

Indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste — geneza, problemy oraz perspektywy wykorzystania w terapii chorób serca

Induced pluripotential stem cells — perspectives of clinical application in cardiovascular diseases

Tomasz Kolanowski, Maciej Kurpisz

Instytut Genetyki Człowieka, Polska Akademia Nauk, Poznań

Streszczenie

W 2006 roku opublikowano pierwsze wyniki badań nad genetycznymi podstawami indukcji pluripotencji komórkowej z finalnie zróżnicowanej komórki somatycznej dorosłego organizmu. Dokonano w tym celu transfekcji i wywołano efektywną nadekspresję 4 czynników (OCT4, SOX-2, c-MYC, KLF4) umożliwiającą osiągnięcie pluripotencji przez komórki znajdujące się w końcowym stadium zróżnicowania, co dotąd było możliwe jedynie przez klonowanie w wyniku transferu diploidalnego jądra komórkowego do enukleowanego oocyty. Wkrótce pojawiły się kolejne doniesienia ukazujące możliwość przeprowadzenia opisanego procesu na różnych komórkach człowieka, co otworzyło możliwości zastosowania tych komórek w medycynie regeneracyjnej. W niniejszej pracy autorzy starają się podsumować dotychczasową wiedzę na temat indukowania pluripotencji, opisując współczesną wiedzę i problemy, które nadal trzeba rozwiązać, aby rozpocząć próby kliniczne z wykorzystaniem indukowanych, pluripotencjalnych komórek macierzystych. Szczególną uwagę poświęcono zastosowaniu tej technologii w dziedzinie leczenia chorób naczyniowo-sercowych.

Słowa kluczowe: komórki macierzyste, indukowane komórki pluripotencjalne, medycyna regeneracyjna, choroby naczyniowo-sercowe

Abstract

In 2006 were reported first results on induction of pluripotential stem cells from adult somatic cells. It was successfully performed transfection by using genetic engineering and the effective overexpression of four transcription factors, OCT4, SOX2, c-MYC, KLF4 has been obtained. Thus pluripotency was induced in finally differentiated mammalian somatic cells with comparable to embryonic stem cells morphological and transcriptomic profiles. Before, it was only possible by using cloning procedure with diploid nucleus transfer to enucleated oocyte. Soon after range of reports appeared describing genetic modifications of variety human somatic cells enabling them pluripotency. The aim of this article was to summarise a present knowledge with several listed goals to be achieved before the first clinical trials with induced pluripotent stem cells can be feasible. Aspects of cardiovascular diseases treatment have been outlined.

Key words: stem cells, induced pluripotency, regenerative medicine, cardiovascular disease

Kardiol Pol 2010; 68, supl. V: 412–417

Adres do korespondencji:

prof. Maciej Kurpisz, Zakład Biologii Rozrodu i Komórki Macierzystej, Instytut Genetyki Człowieka, Polska Akademia Nauk, ul. Strzeszyńska 32, 60–479 Poznań, tel: +48 61 657 92 02, faks: +48 61 823 32 35, e-mail: kurpimac@man.poznan.pl

WSTĘP

Terapia komórkowa jest wykorzystywana w celach medycyny regeneracyjnej już od prawie 20 lat. Mimo opracowania nowych technologii (m.in. hodowla płatów skóry do przeszczepów) wiele dziedzin, w tym również kardiologia, nadal oczekuje na przełom, jaki miały przynieść komórki macierzyste. Opracowanie technologii regeneracji pozawałowego mięśnia sercowego bądź biologicznego rozrusznika (*pacemaker*) pozwoliłoby milionom pacjentów na powrót do normalnego trybu życia.

Spośród wielu rodzajów komórek macierzystych największe emocje wzbudzają embrionalne komórki macierzyste (ESC, *embryonal stem cells*), które dzięki możliwości różnicowania się w dowolną komórkę dorosłego organizmu mogłyby znacznie poszerzyć wachlarz zastosowań medycyny regeneracyjnej. Wątpliwości budzi natomiast sposób ich pozyskania łączący się z wykorzystaniem ludzkich zarodków. Doniesienie Takahashiego i Yamanaki [1] na temat indukcji pluripotencji komórek mysich oraz później ludzkich w 2007 roku wymusiło pewną zmianę stanowiska naukowców w stosunku do komórek embrionalnych. Otóż opracowana technika indukowania pluripotencji, dzięki zastosowaniu zaawansowanych metod inżynierii genetycznej, umożliwiła pozyskiwanie z komórek somatycznych osobników dorosłych komórek o potencjale rozwojowym podobnym do ESC.

