



Sveriges lantbruksuniversitet

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

**Metoder som minskar bildning av teratom vid *in vivo*
transplantation av inducerade pluripotenta celler**

Therese de Haan

Självständigt arbete i veterinärmedicin, 15 hp

Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2013:60

Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Uppsala 2013..



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Metoder som minskar bildning av teratom vid *in vivo* transplantation av inducerade pluripotenta celler

Methods that reduce the formation of teratomas when transplantating induced pluripotent stem cells.

Therese de Haan

Handledare:

Eva Hellmén, SLU, Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi

Examinator:

Eva Tydén, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Omfattning: 15 hp

Kurstitel: Självständigt arbete i veterinärmedicin

Kurskod: EX0700

Program: Veterinärprogrammet

Nivå: Grund, G2E

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2013

Omslagsbild: -

Serienamn, delnr: Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2013: 60
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, SLU

On-line publicering: <http://epsilon.slu.se>

Nyckelord: Inducerade pluripotenta celler, iPS-celler, pluripotens, teratom, cancerceller, virala vektorer, transgener, Oc3/4, Klf4, Sox2, c-Myc.

Key words: Induced pluripotent stem cells, iPS cells, pluripotency, teratoma, tumorigenicity, cancer, cancer cells, viral vectors, transgenes, Oc3/4, Klf4, Sox2, c-Myc

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning	1
Abstract	2
Introduktion	3
Material och Metoder	4
Litteraturoversikt	4
Vad är iPS-celler?.....	4
Transplantation av iPS-celler ger upphov till teratom och teratocarcinom.....	5
IPS-cellers cancerbildande förmåga och likhet med cancerceller.....	5
Genuttryck och epigenetiska egenskaper kopplade till iPS-cellernas tumörbildandeförmåga.	6
MikroRNA	6
Förlängning av telomerer och telomerasaktivitet.....	7
Genetiska förändringar, transgener och integration av virala vektorer	8
p53.....	10
Hur kan man förhindra bildning av teratom och teratocarcinom vid transplantation av iPS celler?	10
Differentiering.....	10
L-Myc och transformationsdefekt c-Myc	10
Framtagning av iPS-celler utan retrovirus och lentivirus.....	11
Avlägsnande av transgener efter omprogrammering	13
Metformin.....	13
Apoptosgener	14
Ökad dos av tumörsuppressorer	14
Diskussion	15
Slutsats	17
Referenser.....	18

SAMMANFATTNING

Inducerad pluripotens innebär att man inducerar mogna celler till att övergå i ett pluripotent stadium och bilda så kallade inducerade pluripotenta celler (iPS-celler). Detta görs till exempel genom viral integration av transkriptionsfaktorerna octamer-binding transcription factor 3 och 4 (Oct3/4), sex determining region Y-box 2 (Sox2), Krüppel-like factor 4 (Klf4) och c-Myc. Pluripotenta celler har förmågan att bilda vilken vävnadstyp som helst i kroppen och detta vill man i framtiden använda för behandling av olika degenerativa tillstånd så som Parkinsons sjukdom. Idag kan iPS-celler inte användas kliniskt eftersom de ger upphov till tumörtyperna teratom och teratokarcinom vid injektion *in vivo*. Under de senaste åren har mycket forskning lagts ned på att hitta metoder som förhindrar/minskar teratombildningen.

Ett sätt att förhindra detta är genom att låta iPS-celler differentiera, så att deras pluripotensgrad minskar innan de injiceras. Den ursprungliga metoden med de fyra transkriptionsfaktorerna innebär användning av virala vektorer och eftersom dessa har associerats med tumörbildning har man försökt hitta alternativa metoder som effektivt kan inducera pluripotens utan användning av retro- eller lentivirus. För induktion utan virala vektorer har man bl.a. använt plasmider, episomala vektorer och icke-bakteriella minicircle DNA-segment.

De transgener som används vid induktion av pluripotenta celler (Oct3/4, Sox2, Klf4 och c-Myc) har också visat sig vara relaterade till tumörbildning. Genom användning av Cre/LoxP och PiggyBac transposoner har man kunnat plocka bort transkriptionsfaktorerna efter det att omprogrammeringen har skett. Man har också inducerat pluripotens genom att enbart stimulera celler med transkriptionsfaktorernas (Oct3/4, Sox2, Klf4 och c-Myc) proteiner, vilket gör att man lättare kan kontrollera hur stora induktionsstimuli cellerna utsätts för. Den metod som hittills har visat sig vara effektivast för induktion av pluripotens är användning av mikroRNA. Denna metod ger ingen integration av transkriptionsfaktorerna, men ger däremot en integration av lentivirusvektorn som används vid framställning.

Flera andra metoder har också undersökts. En av dessa metoder innebär behandling med diabetes läkemedlet Metformin efter det att iPS-celler har injicerats *in vivo* och denna metod visade sig minska den teratombildande förmågan hos iPS-cellerna. Man har också med hjälp av apoptogener inducerat apoptos hos odifferentierade iPS-celler samt hos transformerade onkogenetiska iPS-celler. Apoptogenerna har visat sig vara mycket effektiva för att förhindra teratombildning och i studier har man hos flera möss inte kunnat iaktta några teratom. Även en ökad dos av suppressorgenerna p53 och Ink4a/ARF har visat en effektiv minskning av teratombildningen, både i förekomst och storlek. Man har dessutom sett att celler med en extra upplaga av suppressorgener svarat bättre på kemoterapibehandling.

ABSTRACT

Induction of pluripotency means that you reprogram somatic cells into a state of pluripotency (iPS cells) comparable to that of stem cells. This can be achieved by viral integration of the transcription factors octamer-binding transcription factor 3 och 4 (Oct3/4), sex determining region Y-box 2 (Sox2), Krüppel-like factor 4 (Klf4) and c-Myc. Pluripotent cells have the ability to form any celltype and scientists hope that these cells will become an important key to new techniques for treatment of degenerative diseases, such as Parkinsons disease. Clinical use of iPS cells is however still not possible due to the formation of teratomas and teratocarcinomas that occurs when iPS cells are transplanted *in vivo*. A lot of scientific efforts have focused on finding methods that inhibit or decrease the tumorigenicity of iPS-cells.

One way to decrease the tumorigenicity of iPS cells is by letting the cells differentiate before they are transplanted. When their pluripotency is reduced, so is their tumorigenicity. The process of reprogramming somatic cells to iPS cells includes the use of viral vectors. These have been associated with tumor formation and therefore scientist have tried to find alternative methods, to produce iPS cells, that do not acquire the use of retro- or lentiviral vectors. Plasmids, episomal vectors and minicircle DNA can be used for this purpose.

The transcription factors that are used to reprogram cells into iPS cells (Oct3/4, Sox2, Klf4 and c-Myc) have been associated with different kinds of tumorformation. By using Cre/LoxP and PiggyBac transposons scientist have successfully been able to remove the transcriptionfactors after reprogramming. Another way to minimize the impact of the transcription factors is to directly stimulate the cells with the proteins. In this way scientists have been able to gain better control of the amount of stimuli that the cells are exposed to and to reduce the impact of the transcription factors after the reprogramming process is finished. This method is however very ineffective and therefore not commonly used. Induction with microRNA has so far been the most effective method of reprogramming iPS cells. This method does not include integration of the transcription factors, but does give an integration of the acquired lentiviral vector.

Other methods that have been explored include treating mice with Metformin, an antidiabetic drug, after injecting iPS cells *in vivo*. Metformin has been shown to decrease the formation of teratomas in size, weight and occurrence after iPS cell transplantation. Genes that induce apoptosis have also been shown to have a great impact on the formation of teratomas. An increased dosage of the tumor suppressor genes p53 and Ink4a/ARF can give an effective decrease in teratomaformation. Cells with an additional p53 or Ink4a/ARF gene have also been shown to respond better to chemotherapy treatment.

INTRODUKTION

Nobelpriset i medicin och fysiologi år 2012 gick till John B. Gurdon och Shinya Yamanaka för upptäckten att mogna celler kan omprogrammeras till pluripotentstadium (Nobel Foundation). Detta var ett enormt framsteg inom stamcellsforskningen och lösningen på den etiska problematiken kring användandet av embryonala stamceller. I och med denna upptäckt kan man istället använda somatiska celler och omprogrammera dessa till inducerade pluripotenta stamceller (iPS-celler).

IPS-celler kan med de rätta metoderna omvandlas till vilken celltyp som helst. I framtiden hoppas forskarna att detta ska kunna användas för stamcellsterapi och generera celler som sedan kan transplantera till patienter. IPS-celler kommer också att få en avgörande roll vid framtagning av läkemedel och olika toxikologiska tester. Yamanaka och Gurdons upptäckter har revolutionerat forskarvärlden och ändrat många forskares sätt att tänka. Förr trodde man att celler var fixerade i sina utvecklingsstadier och inte kunde återgå i mognadsgrad, men nu har man förstått att vi kan påverka cellernas pluripotensstadium och somatiska cellers fenotypiska egenskaper.

