης στον φορέα περιλαμβάνεται και το αντιγόνο SV40LT.³⁸ Σε μια άλλη μελέτη δημιουργήθηκαν hiPSC, με χρήση του L-Myc αντί του c-Myc και ταυτόχρονη καταστολή της έκφρασης του p53.³⁹ Άλλη καινοτόμος προσέγγιση είναι η χρήση μικρών κυκλικών μορίων DNA, γιατί έχει υψηλότερα ποσοστά μεταγωγής από τα πλασμίδια και μακροβιότερη έκτοπη έκφραση.⁴⁰ Έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί ως φορείς των γονιδίων-παραγόντων και λιποσώματα.⁴¹ Τέλος, σ' ό,τι αφορά στη χρήση φορέων που δεν αφήνουν τελικά τα μεταφερόμενα γονίδια στο γονιδίωμα των κυττάρων, αξίζει να αναφερθούν τα συστήματα ρετροϊών τα οποία φέρουν θέσεις LoxP και μετά τον επαναπρογραμματισμό των κυττάρων μπορούν να αφαιρεθούν με τη χρήση της Cre ρεκομπινάσης,⁴² καθώς και τα συστήματα τρανσποζονίων τεχνητών βακτηριακών χρωμοσωμάτων (piggyBac transposons), που επίσης μπορούν να αφαιρεθούν πλήρως μετά τον επαναπρογραμματισμό.^{43,44}

Ωστόσο, έχουν αναπτυχθεί και μέθοδοι οι οποίες δεν χρησιμοποιούν τη μεταφορά γονιδίων των παραγόντων που είναι απαραίτητοι. Μια τέτοια μέθοδος είναι η επίδραση των απαραίτητων πρωτεϊνών εξωγενώς, χωρίς να εκφράζουν τα συγκεκριμένα γονίδια τα ίδια τα κύτταρα. Έτσι, έχει επιτευχθεί η εισαγωγή των πρωτεϊνών των τεσσάρων παραγόντων Sox2, Oct3/4, c-Myc και Klf4 μέσα από τη μεμβράνη των σωματικών κυττάρων με τη βοήθεια ενός τομέα πολυαργινίνης, προσκολλημένο στον καρβοξυτελικό τομέα τους και έτσι ικανό να δημιουργήσει iPSC από κύτταρα ποντικού⁹ ή ανθρώπου.⁴⁵ Επί πλέον, iPSC έχουν παραχθεί μέσω εξωγενούς χορήγησης του mRNA των παραπάνω παραγόντων (RiPSC), το οποίο είναι κατάλληλα τροποποιημένο ώστε οι αντι-ιικές άμυνες του κυττάρου να μην μπορούν να το εντοπίσουν.⁴⁶ Το πρόβλημα και με τις δύο προαναφερθείσες μεθόδους είναι ότι απαιτείται διαρκής χορήγηση των πρωτεϊνών ή του mRNA, έως ότου επιτευχθεί ο επαναπρογραμματισμός.

Μια ακόμη προσέγγιση που πρέπει να αναφερθεί είναι

η χρήση miRNAs για τον επαναπρογραμματισμό κυττάρων σε πολυδύναμη κατάσταση. Σε μια αρχική μελέτη παρήχθησαν iPSC με χρήση μόνο των παραγόντων Sox2, Oct3/4 και Klf4, οι οποίοι κατόρθωσαν μόνοι τους να επάγουν πολυδυναμία, με τη βοήθεια των miR-291-3p, miR-294, και miR-295.¹⁰ Στη συνέχεια, μια άλλη ομάδα παρουσίασε κάτι πραγματικά πρωτοπόρο, επάγοντας πολυδυναμία σε κύτταρα ποντικού αλλά και ανθρώπου, μόνο με τη χρήση miRNAs, χωρίς τη συμβολή κάποιων από τους προαναφερθέντες μεταγραφικούς παράγοντες.^{11,47} Μάλιστα έδειξαν ότι ο επαναπρογραμματισμός με αυτή τη μέθοδο είναι μέχρι και δύο φορές περισσότερο αποτελεσματικός απ' ό,τι με τη χρήση των τεσσάρων παραγόντων. Μια άλλη μέθοδος επαναπρογραμματισμού σωματικών κυττάρων ποντικού βασίστηκε στη χρήση μικρομοριακών χημικών συμπλόκων,⁴⁸ ενώ, παράλληλα, πραγματοποιήθηκε παραγωγή πολυδύναμων κυττάρων από ανθρώπινα ωοκύτταρα που διατήρησαν το γενετικό τους υλικό και στα οποία είχαν μεταφερθεί πυρήνες από σωματικά κύτταρα.¹² Η συγκεκριμένη μέθοδος δεν είχε υψηλά ποσοστά επιτυχίας, ωστόσο τα παραγόμενα βλαστικά κύτταρα (nuclear transfer embryonic stem cells, NT-ESC) που προέκυψαν είχαν κανονικό καρυότυπο και η γονιδιακή τους έκφραση ήταν παρόμοια με εκείνη που εμφανίζουν τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα.

Ένα τελευταίο εργαλείο που μπορεί να συνδράμει στην καλύτερη απόδοση των iPSC είναι το σύστημα CRISPR/Cas9. Με αυτό το σύστημα είναι δυνατή η τροποποίηση γονιδιωμάτων και αυτό δίνει την ευκαιρία διόρθωσης πιθανών μεταλλάξεων στα iPSC, αλλά και αποκοπής των εξωτερικών γενετικών παραγόντων από το γονιδίωμα. Βασισμένη στα παραπάνω, μια ερευνητική ομάδα τροποποίησε γενετικά ανθρώπινες σειρές βλαστικών κυττάρων, αλλά και επαγόμενων βλαστικών κυττάρων, ώστε να προκύψουν κύτταρα που δεν είχαν τα γονίδια *SOX2*, *PAX6*, *OTX2* και *AGO2*.⁴⁹

Γενικά, από τα παραπάνω γίνεται αντιληπτό ότι έχουν προκύψει διάφορες παραλλαγές στις μεθόδους επαναπρογραμματισμού κυττάρων. Οι περισσότερες έχουν βελτιώσει αισθητά την απόδοση συγκριτικά με τη μέθοδο Yamanaka-Takahashi, τόσο μέσω της χρήσης λιγότερο επεμβατικών φορέων, όσο και από την άποψη των παραγόντων που χρησιμοποιούνται, αν και οι περισσότεροι εμμένουν στους τέσσερις αρχικούς παράγοντες Sox2, Oct3/4, c-Myb και Klf4. Ωστόσο, η κάθε μέθοδος έχει πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα, ενώ η επιλογή της μεθόδου εξαρτάται αποκλειστικά από το εκάστοτε εργαστήριο.

5. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ IPSC ΣΤΗ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ ΝΟΣΩΝ ΚΑΙ ΣΤΟΝ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

Μέχρι και σήμερα, τα περισσότερα εργαστήρια που

επικεντρώνονται ερευνητικά σε κάποια συγκεκριμένη νόσο συνήθως χρησιμοποιούν διάφορα ζωικά μοντέλα, με πιο συνηθισμένα τα μοντέλα ποντικών, αλλά και πρωτεύοντων, αφού τα πρωτεύοντα είναι γενετικά πολύ όμοια με τον άνθρωπο. Εν τούτοις, όλα αυτά τα ζωικά μοντέλα εμφανίζουν κάποια βασικά μειονεκτήματα σ' ό,τι αφορά στην αντιπροσώπευση των ανθρώπινων νόσων. Το βασικότερο αυτών είναι ότι οποιοδήποτε και αν είναι το εκάστοτε ζωικό μοντέλο, ανήκει σε διαφορετικό είδος από τον άνθρωπο και αυτό συνεπάγεται ότι θα υπάρχουν διαφορές στις παραγόμενες πρωτεΐνες. Επί πλέον, όσο γενετικά όμοια και να είναι κάποια μοντέλα με τον άνθρωπο, δεν μπορούν να μιμηθούν πλήρως το ανθρώπινο κυτταρικό περιβάλλον. Αυτό το πρόβλημα έρχονται να λύσουν τα iPSC. Η δυνατότητα παραγωγής iPSC από ανθρώπινα σωματικά κύτταρα ατόμων που πάσχουν από κάποια υπό μελέτη νόσο και στη συνέχεια διαφοροποίησης στον συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο που εκφράζει τη νόσο, δυνητικά αποτελεί τη βέλτιστη επιλογή για μοντελοποίηση της εκάστοτε νόσου. Επίσης, τα iPSC συνιστούν ένα μοντέλο που λειτουργεί τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* όταν γίνει μεταμόσχευση των κυττάρων σε ζωντανό οργανισμό. Με αυτόν τον τρόπο καθίσταται δυνατός ο σχεδιασμός και η δοκιμή πιθανών φαρμάκων και θεραπειών πριν από το στάδιο των κλινικών δοκιμών. Τέλος, είναι εύλογο ότι κάπως έτσι ανοίγει ο δρόμος για την εξατομικευμένη θεραπεία, αφού τα iPSC μπορούν να δημιουργηθούν με λήψη σωματικών κυττάρων απ' ευθείας από τον κάθε ασθενή, παρέχοντας έτσι τη δυνατότητα να μελετηθεί στο «τρυβλίο» άμεσα η ασθένειά του. Για όλους τους παραπάνω λόγους, έχουν εκπονηθεί μέχρι στιγμής πολλές μελέτες για διάφορες ασθένειες, χρησιμοποιώντας ως μοντέλο κύτταρα που προέρχονται από iPSC.

Μια μεγάλη ομάδα ασθενειών, στην οποία έχει υπάρξει σημαντική πρόοδος στη μοντελοποίηση με τη χρήση επαγόμενων βλαστικών κυττάρων, περιλαμβάνει διάφορες νευροεκφυλιστικές παθήσεις.⁵⁰ Συγκεκριμένα, όσον αφορά στη νόσο του Parkinson έχουν προκύψει διάφορες μελέτες κατά τις οποίες σωματικά κύτταρα από ασθενείς με τη νόσο μετατράπηκαν σε πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα και στη συνέχεια διαφοροποιήθηκαν σε ντοπαμινεργικούς νευρώνες. Η σύγκριση ντοπαμινεργικών νευρώνων που προέρχονταν από iPSC φυσιολογικών ατόμων, αλλά και ατόμων με νόσο Parkinson με μεταλλάξεις στο γονίδιο της παρκίνης έδειξε ότι η έλλειψη παρκίνης οδηγούσε σε αύξηση παραγόντων οξειδωτικού stress και μειωμένη πρόσληψη ντοπαμίνης από τους νευρώνες.⁵¹ Αυτό δίνει το έναυσμα να εξεταστούν στις εν λόγω κυτταρικές σειρές διάφορες πιθανές θεραπείες που να στοχεύουν, π.χ., τα παράγωγα του οξειδωτικού stress.

Άλλη νευροεκφυλιστική νόσος που έχει μελετηθεί με

αυτόν τον τρόπο είναι η νόσος Alzheimer. Μια ομάδα δημιούργησε νευρώνες από iPSC ασθενών με μεταλλάξεις στα γονίδια της πρεσενιλίνης PS1 και PS2 και παρατήρησε αυξημένη έκκριση του αμυλοειδούς β, η οποία ανταποκρινόταν σε αναστολείς της γ-σεκρετάσης, ανοίγοντας έτσι τον δρόμο για εύρεση πιθανών θεραπευτικών στόχων.⁵² Μια άλλη έρευνα σε νευρώνες από ινοβλάστες ασθενών τόσο από κληρονομήσιμες όσο και από σποραδικές μορφές της νόσου, έδειξε ότι η χρήση αναστολέων της β-σεκρετάσης μειώνει τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Tau.⁵³

Γενικότερα, μέχρι σήμερα έχει δημιουργηθεί πληθώρα μοντέλων κυτταρικών σειρών από επαγόμενα βλαστικά κύτταρα για διάφορες νευρολογικές παθήσεις. Ανάμεσα σε αυτές είναι η πλάγια μυατροφική σκλήρυνση, όπου σε μία από τις σχετικές έρευνες παρήχθησαν κινητικοί νευρώνες από κύτταρα ασθενούς,⁵⁴ η νωτιαία μυϊκή ατροφία,⁵⁵ η σχιζοφρένεια,⁵⁶ η χορεία του Huntington⁵⁷ και η οικογενής δυσσαυτονομία.⁵⁸ Επίσης, μια ομάδα έδειξε πρόσφατα έναν τρόπο διαφοροποίησης επαγόμενων βλαστικών κυττάρων σε πολυπύρηνους σκελετικούς μυοσωληνίσκους, παρέχοντας έτσι ένα ακόμη μοντέλο για πιθανή μελέτη της πλάγιας μυατροφικής σκλήρυνσης ή και άλλων νόσων που αφορούν βλάβες σε κινητικούς νευρώνες.⁵⁹

Ωστόσο, η μοντελοποίηση νόσων με τη χρήση των iPSC δεν περιορίζεται μόνο σε νόσους που οφείλονται σε μεταλλάξεις γονιδίων, αλλά και σε χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η μοντελοποίηση του συνδρόμου Down. Το σύνδρομο Down συνεπάγεται μεταξύ άλλων προβλήματα στις διαδικασίες μάθησης και μνήμης, τα οποία δείχθηκε ότι οφείλονται σε μειωμένη δημιουργία συναψων σε νευρώνες που προέκυψαν από ινοβλάστες ατόμων τα οποία φέρουν την τρισωμία 21⁶⁰ και οδηγεί σε συμπτώματα που ομοιάζουν με συμπτώματα της νόσου Alzheimer. Έτσι, κατέστη δυνατή η παραγωγή νευρώνων του φλοιού από iPSC αλλά και από ESC ατόμων με σύνδρομο Down, γύρω από τους οποίους συσσωρεύτηκε β-αμυλοειδές και δημιούργησε πλάκες. Ταυτόχρονα παρατηρήθηκε υπερφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Tau. Και οι δύο παρατηρήσεις είναι χαρακτηριστικές της νόσου Alzheimer. Ως πιθανή θεραπεία δοκιμάστηκαν αναστολείς της γ-σεκρετάσης και πράγματι αναστάλθηκε η παραγωγή του β-αμυλοειδούς.⁶¹ Μια πολύ πρόσφατη μελέτη που δημοσιεύτηκε, έδειξε για πρώτη φορά ότι είναι ικανή η δημιουργία λειτουργικών σεροτονινικών νευρώνων, εμβρυικών αλλά και επαγόμενων, από hiPSC. Το εν λόγω επίτευγμα έδωσε στην επιστήμη μια πολύ καλή πλατφόρμα για την ανάπτυξη και τη δοκιμασία νέων φαρμάκων που επιδρούν στους σχετικούς υποδοχείς.⁶²