INDUKCJA PLURIPOTENCJI KOMÓREK SOMATYCZNYCH

Na podstawie wcześniejszych doniesień informujących o możliwości przeprogramowania jąder komórek somatycznych po ich fuzji z embrionalnymi komórkami macierzystymi [2, 3] grupa Takahashiego, wybrała 24 geny odpowiedzialne za utrzymanie stanu pluripotencji. Następnie, wykorzystując wektor retrowirusowy, doprowadzono do ich egzogennej ekspresji w różnych kombinacjach i w efekcie wyselekcjonowano 4 geny kodujące, niezbędne dla procesu odróżnicowywania komórek somatycznych czynnikami. Są to: OCT-3/4, SOX2, KLF4 i c-MYC. Dwa pierwsze uważa się za kluczowe w utrzymywaniu pluripotencji komórek [4, 5]. Geny KLF4 i c-MYC to czynniki protoonkogenne, lecz jak wykazała grupa Takahashiego, tylko one z całego zestawu znanych protoonkogenów są konieczne do indukcji pluripotencji. Uważa się, że czynnik transkrypcyjny c-MYC działa poprzez indukcję globalnej acetylacji histonów [6] (prawdopodobnie ma > 25 000 miejsc wiązania w genomie ssaczym [7]), umożliwiając w ten sposób OCT-3/4 i SOX2 wiązanie do własnych specyficznych miejsc. Funkcja KLF4 w tym mechanizmie nie jest do końca sprecyzowana, jednak Takahashi i Yamanaka [1] uważają, że poprzez hamowanie ekspresji białka P53 [8], które z kolei jest między innymi inhibitorem NANOG podczas różnicowania ESC [9], KLF4 może się przyczyniać do aktywacji NANOG i innych czynników specyficznych dla embrionalnych komórek macierzystych. Inhibitor

NANOG jest zaś, poza OCT3/4 i SOX2, uważany za najważniejszy czynnik utrzymujący pluripotencję komórek [4, 5].

Prócz podobieństwa wykazanego przez prawie identyczny wzór ekspresji (w badaniach z wykorzystaniem mikromacierzy [1]) indukowane pluripotencjne komórki macierzyste (iPSC, *induced pluripotent stem cells*) mają inne właściwości charakterystyczne dla komórek izolowanych z wczesnych zarodków. Należą do nich:

- formowanie kul zarodkowych (EB, *embryonic bodies*);
- tworzenie zarodków chimerowych i indukowanie potencjału rozwojowego osobników dorosłych (ssaki) poprzez iniekcję komórki pluripotencjalnej do blastocysty;
- tworzenie potworniaków po podskórnym podaniu komórek myszom immunokompetentnym, w wyniku czego obserwuje się powstawanie tkanek wywodzących się z wszystkich 3 listków zarodkowych [10].

Dalsze doświadczenia doprowadziły do otrzymania ludzkiego odpowiednika omawianych komórek przy użyciu takiego samego zestawu genów [11]. Potwierdzono w ten sposób konserwatywność systemu kontroli etapu różnicowania komórkowego oraz jednocześnie wykazano, że czynniki KLF4 i c-MYC zwiększają jedynie efektywność procesu odróżnicowywania, nie są zaś niezbędne do jego wystąpienia.

Bazując na wymienionych odkryciach, inne zespoły badawcze opracowały alternatywne zestawy genów umożliwiające indukcję pluripotencji (tab. 1). Wnioskując z dostępnej literatury, oczywiste zdaje się przypuszczenie, że liczba i rodzaj czynników, których nadekspresję należy wywołać, mogą w pewien sposób zależeć od stopnia zróżnicowania komórek wyjściowych. Sądząc po dynamice badań w tym zakresie, w niedalekiej przyszłości uda się zaindukować pluripotencję w wielu innych typach komórek. Obserwując różnice w już ustalonych protokołach, prawdopodobnie z wielu różnych możliwości zostanie wyselekcjonowany model najlepiej odpowiadający wymaganiom klinicznej medycyny regeneracyjnej.