Ett stort hinder för klinisk användning av iPS-celler är bildning av teratom. Teratom är tumörer som innehåller olika celltyper/igenkännbara vävnadselement från samtliga av de tre groddbladen. Det här kandidatarbetet syftar till att sammanfatta den forskning som pågår kring teratomutveckling i samband med transplantation av iPS-celler samt utreda hur detta eventuellt kan komma att förhindras i framtiden. Min frågeställning som jag har jobbat utifrån är; "Vilka metoder finns för att förhindra bildning av teratom vid transplantation av iPS-celler *in vivo*?"

MATERIAL OCH METODER

Jag har sökt i databaserna Web of Knowledge och PubMed. Vissa av artiklarna har jag hittat genom att söka på google.

Vid mina sökningar använde jag följande sökord: Inducerade pluripotenta celler, iPS-celler, pluripotens, teratom, cancerceller, virala vektorer, transgener, Oct3/4, Klf4, Sox2, c-Myc

LITTERATURÖVERSIKT

Vad är iPS-celler?

Inducerade pluripotenta stamceller (iPS-celler) är celler med en morfologi och tillväxtegenskaper liknande de som ses hos embryonala stamceller, men som har sitt ursprung i mogna somatiska celler. Man har länge varit intresserad av att kunna omprogrammera celler och forskningen har gjort stora framsteg inom området. Dr J Gurdon som fick ta emot nobelpriset i medicin och fysiologi 2012 visade att man kan klona individer genom att ta somatiska tarmepitelcellkärnor från från *Xenopus* grodyngel och sedan transplantera dessa till oocyter, vars egen cellkärna tagits bort (Gurdon, J.B.,1962).

Shinya Yamanaka, den andra nobelprisatagaren i medicin och fysiologi 2012, hittade tillsammans med sina medarbetare de fyra transkriptionsfaktorer som idag främst används för generering av iPS-celler; octamer-binding transcription factor 3 and 4 (Oct3/4), sex determining region Y-box 2 (Sox2), Krüppel-like factor 4 (Klf4) och c-Myc. De hade en hypotes om att faktorer som var viktiga för upprätthållande av de embryonala stamcellernas identitet också borde ha en pluripotensinducerande effekt på somatiska celler. Utifrån denna hypotes valde de ut 24 tänkbara gener. Geneticin (G418) resistens användes som kontroll för att testa om pluripotens inducerats i cellerna. Genen för G418 resistensen ingick i ett β geo-komplex som sattes in på Fbx15 genen genom homologrekombination. Fördelen med Fbx15 genen är att den normalt uttrycks i embryonala stamceller utan att ha någon påverkan på deras pluripotens (Takahashi och Yamanaka 2006).

De 24 generna som de ville undersöka introducerades genom retroviral transduktion i embryonala fibroblaster från mus, som var homozygota för β geo och G418 på sitt Fbx15-locus. Yamanaka et al. (2006) kunde då visa att ingen av de 24 generna enskilt kunde aktivera Fbx15 och alltså inte heller inducera pluripotens. Alla 24 generna tillsammans gav ett antal kolonier med både G418 resistens och stamcellsliknande morfologi hos cellerna; runda i formen, stor kärna, lite cytoplasma. De kunde även visa att många transkriptionsfaktorer som är typiska för embryonala stamceller också uttrycktes i dessa celler. Efter noggranna studier av effekterna då olika transkriptionsfaktorer plockades bort, kom de fram till att Oct 3/4, Sox 2, Klf4 och c-Myc var de faktorer som hade störst inverkan och var kritiska vid omprogrammering av iPS celler. (Takahashi och Yamanaka 2006). Senare har man upptäckt att c-Myc kan utelämnas vid induktion av pluripotenta celler (Nakagawa et al., 2008). Yu et al. (2007) visade att man även kunde omprogrammera humana somatiska celler till iPS-celler med hjälp av de fyra transkriptionsfaktorerna Oct3/4, Sox2, Klf4 och c-Myc.

Senare såg man att det var möjligt att omprogrammera humana somatiska celler till pluripotenta celler genom att använda ett annat induktionsprogram än det som Yamanaka och hans medarbetare hade använt tidigare. Istället för c-Myc och Klf4 som är kända cancerrelaterade transkriptionsfaktorer använde de transkriptionsfaktorerna Lin28 och Nanog. Troligtvis har alltså Klf4, c-Myc, Nanog och Lin28 inte en avgörande effekt för att pluripotens ska kunna induceras. Effekten av dessa transkriptionsfaktorer har troligtvis en gynnande effekt på induktionen av pluripotens, vilket ger en ökning av effektiviteten vid generering av iPS-celler. Det bevisades dock att Oct3/4 och Sox2 är essentiella för generering av iPS-celler med transkriptionsfaktorer, då inga iPS-celler kunde genereras utan dessa. (Yu et al., 2007).

Transplantation av iPS-celler ger upphov till teratom och teratocarcinom.

iPS-celler är mer cancerogena än vad embryonala stamceller är (Ben-David & Benvenisty., 2011) och vid injektion har man visat att de spontant differentierar och bildar benigna teratom (Przyborski., 2005) och maligna teratocarcinom (Ben-David & Benvenisty., 2011). Teratom är tumörer som innehåller olika celltyper/igenkännbara vävnadselement från samtliga av de tre groddbladen. Att dessa tumörer bildas är ett tecken på att iPS-cellerna verkligen har omprogrammerats till pluripotens, men samtidigt också ett stort hinder för den kliniska användningen av iPS celler (Takahashi & Yamanaka 2006). Utöver teratom har man också sett utveckling av olika somatiska cancerformer, vilket kan vara cancer som härstammar från den vävnad som man tagit de reprogrammerade cellerna ifrån (Okita et al., 2007), men som också kan uppkomma på grund av genetiska och epigenetiska faktorer (Vazquez-Martin et al., 2012). Att cancer kan utvecklas gör att transplantation av iPS-celler till patienter än så länge är helt otänkbart.

iPS-cellers cancerbildande förmåga och likhet med cancerceller

iPS-cellers förmåga till obegränsad proliferation och pluripotens gör att de delar många cellulära och molekylära fenotyper med cancerceller enligt Ben-David och Benvenisty. (2011):

- Snabb proliferationshastighet (Ben-David och Benvenisty., 2011)
- Benägenhet till instabilitet i genomet som till exempel kan bero på att olika DNA reparationsmekanismer slagits ut (Ramos-Mejia et al., 2010).
- Mycket aktivt telomeras (Yehezkel et al., 2011; Marion et al., 2009a)
- Högt uttryck av oncogener
- Generellt liknande genuttryck i cellerna
- Liknande epigenetisk status (Ben-David och Benvenisty., 2011)
- Avsaknad av kontaktinhibition gör att de kan växa i lager och bilda ostrukturerade cellmassor (Ben-David och Benvenisty., 2011)
- Liknande uttryck av MikroRNA (miRNA), som är viktigt för genreglering och epigenetik. MiRNA är små bitar av enkelsträngat RNA som binder till m-RNA sekvenser och inaktiverar dessa. (Judson et al., 2009)

Genuttryck och epigenetiska egenskaper kopplade till iPS-cellernas tumörbildandeförmåga.

Ghosh et al. (2011) gjorde en stor jämförande transkriptionsanalys av iPS-celler tagna från människa. De tog somatiska celler deriverade från embryonala stamceller, primära somatiska celler samt celler från de olika cancertyper som man sett i samband med iPS-cells transplantationer. För att undersöka om det fanns variationer mellan olika typer av vävnader i kroppen tittade de på celler med ursprung i olika vävnader; endotel, hepatocyter och neurallistceller. Studien visade att inte bara pluripotenta iPS-celler utan även differentierade iPS-celler uttrycker högre nivåer av cancerrelaterade gener. iPS-cellerna visade sig också vara mer lika cancercellerna än vad embryonala stamcellerna var. Genom att jämföra vilka cancergener som uttrycktes i olika celltyper kunde de sedan hitta 20 potentiella cancergener som uttrycktes i samtliga celltyper. Förutom uppreglering av onkogener såg de också att flera tumörsuppressorgener var nedreglerade i jämförelse med primära somatiska celler.