Εκτός από τις νευρολογικές ασθένειες, τα iPSC έχουν

χρησιμοποιηθεί για μοντελοποίηση και άλλων νόσων. Πιο συγκεκριμένα, έχουν μελετηθεί διάφορες μεταβολικές νόσοι, όπως ασθένειες που οφείλονται σε μεταλλάξεις του μιτοχονδριακού DNA,⁶³ καθώς και ο σακχαρώδης διαβήτης, η οξεία συνδυαστική ανοσοανεπάρκεια η οποία σχετίζεται με ανεπάρκεια της απαμινάσης της αδενοσίνης, το σύνδρομο SBD, η νόσος Gaucher τύπου III, οι μυϊκές δυστροφίες τύπου Duchenne και Becker, η χορεία του Huntington, η νόσος Parkinson, το σύνδρομο Down, ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 και το σύνδρομο Lesch-Nyhan.⁶⁴ Όσον αφορά στον σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, μια πλέον πρόσφατη μελέτη δείχνει σημαντικές προόδους στη μοντελοποίηση της νόσου, αφού κατέστη δυνατή η δημιουργία iPSC από επιδερμικά κερατινοκύτταρα ηλικιωμένων διαβητικών τύπου 2, τα οποία στη συνέχεια διαφοροποιήθηκαν σε νησίδες κυττάρων που παράγουν ινσουλίνη. Το αξιοσημείωτο της έρευνας ήταν ότι τα iPSC που προέκυψαν ήταν ηλικιακά νέα κύτταρα, με επιμηκυμένα τελομερή και με κατασταλμένα γονίδια τα οποία εμπλέκονται σε μονοπάτια γήρανσης και οξειδωτικού stress.⁶⁵ Με τη χρήση των επαγόμενων βλαστικών κυττάρων έχει πραγματοποιηθεί επίσης μοντελοποίηση για τη χρόνια κοκκιωματώδη νόσο.⁶⁶ Το συγκεκριμένο μοντέλο μπορεί μελλοντικά να αποδώσει καλύτερη κατανόηση του μοριακού υπόβαθρου της νόσου, αλλά και πιθανές θεραπείες.

Μια άλλη μεγάλη κατηγορία νόσων που έχουν μελετηθεί αρκετά αφορά σε διάφορες καρδιακές παθήσεις.⁶⁷ Μεταξύ των καρδιακών νόσων που έχουν μοντελοποιηθεί με iPSC περιλαμβάνονται το σύνδρομο LEOPARD,⁶⁸ η υπερτροφική μυοκαρδιοπάθεια,⁶⁹ η διατακτική μυοκαρδιοπάθεια⁷⁰ και η αρρυθμιογόνος μυοκαρδιοπάθεια δεξιάς κοιλίας.⁷¹ Στις προαναφερθείσες νόσους, τα iPSC διαφοροποιήθηκαν σε καρδιομυοκύτταρα τα οποία μιμήθηκαν με επιτυχία την εκάστοτε νόσο. Μια άλλη καρδιακή νόσος η οποία έχει μοντελοποιηθεί με τη χρήση των iPSC,⁷² το σύνδρομο LQT, οφείλεται σε μεταλλάξεις που επηρεάζουν τα κανάλια νατρίου και καλίου. Σε hiPSC από ασθενείς με αυτό το σύνδρομο δοκιμάστηκαν διάφοροι αναστολείς ιοντικών καναλιών ή και φάρμακα που διευκολύνουν τη διέλευση συγκεκριμένων ιόντων από τα κανάλια, αξιοποιώντας το εν λόγω μοντέλο για την εύρεση πιθανών θεραπειών.⁷²

Εκτός όμως από τον εγκέφαλο και την καρδιά, έχουν μελετηθεί μοντέλα hiPSC κυτταρικών σειρών και για άλλα όργανα και τις ασθένειές τους. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν οι νεφροί. Σε μια έρευνα, νεφρικά κύτταρα αθροίστηκαν και σχημάτισαν νεφρικά οργανίδια τα οποία μιμούσαν τη λειτουργία του επιθηλίου του νεφρού, τόσο σε φυσιολογικές συνθήκες, όσο και σε διάφορες ασθένειες κατόπιν γενετικής τροποποίησης των νεφρικών κυττάρων με το σύστημα CRISPR-Cas9.⁷³ Άλλη έρευνα ανέδειξε επίσης

τον ικανό σχηματισμό νεφρικών οργανιδίων από iPSC,⁷⁴ καθώς έδειξε ότι τα εν λόγω οργανίδια προσιδιάζουν την αρχιτεκτονική και την αναπτυξιακή πορεία των νεφρών. Μέσω των iPSC είναι δυνατό να δημιουργηθούν νεφρικά οργανίδια στα οποία μπορεί να δοκιμασθεί πληθώρα ουσιών για τοξικότητα, πριν από τη χορήγησή τους σε ασθενείς.

Στην ίδια λογική με τα νεφρικά οργανίδια, έχουν επίσης δημιουργηθεί και οργανίδια πνευμόνων, τα οποία, αντίστοιχα, προσιδιάζουν τις μορφές του πνεύμονα και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μελέτη εκφυλιστικών νόσων του πνεύμονα, όπως η κυστική ίνωση, αλλά και για την εύρεση πιθανών στόχων για τη δημιουργία φαρμάκων.⁷⁵

Τέλος, αξίζει να αναφερθεί η πρόοδος που έχει υπάρξει με τα επαγόμενα βλαστικά κύτταρα και σ' ό,τι αφορά στο ήπαρ. Σειρές ηπατοκυττάρων που προέρχονται από διαφοροποίηση των iPSC είναι πολύ χρήσιμες για την κατανόηση διαφόρων μεταβολικών νόσων του ήπατος. Έχουν δημιουργηθεί ηπατοκύτταρα από hiPSC από ασθενείς με ανεπάρκεια α₁-αντιθρυψίνης, τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί για καλύτερη κατανόηση της μοριακής βάσης της νόσου αλλά και για την εύρεση πιθανών στόχων για θεραπεία. Με αυτόν τον τρόπο βρέθηκε ότι η θεραπεία με αναστολείς του πρωτεασώματος σε τέτοια κύτταρα επιδείνωσε τη νόσο, υποδεικνύοντας έτσι έναν μηχανισμό παθολογικής συσσώρευσης α₁-αντιθρυψίνης. Στην ίδια έρευνα μελετήθηκαν αφ' ενός η οικογενής υπερχοληστερολαιμία και αφ' ετέρου η νόσος αποθήκευσης γλυκογόνου τύπου 1A.⁷⁶ Σε κυτταρικές σειρές από iPSC ασθενών με ανεπάρκεια α₁-αντιθρυψίνης εργάστηκε μια ακόμη ομάδα, χρησιμοποιώντας αυτές ως πλατφόρμες για μεγάλης κλίμακας αναζήτηση πιθανών φαρμάκων, με ενθαρρυντικά αποτελέσματα.⁷⁷

6. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ IPSC ΣΤΗΝ ΑΝΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ

Η αναγεννητική Ιατρική είναι ένας κλάδος της Ιατρικής ο οποίος τα τελευταία έτη έχει έλθει στο επίκεντρο της επιστημονικής κοινότητας. Όπως δηλώνει και το όνομά της, αφορά στη δημιουργία ιστών και οργάνων από βλαστικά κύτταρα, με σκοπό τη χρήση τους σε μεταμοσχεύσεις. Αυτός ο κλάδος έχει σημειώσει μεγάλες προόδους στην Ιατρική, καθ' ό,τι διαθέτει πλεονεκτήματα όπως η μείωση των χρόνων στις λίστες αναμονής, αλλά και σ' ό,τι αφορά στη θεραπεία εκφυλιστικών νόσων. Η πρωτοπορία του επαναπρογραμματισμού σωματικών κυττάρων σε πολυδυναμία άλλαξε ριζικά το πεδίο της αναγεννητικής Ιατρικής, παρέχοντας νέες διόδους για την ανάπτυξη του συγκεκριμένου τομέα.