MOLEKULARNY MECHANIZM ODRÓŻNICOWYWANIA

W większości przypadków podczas omawiania rodzajów komórek macierzystych przedstawia się je w sposób zhierarchizowany: w kolejności od komórek o największym potencjale rozwojowym (totipotencjalne), do będących jedynie prekursorami komórek funkcjonalnych (unipotencjalne). Z powodu takiego przedstawienia zjawisko różnicowania komórek uznaje się za proces nieodwracalny i odbywający się poprzez stopniowe wyciszanie czynników odpowiedzialnych za kolejne poziomy zróżnicowania, limitujący jednocześnie możliwość powrotu do poprzedniego stanu oraz powodujący aktywację genów związanych z bardziej zaawansowanym stanem zróżnicowania komórki. Odkrycie możliwości odróżnicowywania komórek oraz techniki transferu jąder somatycznych do komórek embrionalnych podają te założenia w wątpliwość.

Tabela 1. Przykładowe źródła indukowanych, pluripotencjalnych komórek macierzystych

Rodzaj materiału wyjściowego	Autorzy	Zastosowana konstrukcja
Fibroblasty	Takahashi i Yamanaka, 2006 [1] Yu i wsp. 2007 [32]	Oct 3/4, Sox2, Klf4, c-Myc/Oct 3/4, Sox2, Nanog, Lin28
Fibroblasty płodowe	Takahashi i Yamanaka, 2006 [1]	Oct 3/4, Sox2, Klf4, c-Myc
Komórki hematopoetyczne	Yu i wsp., 2007 [32]	Oct 3/4, Sox2, Nanog, Lin28
Mezenchymalne komórki macierzyste	Yu i wsp., 2007 [32]	Oct 3/4, Sox2, Nanog, Lin28
Hepatocyty	Aoi i wsp., 2008 [33]	Oct 3/4, Sox2, Klf4, c-Myc
Komórki nabłonkowe żołądka	Aoi i wsp., 2008 [33]	Oct 3/4, Sox2, Klf4, c-Myc
Komórki izolowane ze skóry właściwej	Tsai i wsp., 2010 [34]	Oct 3/4, Klf4
Komórki macierzyste pochodzenia neurogenego	Kim i wsp., 2009 [35]	Oct 4

MacArthur i wsp. [12] sugerują istnienie innego mechanizmu kontrolującego stan zróżnicowania komórek. Przedstawili oni komputerowy model oparty na biologicznej roli rozpoznanych czynników endo- i egzogennych. Podstawą opracowania systemu były 3 odkrycia:

- zakonserwowany rdzeń mechanizmu odróżnicowywania utworzony przez OCT4/SOX2/NANOG [13];
- 3 wymienione czynniki oddziałują ze sobą, tworząc kompleksy białkowe, i wpływają na siebie, wzajemnie się aktywując [5];
- OCT4, NANOG i SOX2 są czynnikami o szerokim spektrum działania, regulując ekspresję wielu innych genów prowadzących do różnicowania komórek [4]; brak ich ekspresji prowadzi do utraty stanu pluripotencji i rozpoczęcia procesu różnicowania.

W komputerowej symulacji MacArthur i wsp. starali się odzwierciedlić mechanizmy zachodzące w trakcie procesu różnicowania w komórki mezodermalne. Wyznaczono podstawowe zależności pomiędzy czynnikami odpowiedzialnymi za utrzymanie pluripotencji (OCT4, SOX2 i NANOG) oraz tymi, które determinują procesy specyficzne: osteogenezę (RUNX2), chondrogenezę (SOX9) oraz adipogenezę (PPAR- γ). Jak przyjęto w analizie, geny warunkujące pluripotencję stymulują swoją ekspresję poprzez wywieranie presji w kierunku powstawania kompleksów białkowych. Kompleksy te zaś, prócz efektu dodatniego sprzężenia zwrotnego, hamują ekspresję wszystkich czynników różnicowania (LSMGs, *lineage-specifying master genes*). Czynniki LSMGs działają poprzez autoaktywację oraz hamują geny odpowiedzialne za tworzenie iPSC, a także czynniki z grupy LSMGs, lecz aktywujące inną linię różnicowania. Dodatkowo cała sieć zależności była modyfikowana przez stymulację czynnikami zewnętrznymi, takimi jak BMP2 czy TGF β .