En annan studie har visat förändringar av metylering i cancerrelaterade genpromotorer. Dessa kan uppkomma redan tidigt under omprogrammeringen (Ohm et al., 2010) eller vara egenskaper som finns kvar i cellens "epigenetiska minne" och alltså är kvarblivna egenskaper från den somatiska ursprungscellen. Epigenetiskt minne visar sig genom individuellt genuttryck och olika differentieringsegenskaper hos iPS-celler från olika ursprung. Man har påvisat ett sådant minne både hos iPS-celler genererade från mänskliga somatiska celler (Hu et al., 2010; Ghosh et al., 2010; Urbach et al., 2010) och hos iPS-celler genererade från möss (Polo et al., 2010; Kim et al., 2010). Vid jämförelse av iPS-celler och deras somatiska ursprung, rörande metyleringsgrad av ett hundratal specifika genomsekvenser, har man kunnat se att förändringar av metyleringsgraden sker på bara några av dessa och att många locus är helt oförändrade (Ron-Bigger et al., 2010). iPS-celler från möss som odlas länge i kultur eller genomgår flera cykler av återprogrammering tappar gradvis sitt epigenetiska minne (Polo et al., 2010; Kim et al., 2010). Specifika metylgruppsmönster, så kallad genetisk prägling, skiljer iPS-celler från embryonala stamceller. Tidigare har man visat att avvikande genetisk prägling kan associeras med flera olika cancerformer (Jirtle 1999; Lim och Maher 2010) och vid studier gjorda på iPS-celler har man kunnat visa att inhibering och aktivering av olika gener under omprogrammeringen kan ha effekt både på differentieringen av iPS-celler och deras tumörbildandeförmåga. Det finns en variabilitet i hur genetiskt präglade gener uttrycks i olika iPS-cellsinjer (Pick et al., 2009; Stadtfeld et al., 2010).

MikroRNA

MikroRNA är små ickekodande RNA-molekyler (Chen & Rajewsky., (2007).) som kan inaktivera mRNA-molekyler genom att binda till dessa. På så vis är de väldigt potenta vid genreglering. Uttryck av miRNA kopplade till p53 gör iPS-celler mer lika cancerceller (Neveu et al., 2010). MikroRNA är små RNA Vid en studie där man jämförde miRNA uttryck mellan humana iPS-celler och embryonala stamceller hittade man tio cancerrelaterade miRNA molekyler, som överuttrycktes i iPS-celler. Dessa fanns uttryckta i mer än tio gånger så hög grad hos iPS-cellerna jämfört med de embryonala stamcellerna (Malchenko et al., 2010).

Förlängning av telomerer och telomerasaktivitet

Telomerer är heterokromatiska strukturer placerade på kromosomernas ändar med funktionen att skydda kromosomerna från degradering och rekombination. (Blackburn, 2001). Telomerer förkortas ju äldre cellen blir (Harley et al., 1990) och telomerlängden är därför en viktig faktor att titta på när man ska avgöra en cells ålder. Man har visat att det sker en telomerförlängning hos iPS-celler, vilket har blivit en faktor att undersöka för att undersöka om iPS-cellernas kärnor verkligen har omprogrammerats till pluripotens och liknar embryonala stamceller. Man har visat att denna reaktion sker i huvudsak efter omprogrammeringen och kan pågå så länge som iPS-stadiet hålls, samt att celler från både yngre som äldre individer har förmåga att öka längden på sina telomerer till embryonala stamcellers motsvarighet vid omprogrammering (Gourronc och Klingelhutz., 2012)

Två kända metoder för cellers förlängning av telomerer är:

- Aktivering av telomeras (Greider and Blackburn, 1985)
- ”Alternative lengthening of telomeres” (ALT) – vilket är en typ av homolog rekombination mellan telomerasekvenser. (Dunham et al., 2000)

Båda dessa metoder regleras av telomerasets epigenetiska status (Blasco., 2007). Vid omprogrammering till iPS-celler har man inte kunnat se några tecken på ALT och därmed verkar denna mekanism inte vara avgörande för förlängning av iPS-cellernas telomerer. Man har dock kunnat se en tydlig ökning i telomerasaktivitet (Gourronc och Klingelhutz., 2012).

Oct3/4 och Nanog har visats binda till några av de gener som reglerar telomerasaktivitet och man tror därför att de två transkriptionsfaktorerna har en viktig funktion vid uppregleringen av telomeras under omprogrammeringen av iPS celler (Gourronc och Klingelhutz., 2012; Agarwal et al., 2010). Det är välkänt att c-Myc uppreglerar uttrycket av TERT, en av de gener som reglerar telomeras aktivitet, men man har kunnat generera iPS celler med långa telomerer även utan exogen expression av c-Myc. Det verkar som att telomerasaktivering i iPS-celler är reversibel precis som i den normala utvecklingen av embryonala stamceller, då det sker en nedreglering av telomeras när cellerna differentierar. (Gourronc och Klingelhutz., 2012)

I en studie undersökte man huruvida telomerasaktiviteten hade betydelse för omprogrammering av somatiska celler till iPS-celler. Detta gjordes genom att jämföra omprogrammeringsförsök mellan celler tagna från telomerasdefekta möss (Terc^{-/-}) med celler tagna från vanliga friska möss. Ingen skillnad i effektivitet visades vid försöken, vilket tyder på att man inte behöver någon telomerasaktivitet för generering av iPS celler så länge telomererna är tillräckligt långa eller så länge det finns en tillräckligt stor telomerasreserv i den somatiska cellen. Från cellerna tagna från de defekta mössen fick man dock inte några friska chimärer. Nedreglerad telomerasaktivitet är således inte en begränsande faktor för iPS-cellers proliferation, men cellerna har en försämrad förmåga att kunna utvecklas till friska möss. De visade också att telomeras är den viktigaste mekanismen bakom förlängningen av telomerer i iPS celler. (Marion et al., 2009a).

Genetiska förändringar, transgener och integration av virala vektorer

Användning av virala vektorer

Den ursprungliga metoden för generering av iPS-celler innebär att man använder sig av retrovirus eller lentivirus för att integrera transgener (Takahashi & Yamanaka., 2006; Yu et al., 2007). Virus använder så kallade long terminal repeats (LTRs) vid insertion av DNA i värdcellen vilket, även om det inte påverkar omprogrammeringen, ger förändringar i värdcellens genom i form av bland annat insertionsmutationer. Virala DNA-segment eller gener inkorporeras då på olämpliga ställen i den omprogrammerade cellens DNA. Man har visat att förhöjda LTR nivåer ger en aktivering av olika proto-onkogener. Kombinationen av att förändra DNA med virala faktorer och samtidigt öka LTR nivåerna och således uttrycket av onkogener, gör att risken för cancer ökar betydligt (Hacein-Bey-Abina, et al., 2003; Okita et al., 2007). Användningen av virala vektorer i kombination med ett ökat uttryck av transgenerna Oct3/4, Sox 2, Nanog och c-Myc som används vid induktion av pluripotens påverkar också differentieringsgraden (Yu et al., 2007) och gynnar tumörbildning (Okita et al., 2007).

Integration av transkriptionsfaktorer

Transkriptionsfaktorerna Oct3/4, Sox2, Klf4 och c-Myc, som integreras i cellernas vid induktion av pluripotens har påvisats vid flera cancerformer och har i vissa fall också blivit sammankopplade med tumörprogression (Schoenhals, M. et al., 2009). Återintroduktion, dvs ökat uttryck då det normalt inte borde finnas, av dessa transkriptionsfaktorer har visats öka benägenheten för instabilitet i genomet (Ramos-Mejia et al., 2010).

Octamer-binding transcription factor 3/4

Oct3/4 är transkriptionsfaktorer som tillhör POU familjen. Denna familj har så kallade homeodomäner som binder till DNA. Oct4 uttrycks i blastomerer, pluripotenta celler under tidigt embryonalt stadium och i könscells-linjens celler. Den reglerar flera gener och kan ha både en aktiverande och en nedreglerande verkan (Schöler et al., 1990a; Schöler et al., 1990b; Schöler et al., 1991; Rosner et al., 1990; Yeom et al., 1996;). Man vet ännu inte vilken mekanism som ligger bakom Oct4s inverkan på tumörceller, men man har visat att odifferentierade Oct4-positiva embryonala carcinomceller (EC-celler) är de celler som främst är ansvariga för teratombildning vid injektion av iPS-celler (Vazquez-Martin et al., 2012).