Στη συνέχεια παρατίθενται κάποιες από τις πιθανές μελλοντικές εφαρμογές των iPSC στην αναγεννητική Ιατρική

και στη θεραπεία διαφόρων νόσων που βασίζονται σε αυτή.

Η πρώτη ομάδα ασθενειών στις οποίες δόθηκε μεγάλη σημασία για θεραπεία με τη χρήση των iPSC αφορούσε σε διάφορες εκφυλιστικές νόσους των οφθαλμών. Πράγματι, μία από τις πρώτες κλινικές δοκιμές που έγιναν με τη χρήση μοσχεύματος από iPSC αφορούσε στην εκφύλιση της ωχράς κηλίδας του οφθαλμού. Δεν φάνηκε να υπάρχει αναδόμηση της κηλίδας, όμως υπήρχαν στοιχεία που υποδείκνυαν την επιβίωση των κυττάρων του μοσχεύματος και επίσης το σημαντικότερο ήταν ότι δεν υπήρχε κάποια ανάπτυξη όγκων.⁷⁸ Ωστόσο, σε προκλινικά μοντέλα εκφύλισης της ωχράς κηλίδας που σχετίζεται με την ηλικία έχει δείξει ότι προγονικά νευρικά κύτταρα προερχόμενα από διαφοροποίηση των επαγόμενων βλαστικών κυττάρων μπορούν να διατηρήσουν την ικανότητα της όρασης σε οφθαλμό αρουραίου,⁷⁹ δίνοντας έτσι ελπίδες για πιθανή μελλοντική χρήση. Γι' αυτόν τον λόγο, εκπονούνται αρκετές έρευνες για τη δημιουργία κατάλληλων κυτταρικών μοσχευμάτων που θα κατορθώσουν να επιδείξουν βελτίωση στην εκφύλιση της ωχράς κηλίδας.⁸⁰ Επίσης, έχουν σχεδιαστεί προκλινικά μοντέλα και για την αμφιβληστροειδίτιδα για να μελετηθεί μεταξύ άλλων και η ασφάλεια τέτοιων μοσχευμάτων όσον αφορά στην ογκογένεση.^{81,82} Στον σχεδιασμό τέτοιων προκλινικών μοντέλων συνδράμει η ικανότητα μοντελοποίησης της νόσου με τη χρήση των iPSC από ασθενείς που φέρουν την ασθένεια, για την εύρεση μεταλλάξεων-στόχων, όπως μεταλλάξεις ροδοψίνης.⁸³

Άλλες μεγάλες κατηγορίες διαταραχών που χρησιμοποιούν iPSC για πιθανές αναγεννητικές θεραπείες αφορούν στα μυοσκελετικά, καθώς και στα νευρολογικά νοσήματα. Γενικά έχουν μελετηθεί αρκετά οι βλάβες από τραυματισμό του νωτιαίου μυελού. Σε μια μελέτη δημιουργήθηκαν νευρικά σφαιρίδια από ανθρώπινα iPSC, τα οποία στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε ποντίκια που είχαν υποστεί βλάβη στον νωτιαίο μυελό. Το θετικό της μελέτης ήταν ότι δεν παρατηρήθηκε ογκογένεση και παράλληλα προέκυψε βελτίωση της κινητικής λειτουργίας των ποντικών. Πιο συγκεκριμένα, ανάμεσα σε άλλα, παρατηρήθηκε διαφοροποίηση των νευρικών σφαιριδίων και στις τρεις μεγάλες κατηγορίες νευρικών κυττάρων, μυελινοποίηση στην τραυματισμένη περιοχή, αλλά και αγγειογένεση.⁸⁴ Δεδομένου ότι τα σχετικά αποτελέσματα ήταν σαφώς ενθαρρυντικά για τη χρήση των iPSC, στη συνέχεια προέκυψε το επόμενο βήμα για τη δοκιμή της μεθόδου, μέσω μιας μελέτης που χρησιμοποίησε hiPSC –προηγουμένως δοκιμασμένα για την ασφάλειά τους σ' ό,τι αφορά στην ογκογένεση– σε μοντέλο πρωτευόντων και πιο συγκεκριμένα σε σκιουροπίθηκους. Τα αποτελέσματα ήταν εξ ίσου ενθαρρυντικά. Δεν παρατηρήθηκε ογκογένεση για το διάστημα που διήρκεσε η μελέτη, το οποίο ήταν 3 μήνες. Επί πλέον, παρατηρήθηκε διαφοροποίηση στις τρεις βασικές

νευρικές κυτταρικές σειρές, καθώς και αγγειογένεση και παρεμπόδιση της διαδικασίας απομυελινοποίησης στην τραυματισμένη περιοχή. Συνολικά, υπήρχε λειτουργική αποκατάσταση στην κίνηση των ζώων.⁸⁵ Εφόσον τέτοιες μελέτες ήταν επιτυχείς και σε πρωτεύοντα, υπάρχει πλέον το υπόβαθρο να προχωρήσουν τα iPSC στο άμεσο μέλλον σε κλινικές δοκιμές για την αποκατάσταση μετά από τραυματισμό του νωτιαίου μυελού. Σ' ό,τι αφορά σε ασθένειες του μυϊκού συστήματος, δημοσιεύτηκε μια ενδιαφέρουσα εργασία για τη μυϊκή δυστροφία Duchenne, στην οποία χρησιμοποιήθηκαν μυϊκοί ιστοί που προέκυψαν από iPSC ποντικών αλλά και ενός ανθρώπου οι οποίοι έφεραν τη νόσο. Οι ερευνητές κατόρθωσαν *in vitro* να διορθώσουν τη βλάβη με τη χρήση ανθρώπινων τεχνητών χρωμοσωμάτων (human artificial chromosomes, HACs).⁸⁶

Εκτός από εφαρμογές σε μυοσκελετικά και σε νευρολογικά προβλήματα, η αναγεννητική Ιατρική έχει χρησιμοποιήσει τα iPSC και σε άλλες ασθένειες. Μια πολύ ενδιαφέρουσα προσέγγιση είναι η δημιουργία μακροφάγων που ανθίστανται στον ιό HIV-1. Τα μακροφάγα αυτά διαφοροποιήθηκαν από iPSC που προήλθαν από αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα και τροποποιήθηκαν ώστε να είναι ανθεκτικά στον HIV-1.⁸⁷ Μια τέτοια ιδέα μπορεί να έχει μελλοντικά σημαντικές εφαρμογές στους πάσχοντες από AIDS, εφόσον με συνεχή κυτταρική θεραπεία με τα εν λόγω κύτταρα ο ασθενής θα μπορεί να αντεπεξέρχεται στη νόσο. Τέλος, άλλη μια εφαρμογή που αξίζει να αναφερθεί είναι η δημιουργία ανθρώπινων β-παγκρεατικών κυττάρων με τη χρήση iPSC από ινοβλάστες. Όταν τέτοια κύτταρα μεταφέρθηκαν σε ποντίκια, παρατηρήθηκε φυσιολογική έκκριση ινσουλίνης, παρ' όλο τον τεχνητό χημικό διαβήτη που είχε προκληθεί σε αυτά.⁸⁸ Κάτι τέτοιο είναι ενθαρρυντικό για τη μελλοντική κυτταρική θεραπεία διαβητικών ατόμων.

