

# Straumhvörf í rannsóknum á fjölhæfum stofnfrumum og notagildi þeirra í læknávisindum

Guðrún Valdimarsdóttir, Anne Richter

## ÁGRIP

Stofnfrumur úr fósturvísunum eru einangraðar úr fósturvísunum eins og nafnið bendir til. Þetta eru fjölhæfar frumur sem geta annaðhvort endurnýjast og haldist ósérhæfðar eða sérhæfst í hvaða frumugerð sem er í líkamanum. Árið 1998 tókst að einangra stofnfrumur úr fósturvísunum manna og breytti það sýn manna á nýja möguleika í vefjalækisfræði. Aðeins 8 árum síðar tókst vísindafólki að mynda svokallaðar iPS-frumur, fjölhæfar stofnfrumur sem útbúnar voru með því að endurförta líkamsfrumur. Þetta hefur gjör-

bylt hugmyndum um óafturkræfi frumubroska. Í kjölfarið hefur mikið verk verið unnið til þess að kryfja til mergjar sameindalíffræði fjölhæfra stofnfrumna. Unnt er að mynda iPS-frumur úr líkamsfrumum sjúklinga og hafa þær því sama genamengi. Þessar frumur eru því einstaklega nytsamar á ýmsum sviðum læknisfræðinnar og má meðal annars nýta þær til að skilja sjúkdómsframvindu, framkvæma lyfjaprófanir og vefjaígræðslur.

## Stofnfrumur úr fósturvísunum manna – hES-frumur

Höfundar eru sameindalíffræðingar, lífefna- og sameindalíffræðistofu læknaeildar Háskóla Íslands.

Stofnfrumur hafa tvenns konar eiginleika: við frumuskiptingu geta þær annaðhvort endurnýjað sig eða sérhæfst í aðra frumugerð. Stofnfrumur úr fósturvísunum (ES-frumur, *embryonic stem cells*) eru einangraðar úr fósturvísunum. Þær eru fengnar úr glasafrjóvgunum með upplýstu samþykki aðstandenda og þeim hefði annars átt að farga.<sup>1</sup> Þær teljast fjölhæfar (*pluripotent*) því þær geta sérhæfst í hvaða frumugerð líkamans sem er, ólíkt vefjasértækum stofnfrumum (*tissue specific stem cells*) sem geta aðeins sérhæfst í tiltekna frumugerð í vefnum sem þær finnast í, og eru því kallaðar marghæfar (*multipotent*).<sup>2</sup> Í gegnum tíðina hafa stofnfrumur úr fósturvísunum verið ranglega nefndar fósturstofnfrumur. Í fósturi eru engar fjölhæfar stofnfrumur heldur aðeins vefjasértækar stofnfrumur. Margir renna hýru auga til ES-frumna sem úrræðis til lækninga á ýmsum sjúkdómum, þar sem hægt verður að sérhæfa þær í ákveðnar frumugerðir sem sjúklingar þurfa á að halda, og væri þá hægt að koma þeim frumum fyrir í sjúklingnum. Sá böggull fylgir þó skammrifi að vefjaflokkaprótein eru tjáð í ES-frumunum og gæti það orsakað höfnun frumnanna við ígræðslu.<sup>3</sup>

## Fósturþroskun mannsins

Okfruma myndast við samruna eggs og sáðfrumu. Hún skiptir sér á fyrstu stigum fósturþroska og verður að hneppifóstri (*morula*) á 16. frumustigi. Kímblaðran (*blastocyst*) myndast svo á 4-5 degi og innheldur hún innri frumumassa (*inner cell mass*) umlukinn ytra lagi af næringarhýði (*trophectoderm*) sem síðar þroskast í utanfósturvefi, svo sem fylgjuna. Innri frumumassinn