Krüppel-like factor 4

Klf4 är en transkriptionsfaktor som reglerar gener som styr proliferation, differentiering och cell-cykelarrest. (Rowland & Peeper., 2006) Den nedreglerar gener som stimulerar proliferation och uppregerar gener som har en nedreglerande verkan på proliferationen. Genom att stimulera transkription av p21 har den en inducerande verkan på cell-cykelarrest. (Chen et al., 2003). Klf4 har således normalt en tumörsupprimerande funktion. Om p21 saknas kan Klf4 istället få en onkogeneffekt. Klf4 hämmar uttrycket av p53 vilket gör att den gynnar celltransformation (Nandan och Yang 2009). Klf4 överuttrycks i flera olika

tumörtyper och kan vara en bidragande faktor till cancerformation hos celler i cellkultur (Ben-David och Benvenisty., 2011). Den har också blivit associerad med onkogener (Evans et al., 2008). Deletion eller metylering av genen som ger upphov till Klf4 kan förekomma vid vissa typer av cancer. (Ben-David och Benvenisty., 2011)

c-Myc

C-Myc är en transkriptionsfaktor som reglerar flera gener kopplade till bland annat cellproliferation och celltillväxt. Den är mycket potent när det gäller induktion av pluripotens (Nakagawa et al., 2008) och är också en mycket potent proto-onkogen. C-Myc stimulerar uttrycket av p53 och p21 och dessa har en hämmande effekt på reprogrameringen. P53 behövs dock för att man ska undvika instabilitet i genomet och tumörbildning (Marion., et al, 2009b). Vid överuttryck av c-Myc ökar uttrycket av p53 kraftigt, vilket gör att cellen går in apoptos (Azevedo & Feldman., 2010).

Mutationer och aneuploidi

Förändringar i genomet kan uppkomma hos iPS-celler innan omprogrammering, under omprogrammering och efter omprogrammering (Ben-David & Benvenisty., 2011).

Den mogna somatiska cellen

IPS-celler har sitt ursprung i somatiska mogna celler. Dessa celler har genomgått flertalet mitoser och har under en längre tid kunnat förvärva olika mutationer. Om dessa mutationer leder till anti-apoptotiska egenskaper eller uttryck av gener som gynnar proliferationen, kan dessa celler gynnas under framtagningsprocessen av iPS celler (Ben-David & Benvenisty., 2011).

Omprogrammering av den somatiska cellen till iPS-cell

Omprogrammeringsprocessen utgör också en stor risk. Celler som utsätts för omprogrammeringen stressas, vilket ökar risken för mutationer. Den metod som man idag använder för omprogrammering av celler leder till uppreglerat uttryck av onkogener (Ben-David & Benvenisty., 2011).

Efter omprogrammering/odling av celler i kultur

Hos embryonala stamceller har man funnit ett fenomen kallat culture adaption. Detta innebär att cellerna utvecklar kromosomförändringar vid odling i cellkultur under en längre tid. Vanligaste förändringen hos dessa celler är extra kopior av kromosomerna 12 (p) , 17(q), 20(q11.21) och X. Vilka alla har kopplats ihop med cancer i olika studier. Studier kring detta har även gjorts på humana iPS-celler och dessa har visat att den vanligaste kromosomförändringen i iPS-celler till följd av culture adaption är trisomi av kromosom 12. Man har visat att denna förändring ökar uttrycket av Nanog och growth /differentiation factor 3 (GDF3), men man har inte kunnat dra någon koppling mellan fynden och teratombildning vid injektion av iPS-celler i SCID möss (Mayshar et al., 2010). Ett gemensamt drag för embryonala stamceller och iPS-celler som genomgått culture adaptation är att de prolifererar

snabbt och att de verkar vara mindre beroende av tillväxtfaktorer. Mindre kromosomala tillägg (onkogener) och deletioner (suppressorgener) som uppkommer efter/under omprogrameringen utgör också en ökad risk för tumörbildning. (Ben-David och Benvenisty., 2011)

p53

Man har visat att p53 har en negativ effekt vid generation av iPS celler. Nedreglering av p53 samt induktion av p53s negativa dominant ger därför en kraftig ökning av genereringen av iPS-celler. P53 har en viktig funktion när det gäller reglering av apoptos och cellcykeln och är en viktig skyddsmekanism vid skador på DNA. Suppression av p53 ses ofta kopplat till cancer (Rowland, & Peeper, 2006). Man har sett att nedreglering av p53 och andra tumörsuppressorgener kopplade till p53 kan möjliggöra induktion av pluripotens med enbart de två transkriptionsfaktorerna Oct4 och Sox2 (Marion et al., 2009b; Utikal et al., 2009; Hong et al., 2009; Li et al., 2009; Kawamura et al., 2009).

Hur kan man förhindra bildning av teratom och teratocarcinom vid transplantation av iPS celler?

Differentiering

Den primära metoden för att minska tumörförekomsten innebär att man låter iPS-cellerna differentiera innan de injiceras. Detta ger minskad tumörbildande förmåga hos cellerna *in vivo*. Risken att cellerna bildar cancerceller innan denna differentiering sker kvarstår fortfarande. Differentieringen är också en komplex process och det är inte alltid säkert att alla celler i en cellkultur differentierar. Vid urvalet av vilka celler som man ska transplantera är det därför mycket viktigt att man undersöker differentieringsgrad noga. (Ghosh et al., 2011).

L-Myc och transformationsdefekt c-Myc

Enligt en studie av Okita et al (2007) beror den ökade förekomsten av tumörer som ses hos chimärer från iPS-celler från möss primärt på reaktivering av c-Myc retrovirus (Okita et al., 2007). Man har lyckats framställa iPS-celler utan c-Myc. Effektiviteten vid dessa induktionsprotokoll är dock mycket lägre än induktionsprotokoll där c-Myc ingår. L-myc, som är en annan medlem i Myc-familjen, har visat sig ha en bättre effekt vid generering av humana iPS-celler än c-Myc. Den har dock inte en lika bra effekt på iPS-celler från möss. L-Myc påverkar också cellens transformation mindre än vad c-Myc gör. Även mutationer av c-Myc som minskar transformationsaktiviteten (transformationsdefekt W136E c-Myc) har visat sig ha en bättre effekt på generering av humana iPS-celler. Transformationsprocessen och iPS-cells generation verkar således använda olika funktionella grupper på c-Myc-molekylen. L-Myc och W136 c-Myc hämmar troligtvis uttrycket av gener som styr cellens differentiering. Många gener som uttrycks i iPS-celler genererade med ”vanlig” c-Myc, embryonala celler och cancerceller uttrycks inte vid induktion med L-Myc och W136 c-Myc. Man kan misstänka att dessa gener som inte uttrycks vid induktion med L-Myc och W136 c-Myc kan ha effekt på transformationen (Nakagawa et al., 2010). Chimärer som inducerats utan c-Myc har inte visat någon ökad tumörbildande förmåga. (Nakagawa et al., 2008) Detta

betyder att ökad effektivitet vid generering av iPS-celler inte nödvändigtvis också måste betyda en ökad förekomst av tumörer (Nakagawa et al., 2010).

Framtagning av iPS-celler utan retrovirus och lentivirus

Användningen av virala vektorer från retrovirus och lentivirus vid induktion av iPS celler innebär en ökad risk för cancer (se tidigare stycke ”Användning av virala vektorer”). För att slippa problemen associerade med viral integrering försöker forskarna nu hitta alternativa metoder för induktion av pluripotens i celler.

Icke-integrerande adenovirus

Adenovirus behöver inte integrera sitt eget DNA i värdcellen vid överföring av transgener. Effektiviteten av omprogrammeringen vid försöken var relativt låg och det är därför osäkert om man kommer att kunna använda denna metod kliniskt. (Stadtfield et al., 2008)

Plasmider och episomer

År 2008 påvisades möjligheten att inducera pluripotens med hjälp av plasmider. Transkriptionsfaktorerna Oct3/4, Sox 2 och Klf4 kopplades ihop på en plasmid och c-Myc på en annan. Dessa fördes sedan in i embryonala fibroblaster från mus. För att transkriptionsfaktorerna skulle hållas på en tillräcklig nivå för omprogrammering av cellen, utfördes plasmidtransfektionen ett flertal gånger. I många av de omprogrammerade cellerna kunde man se att generna hade integrerats i värdcellens genom, men i ca en tredjedel av de celler som hade omprogrammerats sågs ingen integration. Fördelen med denna metod jämfört med användandet av retrovirala vektorer är avsaknaden av LTRs. Metoden fungerade men visade sig vara mycket ineffektiv, ca 1000 gånger mindre effektiv än användningen av virala vektorer. Försöket utfördes bara på fibroblaster tagna från möss. Troligtvis skulle effekten varit ännu sämre vid omprogrammering av mänskliga fibroblaster, då man generellt har sett en lägre effektivitet när det gäller omprogrammering av humana celler. Troligtvis spelar den stökiometriska balansen, det vill säga mängdförhållandet, mellan transgenerna stor roll vid framställning av iPS-celler med hjälp av plasmider. (Okita et al., 2008; Okita & Yamanaka., 2011)

Epstein-Barr nuclear antigen -1 (EBNA1) är ett exempel på en episomalvektor som man har använt vid lyckade försök att omprogrammera humana neonatala fibroblaster. För att tekniken ska fungera krävs dock bland annat SV40 som är en potent onkogen. Man har inte heller lyckats att omprogrammera celler från vuxna givare med denna metod, vilket utgör ett hinder för klinisk användning (Yu et al., 2009). Ytterligare ett hinder är att EBNA1 ökar immunsvarets igenkänning av transfekterade celler (Munz et al., 2000). Ghosh et al (2011) visade att iPS-celler som omprogrammerats med episomala vektorer, istället för programmering med lentivirus, uttrycker lägre nivåer av de 20 gemensamma cancerrelaterade generna (se tidigare avsnitt ”genuttryck och epigenetiska egenskaper kopplade till iPS-cellernas tumöribildandeförmåga”). Signifikant uttryck av dessa gener kvarstod dock även i dessa celler.