7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι Gurdon et al το 1958 έθεσαν μέσα από τα πειράματά τους περί κλωνοποίησης στον βάτραχο *Xenopus Laevis* για πρώτη φορά την ιδέα ότι τα διαφοροποιημένα κύτταρα μπορούν να επαναπρογραμματιστούν.⁸⁹ Σχεδόν 50 έτη αργότερα, οι Takahashi και Yamanaka κατόρθωσαν να το αποδείξουν πέραν πάσης αμφιβολίας.¹ Αυτές οι δύο εργασίες έδωσαν το έναυσμα για την άνθιση μιας καινοτομίας, η σημασία της οποίας είναι τόσο μεγάλη, που προβλέπεται στα επόμενα έτη να ανατραπούν πολλά δεδομένα στον τομέα της Ιατρικής. Γ' αυτό άλλωστε ο Gurdon και ο Yamanaka τιμήθηκαν αμφότεροι με το βραβείο Νόμπελ Φυσιολογίας το 2012. Ήδη σήμερα, τα επαγόμενα βλαστικά κύτταρα αποτελούν ένα μείζον πεδίο της έρευνας και σημειώνεται συνεχώς αλματώδης πρόοδος στον εν λόγω τομέα. Μπορεί

ακόμη να μην έχουν εισέλθει στην κλινική πράξη, καθώς υπάρχουν αρκετά εμπόδια που πρέπει να υπερνικηθούν, όμως, όπως προαναφέρθηκε, τα αποτελέσματα σε ζώα είναι πολύ ενθαρρυντικά, και έχουν ήδη αρχίσει οι πρώτες κλινικές δοκιμές για θεραπεία με μοσχεύματα από iPSC.⁷⁸ Στο άμεσο μέλλον, τα iPSC θα μεσουρανούν στον τομέα της αναγεννητικής Ιατρικής. Επίσης, ας μην παραλείπεται το γεγονός ότι μέχρι στιγμής, τα επαγόμενα βλαστικά κύτταρα έχουν συνεισφέρει στη μοντελοποίηση πολλών ασθενειών, συνδράμοντας έτσι στην καλύτερη κατανόηση του μοριακού, και όχι μόνο, υποβάθρου των νόσων αυτών. Ένα σημαντικό πλεονέκτημα της συγκεκριμένης τεχνολογίας είναι η μη επεμβατική της φύση. Για παράδειγμα, εάν μελετάται μια ασθένεια που εκφράζεται στον πνεύμονα, δεν είναι απαραίτητο να ληφθούν κύτταρα από το συγκεκριμένο σημείο. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν οποιαδήποτε κύτταρα του ασθενούς, εφόσον όταν επαναπρογραμματιστούν σε κύτταρα του πνεύμονα, θα εμφανίζουν τον φαινότυπο της νόσου. Το συγκεκριμένο φαινόμενο σαφώς είναι πολύ σημαντικό και γι' αυτό υπάρχουν διάφορες μελέτες που περιγράφουν απλούς τρόπους σχετικά με τη λήψη κυττάρων και τον επαναπρογραμματισμό τους σε iPSC. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί μια πρόσφατα δημοσιευμένη εργασία, στην οποία επιτεύχθηκε επαναπρογραμματισμός κυττάρων που ελήφθησαν από τον στοματικό βλεννογόνο ασθενών κατά τη διάρκεια ελέγχου ρουτίνας στον οδοντίατρο.⁹⁰

Τέλος, αξίζει να συζητηθεί η τελευταία τάση στα δρώμενα των iPSC, η οποία φαίνεται να είναι η προσπάθεια κυτταρικού επαναπρογραμματισμού χωρίς τα κύτταρα να διέρχονται από το στάδιο των πολυδύναμων προγονικών κυττάρων. Η σχετική προσέγγιση έχει το πλεονέκτημα ότι τα κύτταρα που επαναπρογραμματίζονται μετατρέπονται απ' ευθείας από τον αρχικό τους τύπο στον επιθυμητό, οπότε οι πιθανότητες για δημιουργία όγκων μειώνονται, αφού τα κύτταρα δεν διέρχονται από το στάδιο της πολυδυναμίας. Σε μια σχετική μελέτη, ερευνητές έδειξαν ότι είναι δυνατό να προκύψουν λειτουργικοί ντοπαμινεργικοί νευρώνες απ' ευθείας από ινοβλάστες προερχόμενους από ποντίκια αλλά και από ανθρώπους, τόσο υγιείς όσο και ασθενείς με νόσο Parkinson.⁹¹ Το επόμενο βήμα είναι να επιτευχθεί απ' ευθείας επαναπρογραμματισμός *in vivo*. Προς αυτή την κατεύθυνση, μια ομάδα κατόρθωσε να προκαλέσει απ' ευθείας επαναπρογραμματισμό από ινοβλάστες σε ηπατοκύτταρα *in vivo* σε ποντίκια με χρόνια ηπατική νόσο. Στην ουσία, μετέτρεψαν προϊνωτικούς μυοϊνοβλάστες στην παθούσα περιοχή σε κύτταρα που έφεραν φαινότυπο ηπατοκυττάρων, με ευνοϊκά αποτελέσματα σ' ό,τι αφορούσε στη λειτουργικότητα του ήπατος στα πειραματόζωα, μειώνοντας τα ποσοστά ίνωσης στο ήπαρ.⁹² Μέσα από αυτή τη μελέτη γίνεται αντιληπτό ότι στο άμεσο μέλλον θα μπορέσει να

εφαρμοστεί κάτι παρόμοιο σε επίπεδο πρωτευνών και στη συνέχεια στον άνθρωπο.

Συνοψίζοντας, η δημιουργία επαγόμενων βλαστικών κυττάρων και η ιδέα του επαναπρογραμματισμού κυττάρων σε κάποια άλλη επιθυμητή κυτταρική μοίρα αποτελούν έναν πολύ δραστήριο τομέα έρευνας στην εποχή μας. Υπάρχουν

ακόμη πολλοί μηχανισμοί σχετικά με τη λειτουργία τους οι οποίοι χρήζουν αποσαφήνισμού, πριν από την εισαγωγή τέτοιων μελετών στην καθημερινή κλινική πράξη. Ωστόσο, στο εγγύς μέλλον προβλέπεται κάποιες από τις προαναφερθείσες εφαρμογές να τεθούν σε λειτουργία και να βελτιώσουν τον κλάδο της αναγεννητικής Ιατρικής.