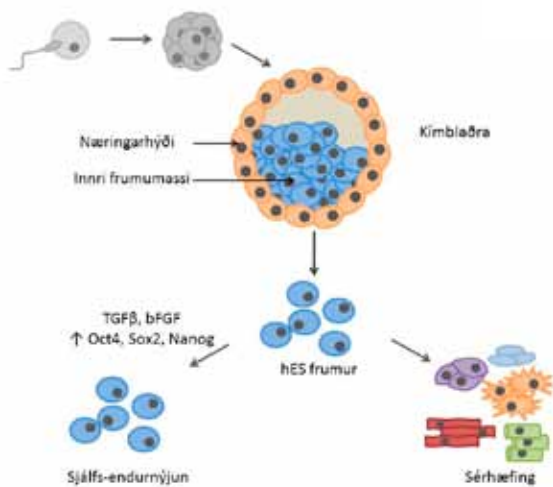
myndar kímþekju (*epiblast*) sem við myndun holfóstars (*gastrulation*) á 14. degi þroskast í fósturlögin þrjú, innlag, miðlag og útlag. Eitt af aðalsmerkjum holfóstarsmyndunar er myndun frumrákarinnar og sérhæfing hinna þriggja fósturlaga.<sup>1</sup> Fjölgun og frumuskrið kímþekjufruma fer fram í ferli sem kallast bandvefsumbreyting þekjuvefjar (*Epithelial-to-mesenchymal transition*, EMT) en þá minnkar viðlöðun milli frumna og tenginga þeirra við grunnhimnu og frumuskrið á sér stað. ES-frumur manna (hES-frumur) ganga einnig í gegnum EMT þegar þær sérhæfast í rækt. Við upphaf sérhæfingar eykst tjáning á EMT-stjórnpróteinum, svo sem SNAIL, SLUG og TWIST, en tjáning á viðlöðunarpróteininu E-CADHERIN þverr.<sup>4-6</sup>

Ef ytra lagið er varlega skilið frá innri frumumassa á kímblöðrustigi og frumur innri frumumassans sáð á ræktunarskálur við rétt skilyrði þá vaxa upp frumur í eyjum (kólóníum) sem nefnast stofnfrumur úr fósturvísunum (mynd 1). Langt er síðan því var spáð að hægt yrði að einangra hES-frumur. Þroskunarfræðingar höfðu rannsakað furðuæxli (*teratocarcinoma*) sem finnast í eista og legi og innihalda misleita vefjablöndu, svo sem hár, vöðva, bein og tennur. Þroskunarfræðingar fundu út að ef þeir fjarlægðu fósturvísa úr legi og sprautuðu þeim undir skinn á músum fóru að vaxa furðuæxli. Þeir uppgötvaðu líka að þessi æxli innihéldu ósérhæfðar stofnfrumur sem gátu sérhæfst í ólíkar frumugerðir háð umhverfinu og kölluðu þær EC-frumur (*embryonal carcinoma*). Það má því segja að stofnfrumurannsóknir hafa notið góðs af þeirri gríðarlegu þekkingu sem áunnist hafði með EC-frumunum. Árið 1981 tókst að einangra stofnfrumur úr fósturvísunum músa<sup>7,8</sup> en það var ekki

Fyrirspurnir: Guðrún Valdimarsdóttir [gudrunva@hi.is](mailto:gudrunva@hi.is)

Greinin barst 1. apríl 2015, samþykkt til birtingar 29. október 2015.

Höfundar hafa útfyllt eyðublað um hagsmunatengsl.



**Mynd 1.** Yfirlitsmynd af einangrun stofnfrumna úr fósturvísun manna. Kimblaðran myndast á 5. degi eftir frjóvgun eggis. Frumur næringarhyðis umlykja innri frumumassann sem verður að kímþekju og síðar einstaklingi ef kimblaðran nær að taka sér bólfestu í legi. Ef innri frumumassinn er einangraður og frumurnar ræktaðar við réttar aðstæður vaxa þær í eyjum, eru fjölhæfar og nefnast stofnfrumur úr fósturvísun (hES-frumur). Þá er annaðhvort hægt að halda þeim fjölhæfum eða sérhæfa þær í ákveðna frumugerð.

fyrir en 1995<sup>9</sup> sem tókst að einangra slíkar frumur úr primötum og þremur árum síðar úr mönnum.<sup>10</sup> Af augljósum ástæðum er ekki hægt að sannreyna svipgerð hES-frumna með því að búa til blendingsfóstur (*chimeras*) eins og mögulegt er í músunum. Kenniprótein (*markers*) sem þróuð voru til að rannsaka EC-frumur reyndust því vel til að athuga ósérhæfðu hES-frumurnar. Skilgreining á hES-frumum byggist á þrennu: hES-frumur eru ódauðlegar því þær hafa telomerasa-virkni, hES-frumur tjá sértæk stjórnprótein og sértæk kenniprótein á yfirborði sínu, og hES-frumur mynda afleiður allra kímлагanna *in vitro* og furðuæxli *in vivo*.