Minicirclevektorer är små DNA vektorer som inte innehåller bakteriellt DNA. De har en högre transfektionseffektivitet än plasmider och ger ett långvarigt ektopiskt uttryck, dvs uttryck i celler som normalt inte ska uttrycka proteinet, eftersom de inte aktiverar exogena hämmande mekanismer lika starkt som bakterieplasmider gör. Vid induktion av pluripotens med minicirclevektorer slipper man använda sig av SV40 och metoden kan användas även på celler tagna från äldre givare. Denna metod har dock en mycket låg effektivitet i jämförelse med omprogrammering med hjälp av virala vektorer (Jia et al., 2010).

Induktion av pluripotens med proteiner

År 2009 gjordes en studie på möjligheten att framställa iPS-celler utan virala eller genetiska vektorer. Man inducerade istället pluripotens genom att stimulera celler med proteinerna Oct 4, Sox2, Klf4 och c-Myc. Cellerna genomgick 16 timmar av proteinbehandling för att sedan inkuberas i 6 dygn. Denna process behövde upprepas i 6 cykler för att cellerna skulle uttrycka de markörer (Oct4, Nanog, Alkalinfosfat m.fl) som tyder på att cellerna är fullt omprogrammerade. Metoden var betydligt mindre effektiv (0.001%) (Kim et al., 2009) än induktion av pluripotens med virala vektorer 0.2-0.8% (Huangfu et al., 2008).

MikroRNA

Judson et al visade 2009 att miRNA kunde användas för att öka effektiviteten vid programmering av iPS-celler med Oct4, Sox2, Klf4 och c-Myc. Man har inte kunnat visa exakt hur dessa gynnade processen, men tror att det har att göra med deras förmåga att reglera cellcykeln (Judson et al., 2009). Dessa miRNA molekyler uttrycks normalt i embryonala stamceller och man tror att de har betydelse för de embryonala stamcellernas fenotyp (Babiarz et al., 2008; Wang et al., 2007; Wang and Blelloch, 2009) samt homeostas och uppehållande av pluripotens. Man har kunnat se att nivåer av miR302/367 stämmer överens med transkription av Oct4 under tidig embryonal utveckling (Card et al., 2008).

År 2011 visades att miRNA-klustret, miR302/367, kan användas för att programmera celler till iPS-stadium utan användning av de transgena transkriptionsfaktorerna. Effektiviteten när det gäller att bilda iPS-kolonier för miR302/367 är uppåt 10% vilket är mycket högre än effektiviteten som iakttagits vid användning av Yamanakas ursprungliga faktorer (0.2%–0.8%). Metoden verkar fungera lika bra på celler tagna från möss som celler tagna från människor och iPS-cellerna som genereras har samma egenskaper som iPS-celler genererade med tidigare metoder visat; pluripotens, uttryck av specifika markörgener (alkalinfosfatas, Oct4, Sox2, Nanog m.fl.) och teratombildning med derivat från samtliga tre groddblad vid injektion av iPS-celler i SCID-möss. MiR302/367 iPS-celler kan ge upphov till vuxna chimärer. MiR302/367 styr normalt hundratals olika mRNA molekyler som i sig bland annat styr remodelering av kromatin och cellproliferation (Betel et al., 2008; Grimson et al., 2007; Krek et al., 2005). Detta i kombination med att mRNA molekyler inte behöver genomgå translation kan vara en av anledningarna till att miR302/367 snabbt kan orsaka så stora förändringar på cellens fenotyp och pluripotens (Anokye-Danso et al., 2011).

Uttryck av miR367 har visats aktivera Oct4 genen. För att kunna inducera pluripotens med hjälp av miRNA har man sett att genen Hdac2 måste inhiberas. Valproinsyra bryter ner Hdac2 proteinet (Kramer et al., 2003) och ökar effektiviteten vid framtagning av iPS-celler från musfibroblaster. Utan Valproinsyra är framtagningen med miR302/367 inte särskilt effektiv. Vid framställning av iPS-celler från humana förhuds- och hudfibroblaster med miRNA-metoden har valproinsyra ingen ökad effekt då Hdac-proteiner uttrycks i mycket lägre grad i humana celler. Låga nivåer av Hdac kan alltså gynna eller till och med vara nödvändiga för att induktion av pluripotens ska kunna ske med miR302/367 (Anokye-Danso et al.,2011).

Mekanismen bakom den effektiva omprogrammeringen med miR302/367 är fortfarande okänd. En mycket hög korrelation mellan iPS-cellerna och embryonala stamceller vad det gäller genuttryck sågs och ett identiskt uttryck av pluripotensgener vid försöken. Största fördelen med denna metod är att den inte ger någon integration av de transgena faktorerna Oct4, Sox2, Klf4 och c-Myc, däremot ger den integration av miR302/367-lentivirusvektorn i genomet. Man har dock visat att denna integrering tystas efter ett antal cellpassager (Anokye-Danso et al.,2011).

Avlägsnande av transgener efter omprogrammering

Två metoder finns för avlägsnande av transgener efter omprogrammering av iPS celler:

- Cre-rekombinas (Cre/LoxP) – Startar ett mycket effektivt rekombinationssystem vilket kan rekombinera specifika DNA sekvenser. Vektorn lämnar dock residualvektorer bakom sig som eventuellt kan leda till mutationer av DNA (Kaji et al., 2009).
- PiggyBac transposoner (Yu et al., 2009)

Fördelen med att plocka bort transgena transkriptionsfaktorerna är att man undviker återaktivering av dessa. Det är mycket viktigt vid klinisk användning eftersom överuttryck av flera av dessa är associerat till cancer. Det har också betydelse vid användning av iPS-celler för läkemedelstester (Kaji et al., 2009).

Metformin

Metformin är ett antidiabetiskt läkemedel som används framgångsrikt för behandling av diabetes typ 2. Verkningsmekanismen för metformin innebär en sekundär agonistverkan på AMP-activated protein kinase (AMPK), ett enzym i kroppen som styr cellulär energihomeostas (Vazquez-Martin et al., 2012; Corominas-Faja et al., 2012). Forskarna tror nu att metformin även är mycket viktig för att reglera de gener som kopplas samman med cancerstamceller och teratombildning av iPS-celler (Hirsch et al., 2009; Vazquez-Martin et al., 2011; Song et al., 2012; Bao et al., 2012). Vid försök har man kunnat iaktta både en minskning av teratomens storlek, förekomst och vikt när man behandlat med Metformin efter injektion av iPS-celler i möss. I en studie där denna behandling pågick i 64 dagar efter injektion, bildades bara teratom hos en av fem möss (Vazquez-Martin et al., 2012).

Odifferentierade oct4 positiva embryonala carcinomceller (EC-celler) har visat sig vara ytterst ansvariga för teratombildning. Metformin verkar nedreglera de Oct4 drivna maligna

stamcellerna ansvariga för bildandet av teratocarcinom samtidigt som Oct4 kompetensen att generera terminalt differentierad vävnad bibehålls. Detta har man kunnat se då teratomen som bildats vid försök, trots att de minskat i omfattning, har bestått av vävnader från samtliga tre groddblad. Mer forskning krävs för att klargöra metforminets verkan, men de försök som har gjorts idag visar på att tumörbildande förmåga och stamcellsegenskaper så som pluripotens, är nära relaterade, men kan skiljas åt genom enzymer till exempel AMPK (Vazquez-Martin, A et al., 2012).