ABSTRACT

Induced pluripotent stem cells: Cell therapy in regenerative medicine and modeling of human disease

E. MOYSIDOU, M. GOULIELMAKI, I. CHRISTODOULOU, V. ZOUMPOURLIS

Unit of Biomedical Applications, Institute of Biology, Medicinal Chemistry and Biotechnology, National Hellenic Research Foundation, Athens, Greece

Archives of Hellenic Medicine 2019, 36(3):300–311

In recent years, the use of pluripotent cells in applications of both regenerative medicine and the modeling of many human diseases has been dynamically introduced in the field of science. Human embryonic stem cells (hESC) appear to be a promising sector in the field of medicine, and research on hESC continues today in an intensive manner, although there are several drawbacks to their use, both moral and practical. The revolution in the field came with the discovery in 2006 of Takahashi and Yamanaka, who showed that it is possible to produce pluripotent cells from fully differentiated cells. These pluripotent cells are called induced pluripotent stem cells, or, as reported in the literature, iPSC. The iPSC appear to be able to overcome some of the drawbacks of hESC, such as the moral barriers governing the use of embryonic stem cells, and the practical problems regarding possible graft rejection during allogeneic transplantation. The use of iPSC technology in our times is aimed mainly in two directions; regenerative medicine, where attempts are being made at regeneration of damaged tissues and organs, using iPSC, and, secondly, development of the personalized medicine field, through modeling of human diseases by the use of cells taken directly from the patient. So far, the iPSC research field has been promising, but there are also limitations to the use of iPSC. This review examines the advantages and disadvantages of iPSC and their potential applications in regenerative medicine and the modeling of various diseases.

Key words: Induced pluripotent stem cells (iPSC), Modeling of diseases, Pluripotency, Regenerative medicine, Reprogramming

Βιβλιογραφία

1. TAKAHASHI K, YAMANAKA S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006, 126:663–676
2. OKITA K, ICHISAKA T, YAMANAKA S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 2007, 448:313–317
3. MAHERALI N, SRIDHARAN R, XIE W, UTIKAL J, EMINLI S, ARNOLD K ET AL. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell* 2007, 1:55–70
4. WERNIG M, MEISSNER A, FOREMAN R, BRAMBRINK T, KU M, HOCHEDLINGER K ET AL. *In vitro* reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 2007, 448:318–324
5. TAKAHASHI K, TANABE K, OHNUKI M, NARITA M, ICHISAKA T, TOMODA K ET AL. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007, 131:861–872
6. YU J, VODYANIK MA, SMUGA-OTTO K, ANTOSIEWICZ-BOURGET J, FRANE JL, TIAN S ET AL. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007, 318:1917–1920
7. STADTFELD M, NAGAYA M, UTIKAL J, WEIR G, HOCHEDLINGER K. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* 2008, 322:945–949
8. 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
9. ZHOU H, WU S, JOO JY, ZHU S, HAN DW, LIN T ET AL. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* 2009, 4:381–384
10. JUDSON RL, BABIARZ JE, VENERE M, BLELLOCH R. Embryonic stem cell-specific microRNAs promote induced pluripotency. *Nat Biotechnol* 2009, 27:459–461
11. ANOKYE-DANSO F, TRIVEDI CM, JUHR D, GUPTA M, CUI Z, TIAN Y ET AL.

- Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell* 2011, 8:376–388
12. TACHIBANA M, AMATO P, SPARMAN M, GUTIERREZ NM, TIPPNER-HEDGES R, MA H ET AL. Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. *Cell* 2013, 153:1228–1238
 13. BT HJ IDRUS R, ABAS A, AB RAHIM F, SAIM AB. Clinical translation of cell therapy, tissue engineering, and regenerative medicine product in Malaysia and its regulatory policy. *Tissue Eng Part A* 2015, 21:2812–2816
 14. CONDIC ML, RAO M. Regulatory issues for personalized pluripotent cells. *Stem Cells* 2008, 26:2753–2758
 15. TAKAHASHI K, OKITA K, NAKAGAWA M, YAMANAKA S. Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nat Protoc* 2007, 2:3081–3089
 16. RECCHIA A, BONINI C, MAGNANI Z, URBINATI F, SARTORI D, MURARO S ET AL. Retroviral vector integration deregulates gene expression but has no consequence on the biology and function of transplanted T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006, 103:1457–1462
 17. BAUM C, DÜLLMANN J, LI Z, FEHSE B, MEYER J, WILLIAMS DA ET AL. Side effects of retroviral gene transfer into hematopoietic stem cells. *Blood* 2003, 101:2099–2114
 18. HACEIN-BEY-ABINA S, VON KALLE C, SCHMIDT M, McCORMACK MP, WULFFRAAT N, LEBOULCH P ET AL. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 2003, 302:415–419
 19. STADTFELD M, APOSTOLOU E, AKUTSU H, FUKUDA A, FOLLETT P, NATESAN S ET AL. Aberrant silencing of imprinted genes on chromosome 12qF1 in mouse induced pluripotent stem cells. *Nature* 2010, 465:175–181
 20. DOI A, PARK IH, WEN B, MURAKAMI P, ARYEE MJ, IRIZARRY R ET AL. Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts. *Nat Genet* 2009, 41:1350–1353
 21. LISTER R, PELIZZOLA M, KIDA YS, HAWKINS RD, NERY JR, HON G ET AL. Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature* 2011, 471:68–73
 22. OHIY, QIN H, HONG C, BLOUIN L, POLO JM, GUOT ET AL. Incomplete DNA methylation underlies a transcriptional memory of somatic cells in human iPS cells. *Nat Cell Biol* 2011, 13:541–549
 23. KIM K, DOI A, WEN B, NG K, ZHAOR, CAHAN P ET AL. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature* 2010, 467:285–290
 24. MAYSHAR Y, BEN-DAVID U, LAVON N, BIANCOTTI JC, YAKIR B, CLARK AT ET AL. Identification and classification of chromosomal aberrations in human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2010, 7:521–531
 25. GORE A, LI Z, FUNG HL, YOUNG JE, AGARWAL S, ANTOSIEWICZ-BOURGET J ET AL. Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. *Nature* 2011, 471:63–67
 26. ARAKI R, MIZUTANI E, HOKIY, SUNAYAMA M, WAKAYAMA S, NAGATOMO H ET AL. The number of point mutations in induced pluripotent stem cells and nuclear transfer embryonic stem cells depends on the method and somatic cell type used for their generation. *Stem Cells* 2017, 35:1189–1196
 27. NÄRVÄ E, AUTIO R, RAHKONEN N, KONG L, HARRISON N, KITSBERG D ET AL. High-resolution DNA analysis of human embryonic stem cell lines reveals culture-induced copy number changes and loss of heterozygosity. *Nat Biotechnol* 2010, 28:371–377
 28. NISHIMOTO M, MIYAGI S, YAMAGISHI T, SAKAGUCHI T, NIWA H, MURAMATSU M ET AL. Oct-3/4 maintains the proliferative embryonic stem cell state via specific binding to a variant octamer sequence in the regulatory region of the UTF1 locus. *Mol Cell Biol* 2005, 25:5084–5094
 29. 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
 30. OKUMURA-NAKANISHI S, SAITO M, NIWA H, ISHIKAWA F. Oct-3/4 and Sox2 regulate Oct-3/4 gene in embryonic stem cells. *J Biol Chem* 2005, 280:5307–5317
 31. MASUI S, NAKATAKE Y, TOYOOKA Y, SHIMOSATO D, YAGI R, TAKAHASHI K ET AL. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol* 2007, 9:625–635
 32. LI Y, McCLINTICK J, ZHONG L, EDENBERG HJ, YODER MC, CHAN RJ. Murine embryonic stem cell differentiation is promoted by SOCS-3 and inhibited by the zinc finger transcription factor Klf4. *Blood* 2005, 105:635–637
 33. WONG CW, HOU PS, TSENG SF, CHIEN CL, WU KJ, CHEN HF ET AL. Krüppel-like transcription factor 4 contributes to maintenance of telomerase activity in stem cells. *Stem Cells* 2010, 28:1510–1517
 34. YU F, LI J, CHEN H, FU J, RAY S, HUANG S ET AL. Krüppel-like factor 4 (KLF4) is required for maintenance of breast cancer stem cells and for cell migration and invasion. *Oncogene* 2011, 30:2161–2172
 35. LENG Z, TAO K, XIA Q, TAN J, YUE Z, CHEN J ET AL. Krüppel-like factor 4 acts as an oncogene in colon cancer stem cell-enriched spheroid cells. *PLoS One* 2013, 8:e56082
 36. ZHOU W, FREED CR. Adenoviral gene delivery can reprogram human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 2009, 27:2667–2674
 37. FUSAKI N, BAN H, NISHIYAMA A, SAEKI K, HASEGAWA M. 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, 85:348–362
 38. YU J, HU K, SMUGA-OTTO K, TIAN S, STEWART R, SLUKVIN II ET AL. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science* 2009, 324:797–801
 39. OKITA K, MATSUMURA Y, SATO Y, OKADA A, MORIZANE A, OKAMOTO S ET AL. A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat Methods* 2011, 8:409–412
 40. JIA F, WILSON KD, SUN N, GUPTA DM, HUANG M, LI Z ET AL. A non-viral minicircle vector for deriving human iPS cells. *Nat Methods* 2010, 7:197–199
 41. PARK HY, NOH EH, CHUNG HM, KANG MJ, KIM EY, PARK SP. Efficient generation of virus-free iPS cells using liposomal magnetofection. *PLoS One* 2012, 7:e45812
 42. LOH YH, YANG JC, DE LOS ANGELES A, GUO C, CHERRY A, ROSSI DJ ET