Aby zrozumieć mechanizmy rządzące procesem odróżnicowywania, należy porównać stan ekspresji omawianych czynników do trójwymiarowych wykresów płaszczyznowych, zaś zachowanie komórki do kuli poruszającej się po nierównościach obrazujących stany mniej bądź bardziej prawdopo-

dobne. Każdy stan komórki jest określany poprzez pewne lokalne minimum (najbardziej prawdopodobny poziom zróżnicowania w danych warunkach ekspresji), natomiast minimum globalne jest definiowane jako stan osiągany w całkowitym zróżnicowaniu komórki. Minima oraz drogi definiujące stany pośrednie pomiędzy nimi mogą być modyfikowane przez zastosowanie odpowiednich czynników egzogennych. Aby przejść do następnego stanu, należy początkowo dostarczyć bodziec (ekspresja czynnika destabilizującego aktualny stan komórki) i pokonać barierę definiującą minimum lokalne.

Dalsza symulacja potwierdziła obserwacje o stabilności poszczególnych stanów zróżnicowania — kolejne minima lokalne (stany zróżnicowania) cechują się coraz większą stabilnością i mniejszą podatnością na egzogenny czynnik destabilizujący wpływający na kierunek rozwoju komórki. Dlatego konieczne było zastosowanie wystarczająco wysokiej ekspresji niespecyficznych czynników transkrypcyjnych (OCT4 lub SOX2) przez dany okres, aby nie tylko zainicjować proces indukcji pluripotencji, lecz także prowadzić go do końca. Zdaniem autorów, ten sam efekt można osiągnąć przez niespecyficzne zwiększenie szumu tła ekspresji różnorodnych czynników, co powoduje silną destabilizację całego układu.

Omawiana teoria tłumaczy zjawisko silnej heterochromatyzacji [14] rejonów kodujących czynniki OCT4 i SOX2 podczas różnicowania komórek w trakcie ontogenezy — zmniejszenie ryzyka destabilizacji stanu komórki poprzez ich, choćby nikłą, ekspresję. Ponadto, zgodne z omówioną teorią zdają się obserwacje wielu grup badawczych dotyczące zwiększenia wydajności tworzenia iPSC w przypadku użycia dodatkowych czynników, takich jak c-MYC i KLF4 [15, 16], które będąc niespecyficznymi aktywatorami ekspresji, mogą zwiększać „szum tła”. Innym zjawiskiem pozostającym w zgodzie z omawianymi faktami jest utrzymanie pluripotencji komórek po usunięciu przejściowej ekspresji czynników wywołujących pluripotencję, zostaje zatem osiągnięte minimum lokalne będące jednocześnie najwyżej leżącym na płaszczyźnie z rozpatrywanych stanów.

MOŻLIWOŚCI TERAPEUTYCZNEGO ZASTOSOWANIA INDUKOWANYCH PLURIPOTENCJALNYCH KOMÓREK MACIERZYSTYCH

Ze względu na podobieństwo embrionalnych komórek macierzystych i o indukowanej pluripotencji wiele doświadczeń przeprowadzonych z wykorzystaniem ESC z pewnością znajdzie swoje odzwierciedlenie w przypadku iPSC. Bezpośrednie porównanie iPSC z ESC wynika nie tylko z badań nad ich ekspresją i morfologią — wykazano również ich podobny potencjał kardiomiogeny oraz możliwość różnicowania do kardiomiocytów przy użyciu podobnych protokołów [16]. Istnieją już doniesienia o zakończonych sukcesem próbach różnicowania iPSC także w miocyty mięśni gładkich czy komórki endotelialne [17].