Apoptosgener

Ett sätt att hämma teratombildning *in vivo* är genom användning av så kallade apoptosgener. Vid reglering av en för genen specifik prodrog kan man inducera apoptos i cellen. De apoptosgen-/prodrogkombinationer som man har gjort försök med beträffande iPS-celler är yeast cytosine deaminase (YCD) med prodrogen 5-fluorocytosine (5-FC) och inducible Caspase 9 (iCaspase9) med prodrogen AP20187, som är en lipid-permeabel, icketoxisk, dimeriserande drog. Båda dessa kombinationer visade sig kunna skydda mot potentiella pluripotenta iPS-celler som inte differentierat och transformerade onkogena iPS-celler både före och efter transplantation. Man kunde vid studien inte se några tecken på att självmordsgenerna hade någon effekt på iPS-cellernas pluripotens-, proliferations- eller differentieringsgrad. Båda kombinationerna var effektiva, men YCD/5-FC kombinationen visade sig vara mer effektiv då den kontrollerade såväl teratominiterande celler som redan tumöromvandlade iPS-celler *in vivo*. Hos de möss som fått YCD genen genom en lentivirus vektor och som behandlades med 5-FC försvann tumörerna från två av mössen och bara en mycket liten nekrotiserad tumör hittades i den tredje musen. Man kommer i framtiden att behöva förfina metoden för att minska potentiell toxisk effekt på celler i andra vävnader och rikta den inducerade apoptosmekanismen mot endast odifferentierade och tumöromvandlade iPS-celler. (Zhong et al., 2011)

Ökad dos av tumörsuppressorer

Man har också undersökt huruvida en ökad dos av tumörsuppressorgenerna p53 samt Ink4a/ARF också har effekt på iPS-cellernas tumörbildande förmåga. iPS-celler tagna från möss med en extra upplaga av en av dessa gener har inte visat några tecken på avvikande egenskaper jämfört med iPS-celler tagna från andra möss vid ostressade tillstånd. Korrelationen för genuttryck mellan dessa iPS-celler och embryonala stamceller har visat sig vara 0.99 och det tyder på att en extra kopia av en tumörsuppressorgen inte har någon större inverkan på iPS-cellernas genuttryck. En extra kopia av dessa gener har inte heller någon effekt på iPS-cellernas pluripotens. Vid tillväxttester, där man undersöker hur celler klarar sig i miljöer med låg näringshalt och låg syrehalt, har man sett en minskad tillväxt hos dessa celler. Då cancerceller ofta visar en ökad tillväxt tyder detta på en minskad tumörbildande förmåga. Man testade också teratomförekomsten genom att injicera dessa iPS-celler i möss. Antalet teratom minskade och de teratom som bildades var mindre i storlek och vikt än de som sågs vid injektion av vanliga iPS-celler. Hos vissa av mössen sågs ingen tumörbildning alls under testperioden. När man tittade på differentierade celler tagna från teratom i mössen visade man att p53 samt Ink4a/ARF iPS-celler hade en minskad proliferationshastighet. Detta

gällde dock inte när cellerna var odifferentierade. Då man inte kunde se några tecken på apoptos i tumörerna är proliferationsminskningen den troligaste orsaken till minskningen av teratomen. Celler med en extra kopia av p53 eller Ink4a/ARF visade också en ökad respons på kemoterapibehandling och en minskad risk för utveckling av teratocarcinom (Menendez et al., 2011).

DISKUSSION

iPS-celler har varit ett stort genombrott för den medicinska forskningen och kan komma att bli nyckeln till att hitta ny behandling mot Parkinson och en rad andra degenerativa sjukdomar. Dessa celler kommer med största sannolikhet att ersätta användningen av stamceller tagna från embryon i framtiden, men ett stort hinder för klinisk användning av iPS-celler kvarstår. Nackdelen är deras förmåga att bilda teratom *in vivo*. Man har vid försök sett att iPS-celler är lika cancerceller på flera olika sätt (Ben-David och Benvenisty., 2011). Mekanismen bakom teratombildningen är idag ej känd och därför svår att förhindra. Man har dock hittat en rad olika faktorer som kan minska dessa cellers tumörbildandeförmåga.

Genom att låta iPS-celler differentiera innan man injicerar dem i möss har man kunnat visa en minskad tumörbildning (Ghosh, Z et al.,2011). Andra metoder har syftat till att ersätta användningen av virala vektorer, då dessa har visats öka nivån av LTRs och på så vid även uttrycket av onkogener. Användandet av plasmider och episomala vektorer har varit en metod att göra detta på. Dessa har visat sig ge en integration av transgener i musmodeller, men har också visat sig vara mycket ineffektiva i jämförelse med metoder där man använt lentivirus och retrovirus. Forskarna tror att den låga effektiviteten kommer att vara ännu lägre vid induktion av pluripotens i humana celler (Okita et al., 2008; Okita & Yamanaka 2011). Vid användning av den episomala vektorn EBNA1 har man kunnat inducera pluripotens i humana neonatala fibroblaster, men för att denna metod ska fungera krävs onkogenen SV40 och möjligheterna för klinisk användning av denna metod är därför begränsade (Yu et al., 2009). Genom att använda icke-bakteriellt DNA i form av minicirclevektorer kan man få en effektivare induktion av pluripotens än vad man får med plasmider och episomala vektorer. Minicirclevektorerna ger ett mer långvarigt uttryck av transgenerna i iPS-cellerna och man slipper använda SV40. Effektiviteten för denna metod är dock fortfarande mycket lägre än effektiviteten vid användning av lenti- eller retrovirus (Jia et al., 2010).

Istället för att fokusera på att hitta metoder utan virala vektorer har man, genom användning av Cre/LoxP (Kaji et al.,2009) och PiggyBac transposoner (Yu et al.,2009), satsat på att ta bort de integrerade transgenerna efter det att omprogrammeringen skett så att återaktivering av dessa förhindras (Kaji et al.,2009). Man har också inducerat pluripotens genom att stimulera celler med transgeners proteiner utan integration av generna. Även för denna metod är effektiviteten än så länge väldigt låg (Huangfu et al.,2008). Användning av mikroRNA är den metod som hittills har visat störst effektivitet vid induktion av pluripotens. Det är också den enda metoden som har givit en högre effektivitet än induktion med lentivirus/retrovirus. Denna metod ger ingen integration av transgener, men ger integration av miR302/367-lentivirusvektorn, vilket kan ha effekter på de omprogrammerade cellernas genom.

Metformin är ett läkemedel som används mot diabetes och som nu också har visat sig ha effekt mot tumörbildning vid injektion av iPS-celler (Vazquez-Martin et al., 2012). Användning av apoptosgener som inducerar apoptos är en annan metod som undersökts. Tanken är att dessa gener ska kunna aktiveras i iPS-celler som inte differentierat eller i transformerade onkogena iPS-celler. Vid studien gav dessa apoptosgener en kraftigt minskning av och hos några möss total avsaknad av teratom (Zhong et al gjorde 2011). I framtiden måste man undersöka vilka toxiska effekter användandet av dessa gener har på kroppens normala vävnader. Man har också kunnat se en effektiv minskning av teratom, både i förekomst och storlek, genom att öka dosen av suppressorgenerna Ink4a/ARF och p53 hos möss. Celler med en extra upplaga av dessa gener svarar även bättre på kemoterapibehandling (Menendez et al., 2011).

Metoderna som tagits upp i den här uppsatsen är bara ett urval av de metoder som presenterats under de senaste åren. Det faktum att det finns så många olika sätt att minska teratombildningen tyder på att det är en komplex process som ger upphov till teratom vid injektion av iPS-celler *in vivo*. I framtiden bör fokus för forskningen ligga på att hitta en metod eller en kombination av metoder som gör att iPS-celler kan användas inom regenerativmedicin utan att utgöra en cancerrisk för patienten. Ett led i detta är att studera och lära oss mer om vad som är den gemensamma faktorn hos de iPS-celler som teratomomvandlas. Är differentieringsgraden hos cellerna den största faktorn till teratombildningen eller finns det andra gemensamma faktorer hos de iPS-celler som ger upphov till teratom? Om så är fallet kan man kanske hitta metoder för att sälla bort celler med dessa faktorer, så att de inte används kliniskt.

En fråga som forskarna inom området vill ha svar på är huruvida det är möjligt att skilja pluripotens och teratombildande förmågan åt? Enligt Vazquez-Martin och hans medarbetare (2012) tyder resultaten som de presenterar i sin artikel på att detta är möjligt genom enzymer, så som AMPK. Jag tycker att de har dragit lite för stora slutsatser baserat på de resultat som de har presenterat. Vid deras studie bedömde de att cellerna var pluripotenta då de tumörer som bildades uppvisade vävnadsrepresentanter från samtliga av de tre groddbladen (teratom). Detta är den metod som generellt används av forskare för att bedöma om cellerna har kvar/har uppnått pluripotens. Eftersom Vazquez-Martin et al (2012) använder teratomomvandlade celler som ett mått på pluripotens anser jag inte att deras resultat stödjer teorin om att AMPK och andra enzymer kan skilja dessa egenskaper åt. De har visserligen även kontrollerat att de celler som injicerats har uttryckt de specifika proteiner som är kopplade till pluripotens, men detta görs ju innan Metforminet har sin verkan. Dessutom är uttrycket av proteinerna inte en garanti för att cellerna har uppnått total pluripotens, utan mer en indikation på att de kan vara det. I artikeln anger de själva också att en sänkning av proliferationshastigheten vid behandling av Metformin är den troligaste orsaken till minskningen i teratomformationen. Det skulle alltså kunna vara så att antalet iPS-celler som teratomomvandlas vid behandling med Metformin motsvarar antalet celler som teratomomvandlas i kontrollerna, fast att teratomen blir mindre vid behandling med Metformin till följd av att cellerna förökar sig långsammare.