- AL. Excision of a viral reprogramming cassette by delivery of synthetic Cre mRNA. *Curr Protoc Stem Cell Biol* 2012; chapter 4:Unit 4A.5
43. WOLTJEN K, MICHAEL IP, MOHSENI P, DESAI R, MILEIKOVSKY M, HÄMÄLÄINEN R ET AL. PiggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* 2009, 458:766–770
 44. KAJI K, NORRBY K, PACA A, MILEIKOVSKY M, MOHSENI P, WOLTJEN K. Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature* 2009, 458:771–775
 45. KIM D, KIM CH, MOON JI, CHUNG YG, CHANG MY, HAN BS ET AL. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell* 2009, 4:472–476
 46. WARREN L, MANOS PD, AHFELDTT, LOH YH, LI H, LAU F ET AL. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell* 2010, 7:618–630
 47. CARD DA, HEBBAR PB, LI L, TROTTER KW, KOMATSU Y, MISHINA Y ET AL. Oct4/Sox2-regulated miR-302 targets cyclin D1 in human embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 2008, 28:6426–6438
 48. HOU P, LI Y, ZHANG X, LIU C, GUAN J, LI H ET AL. Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science* 2013, 341:651–654
 49. CHEN Y, CAO J, XIONG M, PETERSEN AJ, DONG Y, TAO Y ET AL. Engineering human stem cell lines with inducible gene knockout using CRISPR/Cas9. *Cell Stem Cell* 2015, 17:233–244
 50. IMAIZUMI Y, OKANO H. Modeling human neurological disorders with induced pluripotent stem cells. *J Neurochem* 2014, 129:388–399
 51. JIANG H, REN Y, YUEN EY, ZHONG P, GHAEDI M, HU Z ET AL. Parkin controls dopamine utilization in human midbrain dopaminergic neurons derived from induced pluripotent stem cells. *Nat Commun* 2012, 3:668
 52. YAGI T, ITO D, OKADA Y, AKAMATSU W, NIHEI Y, YOSHIZAKI T ET AL. Modeling familial Alzheimer's disease with induced pluripotent stem cells. *Hum Mol Genet* 2011, 20:4530–4539
 53. ISRAEL MA, YUAN SH, BARDY C, REYNA SM, MU Y, HERRERA C ET AL. Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells. *Nature* 2012, 482:216–220
 54. DIMOS JT, RODOLFA KT, NIAKAN KK, WEISENTHAL LM, MITSUMOTO H, CHUNG W ET AL. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* 2008, 321:1218–1221
 55. EBERT AD, YU J, ROSE FF Jr, MATTIS VB, LORSON CL, THOMSON JA ET AL. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature* 2009, 457:277–280
 56. BRENNAND KJ, SIMONE A, JOU J, GELBOIN-BURKHART C, TRAN N, SANGAR S ET AL. Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. *Nature* 2011, 473:221–225
 57. JUOPPERI TA, KIM WR, CHIANG CH, YU H, MARGOLIS RL, ROSS CA ET AL. Astrocytes generated from patient induced pluripotent stem cells recapitulate features of Huntington's disease patient cells. *Mol Brain* 2012, 5:17
 58. LEE G, PAPANETROU EP, KIM H, CHAMBERS SM, TOMISHIMA MJ, FASANO CA ET AL. Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. *Nature* 2009, 461:402–406
 59. SWARTZ EW, BAEK J, PRIBADI M, WOJTA KJ, ALMEIDA S, KARYDAS A ET AL. A novel protocol for directed differentiation of C9orf72-associated human induced pluripotent stem cells into contractile skeletal myotubes. *Stem Cells Transl Med* 2016, 5:1461–1472
 60. WEICK JP, HELD DL, BONADURER GF 3rd, DOERS ME, LIU Y, MAGUIRE C ET AL. Deficits in human trisomy 21 iPSCs and neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013, 110:9962–9967
 61. SHI Y, KIRWAN P, SMITH J, McLEAN G, ORKIN SH, LIVESEY FJ. A human stem cell model of early Alzheimer's disease pathology in Down syndrome. *Sci Transl Med* 2012, 4:124ra29
 62. LU J, ZHONG X, LIU H, HAO L, HUANG CT, SHERAFAT MA ET AL. Generation of serotonin neurons from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 2016, 34:89–94
 63. FUJIKURA J, NAKAO K, SONE M, NOGUCHI M, MORI E, NAITO M ET AL. Induced pluripotent stem cells generated from diabetic patients with mitochondrial DNA A3243G mutation. *Diabetologia* 2012, 55:1689–1698
 64. PARK IH, ARORA N, HUO H, MAHERALI N, AHFELDT T, SHIMAMURA A ET AL. Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* 2008, 134:877–886
 65. OHMINE S, SQUILLACE KA, HARTJES KA, DEEDS MC, ARMSTRONG AS, THATAVA T ET AL. Reprogrammed keratinocytes from elderly type 2 diabetes patients suppress senescence genes to acquire induced pluripotency. *Aging (Albany NY)* 2012, 4:60–73
 66. JIANG Y, COWLEY SA, SILER U, MELGUIZO D, TLGNER K, BROWNE C ET AL. Derivation and functional analysis of patient-specific induced pluripotent stem cells as an *in vitro* model of chronic granulomatous disease. *Stem Cells* 2012, 30:599–611
 67. ZANELLA F, LYON RC, SHEIKH F. Modeling heart disease in a dish: From somatic cells to disease-relevant cardiomyocytes. *Trends Cardiovasc Med* 2014, 24:32–44
 68. CARVAJAL-VERGARA X, SEVILLA A, D'SOUZA SL, ANG YS, SCHANIEL C, LEE DF ET AL. Patient-specific induced pluripotent stem-cell-derived models of LEOPARD syndrome. *Nature* 2010, 465:808–812
 69. HAN L, LI Y, TCHAO J, KAPLAN AD, LIN B, LI Y ET AL. Study familial hypertrophic cardiomyopathy using patient-specific induced pluripotent stem cells. *Cardiovasc Res* 2014, 104:258–269
 70. WU H, LEE J, VINCENT LG, WANG Q, GU M, LAN F ET AL. Epigenetic regulation of phosphodiesterases 2A and 3A underlies compromised β -adrenergic signaling in an iPSC model of dilated cardiomyopathy. *Cell Stem Cell* 2015, 17:89–100
 71. MA D, WEI H, LU J, HO S, ZHANG G, SUN X ET AL. Generation of patient-specific induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes as a cellular model of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Eur Heart J* 2013, 34:1122–1133
 72. ITZHAKI I, MAIZELS L, HUBER I, ZWI-DANTSIS L, CASPIO, WINTERSTERN A ET AL. Modelling the long QT syndrome with induced pluripotent stem cells. *Nature* 2011, 471:225–229
 73. FREEDMAN BS, BROOKS CR, LAM AQ, FU H, MORIZANE R, AGRAWAL V ET AL. Modelling kidney disease with CRISPR-mutant kidney organoids derived from human pluripotent epiblast spheroids. *Nat Commun* 2015, 6:8715