#### Aðferðir við stofnfrumurannsóknir

hES-frumur viðhalda fjölhæfi sínu þegar þær eru ræktaðar á geisludum eða mitomycin-C meðhöndluðum MEF-hjálparfrumum (*mouse embryonic fibroblasts*). MEF-frumurnar geta því ekki skipt sér en seyta þó lífsnauðsynlegum þáttum og eru fóttesta fyrir stofnfrumurnar sem vaxa upp í eyjum. Á seinustu árum hefur komið í ljós að vaxtarþættirnir sem MEF-frumurnar seyta og halda hES-frumunum ósérhæfðum eru einkum bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) og TGF-beta (Transforming Growth Factor beta).<sup>11,12</sup> Þeir stuðla að tjáningu á stjórnpróteininu NANOG<sup>13</sup> en heiti þessa próteins er myndað af orðunum *Tír na nÓg* sem þýðir land hinna ódauðlegu í keltneskum goðsögnum.<sup>14</sup> NANOG ýtir undir tjáningu á OCT4 og SOX2 próteinunum en þessir þrjú stjórnþættir eru aðalstjórnþættir hES-frumna og mynda eins konar hringrás hvað varðar stjórnun þeirra sín á milli (mynd 1).<sup>15,16</sup> hES-frumum er vanalega umsáð með trypsíni eða svokallaðri *cut-and-paste*-umsánningu og þær fluttar yfir á ferskt MEF-undirlag í ræktunarskálum. Sérhæfingu hES-frumna er einkum komið af stað með myndun frumuklasa (*aggregates*) sem í kjölfarið mynda frumukúlur (*embryoid bodies*) í fjarveru bFGF og TGF-beta. Þessar frumukúlur eru misleitt blanda af alls kyns frumugerðum. Þetta kallast tilviljanakennd

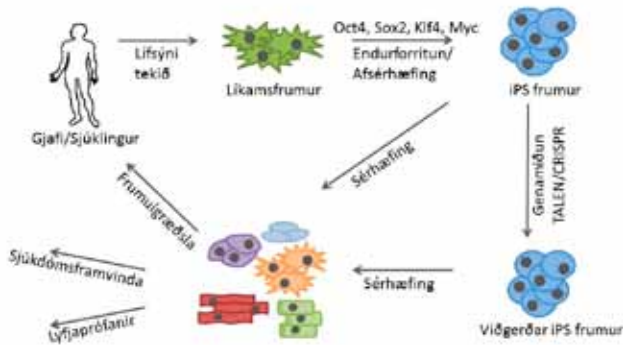
sérhæfing (*spontaneous differentiation*)<sup>17</sup> en þó má beina sérhæfingu hES-frumna í tiltekna áttir með vaxtarþáttum eða hindrum (*directed differentiation*). Sem dæmi má nefna að hES-frumur sem eru örvaðar með FGF8, Sonic Hedgehog (SHH) og WNT-boðleiðinni en boðflutningur um TGF-beta og BMP (*Bone Morphogenetic Protein*) um leið hindraður, sérhæfast í dópamínmyndandi taugafrumur. Þetta hefur verið gert og frumur sem til verða sprautað í heila ungra músa með Parkinsonsjúkdóminn með árangri sem lofar góðu.<sup>18-20</sup> Örvun með bFGF og BMP4 (undirflokkur TGFbeta-fjölskyldunnar) leiðir til sérhæfingar í miðlagsfrumum sem svo er hægt að sérhæfa frekar í hjarta- og æðafrumur eða blóðmyndandi stofnfrumur.<sup>5,21</sup> Ýmis dýralíkön eru notuð til að athuga öryggi, heimtur og starfhæfi þessara sérhæfðu frumna. Mýs, rottur og svín hafa til dæmis verið notuð til þess að græða hjartavöðvafrumur sem þannig voru búnar til í óstarfhæft hjarta eftir að hjartadrep var framkallað með því að binda fyrir kransæðarnar.<sup>22-24</sup>

Stuttu eftir að tókst að einangra stofnfrumur úr fósturvísun manna komu í ljós ýmis vandamál sem upp gætu komið í stofnfrumulækningum. Tryggja þarf að hES-frumurnar séu algerlega sérhæfðar í viðkomandi frumugerð, því ef hES-frumunum sjálfum væri sprautað í sjúkling gætu þær myndað furðuæxli. Í upphafi krafðist ræktun hES-frumna einnig MEF-hjálparfrumna auk kálfa-sermis og var þá hætta á veirumengun og jafnvel kúariðusmiti. Þessum ótta hefur verið eytt með því að sleppa MEF-hjálparfrumum og nota sermisfrítt æti. Ennfremur tjá hES-frumur vefjaflokka-prótein (HLA) á yfirborði sínu eftir sérhæfingu og leiðir það til mögulegrar höfnunar sjúklings á þessum frumum við ígræðslu.<sup>3</sup> Ein lausn á þessu var að nota klónun, það er fjarlægja kjarna úr eggfrumu og setja kjarna úr líkamsfrumu sjúklings í eggfrumuna í staðinn. Þessi eggfruma yrði látin þroskast í kímblöðrustig, þar sem innri frumumassi yrði nýttur til sérhæfingar í tiltekna frumugerð sem væri nauðsynleg sjúklingnum. Hann myndi því ekki hafna frumum sem innhalda hans eigið genamengi. Slík klónun í mönnum í læknisfræðilegum tilgangi tókst nýlega.<sup>25</sup>