En annan fråga som jag har funderat över är hur många av de celler som injiceras som bildar teratom? Om några celler inte bildar teratom vad händer då med dessa celler? Differentierar de? Hur stor är skillnaden mellan teratom och det vi faktiskt vill uppnå (differentierad vävnad)? Kanske måste vi bara bli bättre på att få iPS-celler att differentiera till den vävnad vi önskar för att lösa problemet med teratombildningen. Många av dessa frågor kan vara svåra att besvara idag och vi måste utveckla nya tekniker för att kunna studera detta. Mer forskning behövs också för att se vilka följder det epigenetiska minnet och mutationer förvärvade under somatiska cellstadier får för iPS-celler.

Förutom teratomformationen är även den extremt låga effektiviteten för många av metoderna som används för generering av iPS-celler ett problem. Varför sker omprogrammeringen enbart i en liten andel av cellerna? Beror det på att integrationen av generna är slumpmässig och alltså bara lyckas i några få celler eller finns det även en predisponeradefaktor för omprogrammeringen?

Jag tror att vi inom en snar framtid kommer att ha svar på flera av dessa frågor. I alla fall om forskningen fortsätter i samma takt som den har gjort sedan 2006, då Yamanaka och hans medarbetare först presenterade deras artikel om inducerad pluripotens. Förhoppningsvis blir dessa svar till nya behandlingsformer för patienter med degenerativa sjukdomar samt nya metoder för farmakologiska- och toxikologiska tester.

SLUTSATS

Idag har man hittat flera olika metoder som minskar förekomsten och storleken på teratom vid transplantation av iPS-celler *in vivo*. Ingen av dessa metoder ger en fullständig inhibition av teratomformationen och mer forskning behövs för att säkerställa en säker klinisk användning av iPS-celler.

REFERENSER

- Agarwal, S., Loh, Y-H., McLoughlin, E.M., Huang, J., Park, I-H., Miller, J.D., Huo, H., Okuka, M., dos Reis, R. M., Loewer, S., Ng, H-H., Keefe, D. L., Goldman, F. D., Klingelutz, A. J., Liu, L., & Daley, G. Q. (2010) Telomere elongation in induced pluripotent stem cells from Dyskeratosis congenital: a genetic disorder of many faces. *11*; 464(7286): 292–296.
- Anokye-Danso, F., Trivedi, C. M., Jühr, D., Gupta, M., Cui, Z., Tian, Y., Zhang, Y., Yang, W., Gruber, P.J., Epstein, J. A., & Edward E. Morrisey (2011) Highly Efficient miRNA-Mediated Reprogramming of Mouse and Human Somatic Cells to Pluripotency.
- Azevedo, J. L. & Feldman R.A. (2010) Tinkering with Transcription Factors Uncovers Plasticity of Somatic Cells. *Genes Cancer*. November; 1(11): 1089–1099
- Babiarz, J.E., Ruby, J.G., Wang, Y., Bartel, D.P., and Blelloch, R. (2008). Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs. *Genes Dev.* 22,2773–2785.
- Bao, B. et al. (2012) Metformin inhibits cell proliferation, migration and invasion by attenuating CSC function mediated by deregulating miRNAs in pancreatic cancer cells. *Cancer Prev Res (Phila)* 5, 355–364.
- Ben-David, U., Benvenisty, N. (2011). The tumorigenicity of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Nat Rev Cancer* 11, 268–277.
- Betel, D., Wilson, M., Gabow, A., Marks, D.S., and Sander, C. (2008). The microRNA.org resource: targets and expression. *Nucleic Acids Res.* 36 D149–D153.
- Blackburn, E.H. (2001). Switching and signaling at the telomere. *Cell* 106, 661–673.
- Blasco, M.A. (2007). The epigenetic regulation of mammalian telomeres. *Nat.Rev. Genet.* 8, 299–309
- Card, D.A., Hebbbar, P.B., Li, L., Trotter, K.W., Komatsu, Y., Mishina, Y., Archer, T.K. (2008). Oct4/Sox2-regulated miR-302 targets cyclin D1 in human embryonic stem cells. *Mol. Cell. Biol.* 28, 6426–6438.
- Chen, K. & Rajewsky, N. (2007). The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs. *Nature Reviews Genetics* 8 (2): 93–103.
- Chen, X., Whitney, E. M., Gao, S. Y. & Yang, V. W. (2003). Transcriptional profiling of Kruppel-like factor 4 reveals a function in cell cycle regulation and epithelial differentiation. *J.Mol. Biol.* 326, 665–677
- Corominas-Faja, B., Quirantes-Piné, R., Oliveras-Ferraros, C., Vazquez-Martin, A., Cufí, S., Martín-Castillo, B., Micol, V., Joven, J., Segura-Carretero, A. & Menendez, J. A. (2012) Metabolomic fingerprint reveals that metformin impairs one-carbon metabolism. *Aging (Albany NY)* 4(7): 480–498.
- Dunham, M.A., Neumann, A.A., Fasching, C.L., and Reddel, R.R. (2000). Telomere maintenance by recombination in human cells. *Nat. Genet.* 26, 447–450.
- Evans, P. M. & Liu, C. (2008) Roles of Krupel-like factor 4 in normal homeostasis, cancer and stem cells. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 40, 554–564
- Ghosh, Z. et al. Persistent donor cell gene expression among human induced pluripotent stem cells contributes to differences with human embryonic stem cells. *PLoS ONE* 5, e8975 (2010).

- Ghosh, Z., Huang, M., Hu, S., Wilson, K.D., Dey, D., Wu, C.J., (2011) Dissecting the oncogenic and Tumorigenic Potential of Differentiated human Induced Pluripotent Stem Cells and Human Embryonic Stem Cells. *Cancer Research* Vol 71, Issue 4, s.5030-5039
- Gourronc, F.A., Klingelhutz, A.J. (2012) Therapeutic opportunities: Telomere maintenance in inducible pluripotent stem cells. *Mutation Research* 730 (2012) 98– 105
- Greider, C.W., and Blackburn, E.H. (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* 43, 405–413.
- Grimson, A., Farh, K.K., Johnston, W.K., Garrett-Engele, P., Lim, L.P., and Bartel, D.P. (2007). MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol. Cell* 27, 91–105.
- Gurdon, J.B. (1962). The Developmental Capacity of Nuclei taken from Intestinal Epithelium Cells of Feeding Tadpoles. *J Embryol Exp Morphol* 10, 622-640
- Hacein-Bey-Abina, S. et al. (2003) LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302, 415–419.
- Harley, C.B., Futcher, A.B., and Greider, C.W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345, 458–460.
- Hirsch, H. A., Iliopoulos, D., Tschlis, P. N. & Struhl, K. (2009) Metformin selectively targets cancer stem cells, and acts together with chemotherapy to block tumor growth and prolong remission. *Cancer Res* 69, 7507–7511.
- Hong, H. *et al.* Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway. *Nature* 460, 1132–1135 (2009).
- Hu, Q., Friedrich, A. M., Johnson, L. V. & Clegg, D. O. (2010) Memory in induced pluripotent stem cells: reprogrammed human retinal pigmented epithelial cells show tendency for spontaneous redifferentiation. *Stem Cells* 28, 1981–1991.
- Huangfu, D., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Snitow, M., Chen, A.E., Melton, D.A. (2008). Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat. Biotechnol.* 26, 795–797.
- Jia, F., Wilson, K.D., Sun, N., Gupta, D.M., Huang, M., Li, Z., Robbins, R.C., Kay, M.A., Longaker, M.T., Wu, J.C. (2010) A Nonviral Minicircle Vector for Deriving Human iPS Cells. *Nat Methods*; 7(3): 197-199.
- Jirtle, R. L. (1999). Genomic imprinting and cancer. *Exp. Cell Res.* 248, 18–24.
- Judson, R. L., Babiarz, J. E., Venere, M. & Belloch, R. (2009) Embryonic stem cell-specific microRNAs promote induced pluripotency. *Nat. Biotechnol.* 27, 459–461.
- Kaji, K., Norrby, K., Paca, A., Mileikovsky, M., Mohseni, P., Woltjen, K. (2009) Virus free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature* Vol 458 s. 771-776
- Kawamura, T. *et al.* Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming. *Nature* 460, 1140–1144 (2009).
- Kim, D., Kim, C. H., Moon J.I., Chung, Y.G., Chang, M.Y., Han, B.S., Ko, S., Yang, E., Cha, K.Y., Lanza, R., Kim, K.S. (2009) Generation of Human Induced Pluripotent Stem Cells by Direct Delivery of Reprogramming Proteins
- Kim, K. et al. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature* 467, 285–290 (2010).