74. TAKASATO M, ER PX, CHIU HS, MAIER B, BAILLIE GJ, FERGUSON C ET AL. Kidney organoids from human iPS cells contain multiple lineages and model human nephrogenesis. *Nature* 2016, 536:238
75. DYE BR, HILL DR, FERGUSON MA, TSAI YH, NAGY MS, DYAL R ET AL. *In vitro* generation of human pluripotent stem cell derived lung organoids. *Elife* 2015, 4
76. RASHID ST, CORBINEAU S, HANNAN N, MARCINIAK SJ, MIRANDA E, ALEXANDER G ET AL. Modeling inherited metabolic disorders of the liver using human induced pluripotent stem cells. *J Clin Invest* 2010, 120:3127–3136
77. CHOI SM, KIM Y, SHIM JS, PARK JT, WANG RH, LEACH SD ET AL. Efficient drug screening and gene correction for treating liver disease using patient-specific stem cells. *Hepatology* 2013, 57:2458–2468
78. MANDAI M, WATANABE A, KURIMOTO Y, HIRAMI Y, MORINAGA C, DAIMONT ET AL. Autologous induced stem-cell-derived retinal cells for macular degeneration. *N Engl J Med* 2017, 376:1038–1046
79. TSAI Y, LU B, BAKONDI B, GIRMAN S, SAHABIAN A, SAREEN D ET AL. Human iPSC-derived neural progenitors preserve vision in an AMD-like model. *Stem Cells* 2015, 33:2537–2549
80. KAMAO H, MANDAI M, OKAMOTO S, SAKAI N, SUGA A, SUGITA S ET AL. Characterization of human induced pluripotent stem cell-derived retinal pigment epithelium cell sheets aiming for clinical application. *Stem Cell Reports* 2014, 2:205–218
81. LI Y, WU WH, HSU CW, NGUYEN HV, TSAI YT, CHAN L ET AL. Gene therapy in patient-specific stem cell lines and a preclinical model of retinitis pigmentosa with membrane frizzled-related protein defects. *Mol Ther* 2014, 22:1688–1697
82. LI Y, TSAI YT, HSU CW, EROL D, YANG J, WU WH ET AL. Long-term safety and efficacy of human-induced pluripotent stem cell (iPS) grafts in a preclinical model of retinitis pigmentosa. *Mol Med* 2012, 18:1312–1319
83. YOSHIDA T, OZAWA Y, SUZUKI K, YUKI K, OHYAMA M, AKAMATSU W ET AL. The use of induced pluripotent stem cells to reveal pathogenic gene mutations and explore treatments for retinitis pigmentosa. *Mol Brain* 2014, 7:45
84. NORI S, OKADA Y, YASUDA A, TSUJI O, TAKAHASHI Y, KOBAYASHI Y ET AL. Grafted human-induced pluripotent stem-cell-derived neurospheres promote motor functional recovery after spinal cord injury in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011, 108:16825–16830
85. KOBAYASHI Y, OKADA Y, ITAKURA G, IWAI H, NISHIMURA S, YASUDA A ET AL. Pre-evaluated safe human iPSC-derived neural stem cells promote functional recovery after spinal cord injury in common marmoset without tumorigenicity. *PLoS One* 2012, 7:e52787
86. KAZUKI Y, HIRATSUKA M, TAKIGUCHI M, OSAKI M, KAJITANI N, HOSHIYA H ET AL. Complete genetic correction of ips cells from Duchenne muscular dystrophy. *Mol Ther* 2010, 18:386–393
87. KAMBAL A, MITCHELL G, CARY W, GRUENLOH W, JUNG Y, KALOMOIRIS S ET AL. Generation of HIV-1 resistant and functional macrophages from hematopoietic stem cell-derived induced pluripotent stem cells. *Mol Ther* 2011, 19:584–593
88. ZHU S, RUSS HA, WANG X, ZHANG M, MAT, XU T ET AL. Human pancreatic beta-like cells converted from fibroblasts. *Nat Commun* 2016, 7:10080
89. GURDON JB, ELSDALE TR, FISCHBERG M. Sexually mature individuals of *Xenopus laevis* from the transplantation of single somatic nuclei. *Nature* 1958, 182:64–65
90. HOWARD-JONES RA, CHEUNG OK, GLEN A, ALLEN ND, STEPHENS P. Integration-free reprogramming of lamina propria progenitor cells. *J Dent Res* 2016, 95:882–888
91. CAIAZZO M, DELL'ANNO MT, DVORETSKOVA E, LAZAREVIC D, TAVERNA S, LEO D ET AL. Direct generation of functional dopaminergic neurons from mouse and human fibroblasts. *Nature* 2011, 476:224–227
92. SONG G, PACHER M, BALAKRISHNAN A, YUAN Q, TSAY HC, YANG D ET AL. Direct reprogramming of hepatic myofibroblasts into hepatocytes *in vivo* attenuates liver fibrosis. *Cell Stem Cell* 2016, 18:797–808

Corresponding author:

V. Zoumpourlis, Institute of Biology, Medicinal Chemistry and Biotechnology, National Hellenic Research Foundation, 48 Vassileos Constantinou Ave., 116 35 Athens, Greece
e-mail: vzub@eie.gr