Rannsóknir á fósturvísun eru leyfðar á Íslandi, samanber lög um tæknifrjóvganir, nr. 55 frá 2008<sup>26</sup> og er því unnt að einangra stofnfrumur úr fósturvísun manna hér á landi samkvæmt núgildandi lögum. Þess ber þó að geta að slíkar rannsóknir eru undir ströngu eftirliti Vísindasiðanefndar og einangrun stofnfrumna úr mönnum hefur ekki verið framkvæmd hér á landi enn sem komið er, enda dýrt ferli.

#### Endurforritaðar frumur umturna kenningu um óafturkræfðar sérhæfðar frumur

Nóbelsverðlaunin í lífeðlis- og læknisfræði árið 2012 skiptust á milli tveggja vísindamanna, John B. Gurdon, Cambridge-háskóla, Bretlandi og Shinya Yamanaka, Kyoto-háskóla, Japan. Verðlaunin voru veitt fyrir að sýna að þroskaðar sérhæfðar frumur er hægt að endurforrita í fjölhæfar stofnfrumur. Niðurstöður þeirra breyttu þeirri almennu skoðun að sérhæfing líkamsfrumna (*somatic cells*) væri óafturkræf.<sup>27</sup> Gurdon klónaði fyrstur manna frosk þar sem hann flutti kjarna úr sérhæfðri líkamsfrumu úr froski í kjarnalaust egg, og sýndi fram á að erfðaupplýsingarnar úr líkamsfrumunni nægðu til að mynda halakörtu (1962). Yamanaka varð fyrstur til



**Mynd 2.** iPS-frumur eru fjölhæfar stofnfrumur sem eru myndaðar með því að endurforrita líkamsfrumur, og þar með afsérhæfa þær. iPS-frumur hafa þann kost fram yfir stofnfrumur úr fósturvísu (hES-frumur) að þær hafa sama genamengi og líkamsfrumur þess einstaklings sem lífsýni hefur verið tekið úr. Þær eru því mjög gagnleg uppspretta fyrir læknaeindin. Viðgerð á tilteknu geni sem orsakar sjúkdóm er möguleg í iPS-frumum sem síðan yrðu sérhæfðar í þá tilteknu frumugerð sem er óstarfhæf í sjúklingi og notaðar í ígræðslu. Einnig má nota iPS-frumur úr sjúklingum til að skilja betur sameindafræðilega ferla sjúkdómsins. Lyfjaprófanir eru þegar gerðar á iPS-frumum sjúklinga.

að umbreyta sérhæfðri líkamsfrumu beint í fjölhæfa stofnfrumu (2006).<sup>28</sup>

Í fósturþroskun eru fyrstu frumurnar í fósturvísi ósérhæfðar en verða svo sérhæfðari með tímanum. Í kringum 1950 höfðu þroskunarfræðingar klónað frosk með því að flytja kjarna úr fósturvísi í kjarnalaust froskaegg (*Rana pipiens*) og myndaðist þá fullmynduð halakarta (*Somatic Cell Nuclear Transfer, SCNT*).<sup>29</sup> Þegar þeir reyndu á hinn bóginn að endurtaka svipaða tilraun með kjarnaflutningi úr sérhæfðri frumu í kjarnalaust froskaegg, mistókst fósturþroskun í halakörtunni.<sup>30</sup> Því var almennt talið að erfðaupplýsingar í sérhæfðum frumum gangist undir óafturkræfar breytingar sem gera það að verkum að frumurnar hafi takmarkaða sérhæfingarmöguleika. Þekkt myndlíking sem lýsti þessari viðteknu hugmynd vel var umframerfðalandslag (*epigenetic landscape*) Waddingtons sem sýndi kúlu uppi á fjallstoppi sem átti að líkjast ósérhæfðri stofnfrumu sem sérhæfðist meira og meira því lengra sem hún rúllaði niður fjallið og endaði að lokum í dalverpi sem sérhæfð fruma.<sup>31</sup> Niðurstöður John Gurdon breyttu þessari viðteknu skoðun manna. Hann notaði aðra froskategund (*Xenopus laevis*) í sínum rannsóknum. Honum tókst að flytja kjarna úr sérhæfðri líkamsfrumu frosksins (þekjufrumu meltingarvegarins) í kjarnalaust egg, og sýndi fram á að erfðaupplýsingarnar úr líkamsfrumunni nægðu til að mynda halakörtu, væru þær í réttu umhverfi. Þetta gerði hann árið 1962.<sup>32</sup> Með þessum niðurstöðum sýndi hann fram á að erfðaupplýsingar tapast ekki í sérhæfingarferlinu. Í dag vitum við að erfðaefnið er mistjáð í hinum mismunandi ósérhæfðu og sérhæfðu frumum. Gurdon breytti ekki aðeins grundvallarhugmyndum manna um óafturkræfni sérhæfðra frumna heldur innleiddi hann nýtt rannsóknarsvið og er stundum kallaður guðfaðir klónunar.<sup>33</sup> Spurningunni hvort hægt væri að umbreyta líkamsfrumu einni og sér beint í fjölhæfa stofnfrumu var þó enn ósvarað. Yamanaka hafði í nokkur