- Kramer, O.H., Zhu, P., Ostendorff, H.P., Golebiewski, M., Tiefenbach, J., Peters, M.A., Brill, B., Groner, B., Bach, I., Heinzl, T., et al. (2003). The histone deacetylase inhibitor valproic acid selectively induces proteasomal degradation of HDAC2. *EMBO J.* 22, 3411–3420.
- Krek, A., Grun, D., Poy, M.N., Wolf, R., Rosenberg, L., Epstein, E.J., MacMenamin, P., da Piedade, I., Gunsalus, K.C., Stoffel, M., et al. (2005) Combinatorial microRNA target predictions. *Nat. Genet.* 37, 495–500.
- Li, H. *et al.* The Ink4/Arf locus is a barrier for iPS cell reprogramming. *Nature* **460**, 1136–1139 (2009).
- Lim, D. H. & Maher, E. R. Genomic imprinting syndromes and cancer. *Adv. Genet.* 70, 145–175 (2010).
- Malchenko, S. et al. Cancer hallmarks in induced pluripotent cells: new insights. *J. Cell. Physiol.* 225, 390–393 (2010).
- Marion, R. M., Strati, K., Li, H., Tejera, A., Schoeftner, S., Ortega, S., Serrano, M., Blasco, M.A. (2009a) Telomeres Acquire Embryonic Stem Cell Characteristics in Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* 6;4(2):141-54
- Marion, R. M., Strati, K., Li, H., Murga, M., Blanco, R., Ortega, S., Fernandez-Capetillo, O., Serrano, M., Blasco, M. A. (2009b) A p53-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure iPS cell genomic integrity. *Nature* 460, 1149–1153.
- Mayshar, Y., Ben-David, U. Lavon, N., Biancotti, J-C., Yakir, B., Clark, A. T., Plath, K., Lowry, W.E. & Benvenisty, N. (2010). Identification and Classification of Chromosomal Aberrations in Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* 7, 521–531
- Menendez, S., Camus, S., Herreria, A., Paramonov, I., Morera, L.B., Collado, M., Pekarik, V., Maceda, I., Edel, M., Consiglio, A., Sanchez, A., Li, H., Serrano, M., Belmonte, J.C.I., (2011) Increased dosage of tumor suppressors limits the tumorigenicity of iPS cells without affecting their pluripotency.
- Munz, Christian; Bickham, Kara L.; Subklewe, Marion, et al. (2000) *The Journal of Experimental Medicine* 191(10):1649. [PubMed: 10811859]
- Nakagawa M, Takizawa N, Narita M, Ichisaka T, Yamanaka S. (2010) Promotion of direct reprogramming by transformation-deficient Myc. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:141527.
- Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Okita, Mochiduki, Y., Takizawa, N., and Yamanaka, S. (2008). Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat. Biotechnol.* 26, 101–106.
- Nandan M.O., Yang V.W. (2009) The role of Krüppel-like factors in the reprogramming of somatic cells to induced pluripotent stem cells. *Histol Histopathol* 24:1343–1355.
- Neveu, P. et al. (2010) MicroRNA profiling reveals two distinct p53-related human pluripotent stem cell states. *Cell Stem Cell* 7, 671–68.
- Nobel Foundation. The Official Website of the Nobel Prize. Tillgänglig: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2012/ [2013-03-02].
- Ohm, J. E., Mali, P., Van Neste, L., Berman, D. M., Liang, L., Pandiyan, K., Briggs, K., Zhang, W., Argani, P., Simons, B., Yu, W., Matsui, W., Van Criekinge, W., Rassool, F., Zambidis, E., Schuebel, K., Cope, L., Yen, J., Mohammad, H., Cheng, L & Baylin, S .B. (2010). Cancer-related epigenome changes associated with reprogramming to induced pluripotent stem cells. *Cancer Res.* 70, 7662–7673.
- Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S (2007) Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448:313–317.

- Okita, K. Yamanaka, S (2011) Induced pluripotent stem cells:opportunities and challenges. *Phil. Trans. R. Soc. B* 366, 2198–2207
- Okita, K., Nakagawa, M., Hyenjong, H., Ichisaka, T., & Yamanaka, S. (2008) Generation of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells Without Viral Vectors. *Science* vol 322 s. 949-953.
- Okita, K., Ichisaka, T. Yamanaka, S.(2007) Generation of germ-line competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448, 313–317.
- Pick, M. et al. (2009) Clone- and gene-specific aberrations of parental imprinting in human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 27, 2686–2690.
- Polo, J. M. et al. (2010). Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. *Nature Biotech.* 28, 848–855.
- Przyborski S. (2005)Differentiation of human embryonic stem cells after transplantation in immune-deficient mice. *Stem Cells* 23:1242–50.
- Ramos-Mejia, V., Munoz-Lopez, M., Garcia-Perez, J. L. & Menendez, P. (2010) iPSC lines that do not silence the expression of the ectopic reprogramming factors may display enhanced propensity to genomic instability. *Cell Res.* 20, 1092–1095.
- Ron-Bigger, S. et al. (2010). Aberrant epigenetic silencing of tumor suppressor genes is reversed by direct reprogramming. *Stem Cells* 28, 1349–1354.
- Rowland, B.D & Peeper, D.S. (2006) KLF4, p21 and context-dependent opposing forces in cancer. *Nat Rev Cancer.* 6 (1):11-23
- Schoenhals, M. et al. (2009) Embryonic stem cell markers expression in cancers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 383, 157–162.
- Song, C. W. et al. (2012) Metformin kills and radiosensitizes cancer cells and preferentially kills cancer stem cells. *Sci Rep* 3, 362.
- Stadtfield, M. et al. Aberrant silencing of imprinted genes on chromosome 12qF1 in mouse induced pluripotent stem cells. *Nature* 465, 175–181 (2010).
- Stadtfield, M., Nagaya, M., Utikal, J., Weir, G., Hochedlinger, K. (2008) Induced pluripotent stem cells generated without viral integration.
- Takahashi, K., Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic an Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, 126, 663-676.
- Urbach, A., Bar-Nur, O., Daley, G. Q. & Benvenisty, N. (2010). Differential modeling of fragile X syndrome by human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 6, 407–411.
- Utikal, J. *et al.* Immortalization eliminates a roadblock during cellular reprogramming into iPS cells. *Nature* **460**, 1145–1148 (2009).
- Wang, Y., Belloch, R. (2009). Cell cycle regulation by MicroRNAs in embryonic stem cells. *Cancer Res.* 69, 4093–4096.
- Wang, Y., Medvid, R., Melton, C., Jaenisch, R., and Belloch, R. (2007). DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell selfrenewal. *Nat. Genet.* 39, 380-385.
- Vazquez-Martin, A Cufi, S. Lopez-Bonet, E. Corominas-Faja, B. Oliveras-Ferraros, C. Martin-Castillo, B. Menendez, J.A. (2012) Metformin limits the tumourigenicity of iPS cells without affecting their pluripotency. *Scientificreports* 2 : 964/ DOI: 10.1038/srep00964

Vazquez-Martin, A., Oliveras-Ferreros, C., Del Barco, S., Martin-Castillo, B. Menendez, J. A. (2011) The anti-diabetic drug metformin suppresses self-renewal and proliferation of trastuzumab-resistant tumor-initiating breast cancer stem cells. *Breast Cancer Res Treat* 126, 355–364.

Yehezkel, S. et al. (2011). Reprogramming of telomeric regions during the generation of human induced pluripotent stem cells and subsequent differentiation into fibroblastlike derivatives. *Epigenetics* 6, 63–75

Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, I.I., Thomson, J. A. (2007) Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. *Science* vol 318 s.1917-1920

Yu, Junying., Hu, Kejin., Smuga-Otto, Kim, et al. (2009) Human Induced Pluripotent Stem Cells Free of Vector and Transgene Sequences. *Science*. 8; 324(5928): 797–801

Zhong, B., Watts, K.L., Gori, J.L., Wohlfahrt, M.E., Enssle, J., Adair, J.E., Kiem, H.P. (2011) Safeguarding nonhuman primate iPS cells with suicide genes. *Molecular therapy* vol 19 no. 9, 1667-1675