Badania nad wykorzystaniem komórek pluripotencjalnych w terapii regeneracyjnej serca można podzielić na kilka obszarów:

1. Regeneracja mięśnia sercowego poprzez zwiększenie liczby funkcjonalnych kardiomiocytów
2. Tworzenie biologicznych rozruszników serca pozyskanych z komórek macierzystych
3. Stabilizacja elektryczna serca pozawałowego.

W doświadczeniach przeprowadzonych przy użyciu ESC zróżnicowanych w kardiomiocyty udowodniono możliwość oraz bezpieczeństwo tego typu terapii [18]. Najważniejszą obserwacją wynikającą z opisywanych doświadczeń jest pozytywne oddziaływanie implantacji na frakcję wyrzutową oraz inne parametry funkcjonalne serca i, co ważne, nie wydaje się ona spowodowana niekardiogennymi pochodnymi komórek embrionalnych [18, 19]. Choć prace dotyczące czasu trwania efektu poprawy funkcjonowania narządu nie są zgodne, to aby podjąć dyskusję na ten temat, należałoby przeprowadzić zdecydowanie większe badania kliniczne. Przypuszcza się, że właśnie technologia indukcji pluripotencji umożliwi prowadzenie badań nad regeneracją narządów na większą skalę, gdyż dotychczasowe opierają się jedynie na embrionalnych komórkach macierzystych.

Próby opracowania skutecznej terapii komórkowej uszkodzonego miokardium, skupiające się zasadniczo na transplantacjach zastępczych wobec kardiomiocytów, często nie uwzględniają istotnej roli innych tkanek, choć same kardiomiocyty stanowią jedynie 30% komórek tworzących serce w ujęciu ilościowym [20]. Wśród innych typów komórek wyróżnia się fibroblasty, mięśnie gładkie naczyń krwionośnych czy komórki endotelialne [20]. Odmiernym typem są komórki układu bodźcotwórczo-przewodzącego różniące się morfologicznie od innych komórek mięśnia sercowego. Dysfunkcja na jakimkolwiek z poziomów układu bodźcotwórczo-przewodzącego serca może prowadzić do wystąpienia arytmii. Statystyki podają, że 3 miliony ludzi na świecie mają sztuczny rozrusznik serca, zaś prawie 600 tysięcy poddaje się co roku takiej operacji [21]. Choć urządzenia te są użyteczne w korekcji schorzeń związanych z zaburzeniami przewodzenia,

to jednak same powodują również wiele zagrożeń i problemów, wśród których można wyróżnić: zwiększoną podatność na infekcje, ograniczoną długość funkcjonowania baterii, dyskomfort związany ze stałą implantacją sztucznego obiektu czy brak odpowiedzi rozrusznika na regulację nerwową i hormonalną pochodzącą z ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Wymienione problemy doprowadziły do rozpoczęcia badań nad stworzeniem biologicznego rozrusznika poprzez implantację komórek o właściwościach bodźcotwórczych [22, 23]. Przykładem badań nad terapią, w której teoretycznie mogłyby zostać wykorzystane iPSC, jest transplantacja zdeterminowanych wcześniej w kierunku kardiomiocytów ESC (formujących ciała embrionalne) do serca świni z całkowitym blokiem przewodzenia. W wyniku tego zabiegu komory serca utrzymywały akcję skurczową na poziomie 60 uderzeń/minutę [24].

Częstym powikłaniem po przebytych zawale jest arytmia serca. Grupa Fleischmanna [25] wykazała, że transplantacja kardiomiocytów w modelu mysim, mających podobne właściwości fizjologiczne do kardiomiocytów pozyskiwanych w wyniku różnicowania ESC, wywołała efekt protekcyjny, powodując zmniejszenie o ok. 60% częstość występowania arytmii w sercu pozawałowym. Z drugiej jednak strony rozważania czysto teoretyczne sugerują, że komórki te mogą się przyczyniać do powstawania bodźców proarytmicznych poprzez wszystkie fundamentalne mechanizmy arytmii: wykazują pewną automatyzację skurczów [23], są podatne na zaburzenia repolaryzacji [26] oraz występowanie zjawiska *re-entry* poprzez heterogenność elektrofizjologiczną populacji [27]. Z tego względu konieczne są dodatkowe badania w celu zrozumienia zjawiska stabilizacji elektrycznej wykazanej przez grupę Fleischmanna [25].