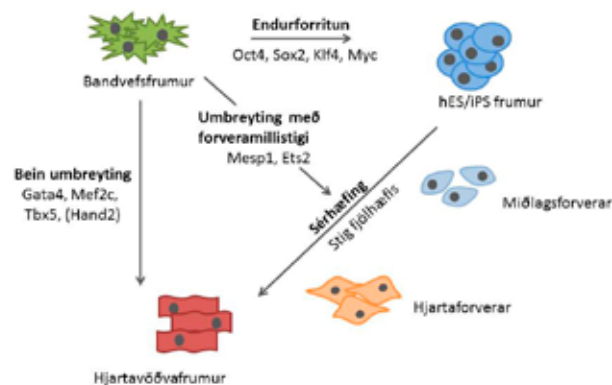
ár verið að skoða hvaða stjórnprótein/umritunarþættir halda ES-frumum ósérhæfðum og fjölhæfum og uppgötvaði meðal annars að NANOG-stjórnpróteinið verður að vera tjáð svo að ES-frumur haldist fjölhæfar.<sup>34</sup> Þeir Takahashi og Yamanaka framkvæmdu síðan djarfa tilraun þar sem þeir komu mismunandi samsetningum af stjórngeum fyrir í bandvefsfrumum músa í frumurækt með hjálp retróveirusýkingar og notuðu valkvætt próf til að rekja þær frumur sem umbreyttust í fjölhæfar stofnfrumur. Þeim tókst að þrengja hringinn niður í aðeins fjögur stjórnge: *OCT4*, *SOX2*, *KLF4* og *MYC* (sem nú eru nefndir Yamanaka-þættirnir) er gátu endurforritað líkamsfrumurnar í fjölhæfar stofnfrumur (mynd 2). Frumur þessar höfðu eiginleika sem voru fyllilega sambærilegir við eiginleika ES-frumna. Þessar frumur fengu nafnið iPS-frumur (*induced Pluripotent Stem cells*).<sup>28</sup> Ári seinna tókst sama rannsóknarhópi að mynda iPS-frumur úr mönnum.<sup>35</sup> Á fáum árum hefur orðið bylting í rannsóknum á iPS-frumum. Ýmsar ólíkar aðferðir hafa verið prófaðar við að mynda iPS-frumur, bæði hvað varðar innskeytingaraðferðir á stjórngeunum, svo og frumugerð líkamsfrumnanna. Einnig hafa færri stjórnþættir verið prófaðir og kemur í ljós að sleppa má *MYC*, enda hefur hann valdið æxlismyndunum í músunum sem á kímblöðrustigi hafa verið sprautaðar með iPS-frumum. Þegar retróveirugenaferjum með fjölhæfigeunum er skeytt inn í frumurnar innlimast þær tilviljanakennt inn í genamengið og gætu því stuðlað að æxlismyndun. Þess vegna hefur verið reynt að komast hjá því að nota retróveirugenaferjur, til dæmis með veirugenaferjum sem innlimast ekki, með stöðugu RNA og með próteinum.<sup>36,37</sup> Heimtur á fjölhæfum iPS-frumum eru lágur og því nauðsynlegt að nota valkvætt samrunagen til að velja úr þær frumur sem hafa endurforritast í iPS-frumur. Ferlið við að mynda iPS-frumur tekur um 2-3 vikur. En hvað gera Yamanaka-þættirnir til þess að yta undir afsérhæfingu (*de-differentiation*)? Í stuttu máli virkja þeir gen sem taka þátt í fjölhæfi frumna en þagga aftur á móti niður í genum sem hafa hlutverki að gegna í frumusérhæfingu. Áður var greint frá að EMT á sér stað í fósturþroskun og við sérhæfingu hES-frumna. Yamanaka-þættirnir yta þar af leiðandi undir endurforritun með öfugu ferli sem nefnist *Mesenchymal-to-Epithelial transition* (MET). Sýnt hefur verið að *SOX2/OCT4* halda niðri EMT-stjórnpróteininu *SNAIL*, *KLF4* ýtir undir tjáningu á *E-CADHERIN* og *C-MYC* hindrar *TGF-β* boðleiðina.<sup>38,39</sup> Í framhaldinu eykst tjáning á *NANOG*, *SOX2* og *OCT4* genum frumunnar og þessi aðalstjórnprótein fjölhæfis valda virkjun á þeim genum sem nauðsynleg eru fjölhæfi, en virkja einnig svokölluð *polycomb group* prótein sem þagga niður tjáningu sérhæfingargena með litnisumbreytingu (*chromatin remodelling*).<sup>40</sup>

### Nytsemi fjölhæfra stofnfrumna

Frá lækisfræðilegu sjónarhorni gætu iPS-frumur orðið gagnlegar í lyfjapróun og til skilnings á sjúkdómsferlum. Einnig væri hægt að hugsa sér að búa til sérhannaðar fjölhæfar stofnfrumur fyrir sjúklinga. Þessar frumur leysa nefnilega þann vanda að sjúklingur hafni ígræddum frumum enda hafa þær sama genamengi og sjúklingurinn sjálfur. Á seinustu árum hafa iPS-frumur verið búnar til úr afar mörgum sjúklingum og er aðgangur að upplýsingum þar að lútandi opin.<sup>41</sup>

iPS-frumur sjúklinga hafa verið sérhæfðar í þá frumugerð sem sjúklingur hefur óstarfhæfa í líkama sínum og lyfjapróf gerð á þessum frumum. Raunverulegt dæmi um þessa nálgun er sameindafræðileg rannsókn á iPS-frumum úr barni sem þjáðist af hjartsláttartruflunum. Unnt var að greina stökkbreytingu í SCN5A-geninu sem olli longQT-heilkenni í barninu. Lyfjapróf-anir á iPS-ættuðum hjartavöðvafrumum gerðu það að verkum að hægt var að meðhöndla barnið með réttum lyfjum.<sup>42</sup> Lækning með iPS-frumum hefur sínar takmarkanir fyrir utan kostnaðarliðinn. Í fyrsta lagi þarf erfðabátturinn að veða þungt í sjúkdómnum eins og til dæmis í arfgenga slímseigjusjúkdómnum *cystic fibrosis*, sem orsakast fyrst og fremst af einni stökkbreytingu í CFTR-geninu. Þann sjúkdóm má þá rannsaka í lungnaþekjufrumum. Á hinn bóginn væri erfitt að skoða sjúkdóma þar sem margir erfða- og umhverfisþættir spila saman. Í öðru lagi skipta viðmiðin öllu máli eins og í öðrum tilraunum. Þegar farið var að búa til iPS-frumur úr sjúklingum var notast við iPS-frumviðmið úr heilbrigðum einstaklingum. Ólíkur erfðafræðilegur bakgrunnur í þessum frumum er mikið áhygguefni og gæti eins verið ástæða svipgerðarbreytinga í stað stökkbreytingarinnar sem verið er að rannsaka. Þetta er talið vera brotalöm á þessum rannsóknum.<sup>43</sup> Í þriðja lagi er nauðsynlegt að iPS-frumur – bæði viðmið og þær sem hafa stökkbreytingu – séu búnar til á sama hátt, það er með nákvæmlega sömu aðferð við sömu ræktunaraðstæður. Til viðbótar má nefna mögulega skekkju vegna mismunandi umfram-erfða því það hefur sýnt sig að iPS-frumur hafa mismunandi metýleringarmynstur. Það getur haft áhrif á getu frumnanna til að sérhæfast í tiltekna frumugerð. Lausn á þessu viðmiðunarvandamáli er að nota fjölhæfar stofnfrumur sem hafa nákvæmlega sama erfðafræðilega bakgrunn utan stökkbreytingarinnar sem á að rannsaka, og mætti kalla þær samerfða (*isogenic*). Til þess að uppfylla slíkan gæðastaðal þarf annars vegar að mynda iPS-frumur úr sjúklingi sem hefur ákveðna stökkbreytingu og búa svo til viðmiðunar-iPS-frumur með því að leiðrétta sömu stökkbreytingu í sömu frumum. Að öðrum kosti eru notaðar hES-frumur sem viðmið en stökkbreyting sem veldur sjúkdómnum yrði þá mynduð í sömu frumum og svipgerð síðan athuguð. Þessi nálgun er nú viðtekin og sem dæmi um slíkar aðferðir má annars vegar nefna athugun á LRRK2-stökkbreytingu sem talin er valda Parkinsonsjúkdómi<sup>44</sup> og rannsókn á stökkbreytingu í KCNH2 sem veldur longQT-heilkenni.<sup>45</sup> Í Japan hefur löggjöf verið rýmkuð til þess að gera kleift að græða iPS-afleiddar litþekjufrumur í sjúkling sem þjáist af vota forminu af aldursbundinni hrörnun í augnbotnum. Ekki er búist við að í þessari fyrstu aðgerð sinnar tegundar verði strax mögulegt að lækna hrörnunina heldur frekar að koma í veg fyrir enn meiri hrörnun og athuga hliðarverkanir, svo sem ónæmissvörun eða æxlisvöxt samfara aðgerðinni.<sup>46,47</sup>