OBECNY STAN WIEDZY

Indukowane, pluripotencjalne komórki macierzyste mają wiele bezdyskusyjnych zalet, którymi są: praktycznie nieograniczona możliwość podziałów komórkowych, neutralność immunologiczna (są to zwykle komórki autologiczne) oraz wybór dowolnej tkanki, w którą można je różnicować. Nietety jednak, omawiane komórki cechują się również kilkoma wadami dotyczącymi głównie ich bezpieczeństwa i techniki pozyskania. Poniżej przedstawiono największe trudności wraz z propozycjami rozwiązań.

Pierwszym problemem, który został już częściowo rozwiązany, było wysokie ryzyko nowotworzenia spowodowane zastosowaniem czynników proonkogennych w metodzie Takahashiego [1]. Jak wcześniej wspomniano, udało się jednak wywołać indukcję pluripotencji bez nadekspresji *c-Myc* i *Klf4* oraz jednocześnie zniwelować liczbę nowotworów u myszy chimerowych i ich potomstwa do zera. Również inne, wcześniej wymienione zespoły badawcze mają na tym polu znaczne osiągnięcia.

Innym powodem do obaw są wektory używane do transfekcji komórek. Ich wirusowe pochodzenie, a zwłaszcza

Tabela 2. Przykładowe wektory wykorzystywane dla indukcji pluripotencji w komórkach zróżnicowanych

Nazwa nośnika	Autorzy	Uwagi
Wektor retrowirusowy	Takahashi i Yamanaka, 2006 [1]	Integrujący z genomem, odpowiednia pojemność, największe ryzyko wywołania mutacji
Wektor adenowirusowy	Stadtfeld i wsp., 2008 [36]	Nieintegrujący z genomem, stosunkowo niska wydajność transfekcji
Wektor lentiwirusowy	Yu i wsp., 2007 [32]	Nieintegrujący, zwiększona wydajność transfekcji w stosunku do adenowirusów
Wektor na bazie wirusa Sendai	Fusaki i wsp., 2009 [37]	Nieintegrujący z genomem wirusa RNA, liczba jednostek wirusowych w komórkach zmniejsza się w czasie, niska wydajność
Wektory plazmidowe	Okita i wsp., 2008 [38]	Wektor niewirusowy, mała pojemność, konieczność wykorzystywania większej liczby wektorów
System transpozazy	Woltjen i wsp., 2009 [31]	Integrujący, możliwość dokładnego usunięcia sekwencji, ryzyko wystąpienia mutacji insercyjnej
Modyfikowane białka	Zhou i wsp., 2009 [39]	Nieintegrujący, konieczność kontroli stężenia podczas trwania procesu, niska wydajność
System ekspresji oparty na promotorze indukcyjnym	Wernig i wsp., 2008 [40]	Możliwość indukcji pluripotencji komórek w dowolnym okresie rozwoju, konieczność stworzenia linii zwierząt transgenicnych, brak zastosowania w klinice

konieczność integracji z genomem, może powodować zmiany w sekwencjach genów ważnych dla prawidłowego funkcjonowania komórki. Trwają jednak poszukiwania nowych wektorów do transfekcji komórek spełniających stawiane warunki. W standardowej metodzie Takahashiego zakładano wykorzystanie wektorów retrowirusowych integrujących z genomem. Późniejsze doniesienia informują o możliwości przeprowadzenia całego procesu dzięki wykorzystaniu wielu innych znanych systemów transfekcji komórek eukariotycznych, co przedstawiono w tabeli 2.

Kolejną trudnością jest prawdopodobnie sam proces różnicowania komórek, ponieważ obecnie stosowane protokoły różnicowania ESC oraz iPSC do kardiomiocytów nie osiągnęły jeszcze oczekiwanych wydajności. Obserwuje się jednak znaczący postęp w liczbie pozyskiwanych komórek (< 50% kardiomiocytów z komórek pluripotentnych) [28–30] oraz w zwiększaniu jednorodności otrzymanej populacji dzięki zastosowaniu w trakcie procesu różnicowania selekcji komórek metodami cytometrycznymi.