Þar sem ákveðin stökkbreyting í geni veldur sjúkdómnum þyrfti að leiðrétta stökkbreytinguna á iPS-frumustiginu með genamiðun (*gene targeting*) og sérhæfa frumurnar svo í kjölfarið í þá frumugerð sem sjúklingurinn þarf á að halda (mynd 2). Samstæð litningaendurröðun (*homologous recombination*) er mjög vel þekkt og áhrifarík aðferð til að slá út gen í músum („knockout-mýs“) en hún hefur reynst þung í vöfum við útslátt gena í hES-frumum og iPS-frumum.<sup>48</sup> Á allra seinustu árum hafa miklar framfarir orðið í þessum geira. *Transcription activator-like effector nucleases*



**Mynd 3.** Umbreyttar frumur. Unnt er að umbreyta líkamsfrumu beint í aðra líkamsfrumu án þess að endurforrita hana fyrst í fjölhæfa stofnfrumu. Fyrst tókst þessi umbreyting með forveramillistigi. Síðar tókst að umbreyta sérhæfðri frumu beint í aðra sérhæfða. Til dæmis er hægt að skeyta inn stjórngenumum GATA4, MEF2C, TBX5 og HAND2, sem eru hornsteinar hjartavöðvafrumna, og mynda þannig starfhæfar hjartavöðvafrumur.

(TALENs) eru ensím sem kljúfa tvíþátta DNA á sértækum stöðum í genamenginu. Enn áhrifaríkari aðferð er CRISPR (*Clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) tækni sem er ný aðferð sem leyfir breytingar á erfðaefti frumna og lífvera. Þessi tækni býður upp á afkastamikla aðferð í erfðatækni sem mætti nefna genaskurðlækningar. Nýlega eru nokkur dæmi þess að CRISPR-tæknin hafi verið notuð til að leiðrétta stökkbreyttar iPS-frumur úr sjúklingum, svo sem Duchenne-vöðvarýrnunarsjúkdóminn.<sup>49</sup> Ýmsar framfarir hafa þegar orðið á þessari nýju tækni til þess að forðast „off-target“ áhrif og má gera ráð fyrir að aðferðin verði þróuð enn frekar á næstu árum.<sup>50-52</sup>

**Stytt leið – Líkamsfrumum umbreytt beint í aðrar líkamsfrumur**

Lengi hefur verið vitað að stjórnróteinið MYOD1 stjórnar tjáningu gena sem hafa hlutverki að gegna í þroskun beinagrindavöðva. Ef þessu geni er skeytt í bandvefsfrumur þá virkjast vöðvaþroskunargen og frumurnar umbreyttast í beinagrindavöðvafrumur.<sup>53</sup> iPS-frumurnar ollu straumhvörfum í stofnfrumurannsóknum og í framhaldi af þessum mikla áfanga hafa vísindamenn prófað sig áfram með að umbreyta líkamsfrumum jafnvel beint í aðrar líkamsfrumur án milligöngu hinna fjölhæfu iPS-frumna (*direct reprogramming*). Ein af fyrstu tilraununum var gerð á rannsóknarstofu í sykursýki, þar sem brisartilfrumur voru endurforritaðar í insúlín-myndandi beta-frumur í músum *in vivo*. Níu genum sem eru þýðingarmikil í beta-frumuþroskun var skeytt inn í bris músar í mismunandi samsetningum. Í ljós kom að samsetning þriggja gena, sem eru umritunarþættirnir NGN3, PDX1 og MAFA, var nægileg og nauðsynleg til þess að stuðla að umbreytingu brisartilfrumna í beta-eyju-frumur (20% heimtur).<sup>54</sup> Þess má þó geta að báðar þessar frumugerðir eru afkomendur sama forverans og því um færri utanerfðabætti að ræða heldur en við umbreytingu frumugerðar í aðra frumugerð sem jafnvel á uppruna í öðru fósturlagi. Í kjölfarið hefur mýmörgum frumum verið umbreytt. Vegna þess hversu algengt það er að hjarta- og æða-