Innym problemem towarzyszącym różnicowaniu, związanym z rodzajem wektora używanego do wprowadzania genu jest brak optymalnej metody wygaszenia ekspresji spowodowanej czynnikami egzogennymi. Mimo wielu propozycji, przedstawionych częściowo w tabeli 2, każda z metod powoduje pewne problemy, z którymi należałoby się uporać, zanim znajdą one zastosowanie kliniczne. Najciekawszą propozycją wydaje się system z wykorzystaniem transpozazy, który zapewnia odpowiednią ekspresję czynników odróżnicowujących, po zakończeniu procesu zaś całą konstrukcję

można usunąć z genomowego DNA, uzyskując komórki o niezmiennym kodzie genetycznym. Najnowsze systemy zastosowane m.in. przez Woltjena i wsp. [31] generują bardzo mało błędów, co znacząco przybliżyło tę technologię do zastosowania klinicznego.

PODSUMOWANIE

Podsumowując zagadnienie indukowania pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPSC), ich wytwarzanie jest prawdopodobnie przełomem w badaniach nad regeneracją narządową. Dotychczasowa terapia wykorzystująca autologiczne komórki macierzyste pozyskiwane z organizmów dorosłych, mimo częściowych sukcesów, napotykała problemy związane z ich niewielką plastycznością, w przypadkach stosowania (allogenicznych) komórek embrionalnych konieczna zaś była immunosupresja. Ponadto badania nad ESC w większości, ze względów bezpieczeństwa, ograniczały się do modeli zwierzęcych.

Poprzez sam sposób uzyskiwania i podstawową ich właściwość — pluripotencję — iPSC zyskują przewagę nad innymi rodzajami komórek macierzystych w medycynie regeneracyjnej. Nie dziwi więc duże zainteresowanie badaczy tą właśnie tematyką oraz ogromne środki poświęcane na zbadanie mechanizmu indukcji pluripotencji, a także różnic pomiędzy ESC oraz iPSC. Po 4 latach od momentu odkrycia możliwości przeprowadzenia procesu indukowania pluripotencji istnieją już wymierne korzyści z tak intensywnych badań. Praktycznie każdy z początkowo napotkanych problemów oddzielających iPSC od ich zastosowania klinicznego

został częściowo zniwelowany. Jednocześnie intensywne badania nad zjawiskiem odróżnicowywania dostarczają dodatkowej wiedzy na temat molekularnych podstaw rozwoju embrionalnego.

Najprawdopodobniej indukowane, pluripotencjalne komórki macierzyste znajdują zastosowanie w szerokim spektrum prób klinicznych nie tylko z dziedziny chorób sercowo-naczyniowych, lecz także dotyczących uciążliwych chorób układu nerwowego.

Piśmiennictwo

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. Tada M, Tada T, Lefebvre L, Barton SC, Surani MA. Embryonic germ cells induce epigenetic reprogramming of somatic nucleus in hybrid cells. *EMBO J*, 1997; 16: 6510–6520.
3. Cowan CA, Atienza J, Melton DA, Eggan K. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science*, 2005; 5739: 1369–1373.
4. Boyer L, Lee T, Cole M et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*, 2005; 122: 947–956.
5. Loh Y, Wu Q, Chew I et al. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat Genet*, 2006; 38: 431–440.
6. Fernandez P, Frank S, Wang L et al. Genomic targets of the human c-Myc protein. *Genes Dev*, 2003; 17: 1115–1129.
7. Cawley S, Bekiranov S, Ng HH et al. Unbiased mapping of transcription factor binding sites along human chromosomes 21 and 22 points to widespread regulation of noncoding RNAs. *Cell*, 2004; 116: 499–509.
8. Rowland B, Bernards R, Peeper D. The KLF4 tumour suppressor is a transcriptional repressor of p53 that acts as a context-dependent oncogene. *Nat Cell Biol*, 2005; 7: 1074–1082.
9. Lin T, Chao C, Saito S et al. p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing Nanog expression. *Nat Cell Biol*, 2005; 7: 165–171.
10. Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2007; 448: 313–318.
11. Park I, Zhao R, West J et al. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factor. *Nature*, 2008; 451: 141–146.
12. MacArthur BD, Pleasance CP, Oreffo ROC. Stochasticity and the molecular mechanisms of induced pluripotency. *PLoS One*, 2008; 3: e3086.
13. Jaenisch R, Young R. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell*, 2008; 132: 567–582.
14. Feldman N, Gerson A, Fang J et al. G9a-mediated irreversible epigenetic inactivation of Oct-3/4 during early embryogenesis. *Nat Cell Biol*, 2006; 8: 188–194.
15. Yamanaka S. Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 2007; 1: 39–49.
16. 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.
17. Schenke-Layland K, Rhodes K, Angelis E et al. Reprogrammed mouse fibroblasts differentiate into cells of the cardiovascular and hematopoietic lineages. *Stem Cells*, 2008; 26: 1537–1546.
18. Caspi O, Huber I, Kehat I et al. Transplantation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes improves myocardial performance in infarcted rat hearts. *J Am Coll Cardiol*, 2007; 50: 1884–1893.
19. van Laake L, Passier R, Monshouwer-Kloots J et al. Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes survive and mature in the mouse heart and transiently improve function after myocardial infarction. *Stem Cell Res*, 2007; 1: 9–24.
20. Shiba Y, Hauch KD, Laflamme MA. Cardiac applications for human pluripotent stem cells. *Curr Pharm Des*, 2009; 15: 2791–2806.
21. Wood MA, Ellenbogen KA. Cardiology patient pages. Cardiac pacemakers from the patient's perspective. *Circulation*, 2002; 105: 2136–2138.
22. Potapova I, Plotnikov A, Lu Z et al. Human mesenchymal stem cells as a gene delivery system to create cardiac pacemakers. *Circ Res*, 2004; 94: 952–959.
23. Xue T, Cho HC, Akar FG et al. Functional integration of electrically active cardiac derivatives from genetically engineered human embryonic stem cells with quiescent recipient ventricular cardiomyocytes. Insights into the development of cell-based pacemakers. *Circulation*, 2005; 111: 11–20.
24. Kehat I, Khimovich L, Caspi O et al. Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, 2004; 22: 1282–1289.
25. Roell W, Lewalter T, Sasse P et al. Engraftment of connexin 43-expressing cells prevents post-infarct arrhythmia. *Nature*, 2007; 450: 819–824.
26. Zhang YM, Hartzell C, Narlow M, Dudley SC Jr. Stem cell-derived cardiomyocytes demonstrate arrhythmic potential. *Circulation*, 2002; 106: 1294–1299.
27. Laflamme MA, Gold J, Xu C et al. Formation of human myocardium in the rat heart from human embryonic stem cells. *Am J Pathol*, 2005; 167: 663–671.
28. Laflamme MA, Chen KY, Naumova AV et al. Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat Biotechnol*, 2007; 25: 1015–1024.
29. Graichen R, Xu X, Braam SR et al. Enhanced cardiomyogenesis of human embryonic stem cells by a small molecular inhibitor of p38 MAPK. *Differentiation*, 2008; 76: 357–370.
30. Yang L, Soonpaa MH, Adler ED et al. Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR(+) embryonic-stem-cell-derived population. *Nature*, 2008; 453: 524–528.
31. Wolftjen K, Michael IP, Mohseni P et al. piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2009; 458: 766–770.
32. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 2007; 318: 1917–1920.
33. 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.
34. Tsai SY, Clavel C, Kim S et al. Oct4 and klf4 reprogram dermal papilla cells into induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*, 2010; 28: 221–228.
35. Kim JB, Sebastiano V, Wu G et al. Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell*, 2009; 136: 411–419.
36. Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, Weir G, Hochedlinger K. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science*, 2008; 322: 945–949.
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. 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.
39. Zhou H, Wu S, Joo JY et al. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell*, 2009; 4: 381–384.
40. Wernig M, Lengner CJ, Hanna J et al. A drug-inducible transgenic system for direct reprogramming of multiple somatic cell types. *Nat Biotechnol*, 2008; 26: 916–924.