sjúkdómar dragi fólk til dauða er mikilvægt að geta endurmyndað hjartavöðvafrumur. Fyrst tókst að umbreyta bandvefsfrumum í hjartavöðvafrumur með því að af-sérhæfa þær í átt að fjölhæfi en stöðva á ákveðnu millistigi (*pluripotent intermediate*) og sérhæfa þær þá í skilyrtu æti í hjartaforvera (mynd 3). Þetta hefur einnig verið gert með stjórnpróteinunum MESP1 og ETS2.<sup>55,56</sup> Nú hefur tekist að umbreyta bandvefsfrumum beint í hjartavöðvafrumur *in vitro* með innskeytingu stjórnpróteinanna GATA4, MEF2C, TBX5<sup>57</sup> og HAND2.<sup>58</sup> Hjartadrep var framkallað í músum og stjórnpróteinum komið inn í bandvefsfrumur í skiptingu í örvefnum með hjálp retróveira en þær sjýka ekki hjartavöðvafrumur því þær eru ekki í skiptingu. Í tilraunum þessum var virkni hjartans bætt með hjálp umbreyttra bandvefsfrumna í starfhæfar hjartavöðvafrumur. Þótt hér hafi aðeins verið tekið dæmi um hjartavöðvafrumur hefur ýmsum líkamsfrumum (þó einkum bandvefsfrumum) verið umbreytt beint yfir í ýmsar frumugerðir.

## Samantekt

Í kjölfarið á fyrstu einangrun stofnfrumna úr fósturvísnum manna (hES-frumum) árið 1998 urðu ótrúlegar framfarir í rannsóknum á þessum fjölhæfum stofnfrumum. Skilningur á sameindafræðilegum ferlum í fjölhæfum frumum jókst til muna og leiddi til þess

að líkamsfrumur voru endurforritaðar í fjölhæfar stofnfrumur sem nefndar eru iPS-frumur og höfðu mjög svipaða eiginleika og hES-frumur. Þessi áfangi gjörbylti einnig hugmyndum fólks um óafturkræfi frumuþroska því niðurstöður tilraunarinnar sönnuðu að afsérhæfa mætti sérhæfðar frumur. Í framhaldinu hefur einnig tekist að umbreyta sérhæfðri frumu beint í aðra sérhæfða frumu af allt öðrum toga án fjölhæfa millistigsins. Miklar vonir eru bundnar við nytsemi fjölhæfra stofnfrumna í læknavísindum, það er í lyfjaprófunum og vefjaígræðslum. Nú þegar hafa verið framkvæmdar lyfjaprófanir á iPS-afleiddum frumum sjúklinga og þær gefið góða raun. Mikið kapp er lagt á að bæta aðferðir til þess að leiðrétta stökkbreytingar í iPS-frumum sjúklinga svo að hægt sé að græða iPS-afleiddar frumur aftur í sjúklinginn. Ýmsar hindranir eru á veginum, svo sem heimtur ígræddra frumna í skaddaðan vef sjúklings, auk þess sem slík einstaklingsbundin lækning yrði mjög kostnaðarsöm.

## Þakkir

Ég vil þakka Eiríki Steingrímssyni og Ásdísi Kristjánsdóttur fyrir yfirlestur handrits og góðar ábendingar. Einnig vil ég þakka Ernu Magnúsdóttur fyrir gagnlegar samræður.

## Heimildir

- Pera MF, Trounson AO. Human embryonic stem cells: prospects for development. *Development* 2004; 131: 5515-25.
- Guðjónsson T, Steingrímsson E. Eiginleikar stofnfrumna: frumusérhæfing og ný meðferðarúrræði? *Læknablaðið* 2003; 89: 43-8.
- Drukker M, Katz G, Urbach A, Schuldiner M, Markel G, Itskovitz-Eldor J, et al. Characterization of the expression of MHC proteins in human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 9864-9.
- Eastham AM, Spencer H, Soncin F, Ritson S, Merry CL, Stern PL, et al. Epithelial-mesenchymal transition events during human embryonic stem cell differentiation. *Cancer Res* 2007; 67: 11254-62.
- Richter A, Valdimarsdóttir L, Hrafnkeldsottir HE, Runarsson JF, Omarsdóttir AR, Ward-van Oostwaard D, et al. BMP4 promotes EMT and mesodermal commitment in human embryonic stem cells via SLUG and MSX2. *Stem Cells* 2014; 32: 636-48.
- Tan EJ, Olsson AK, Moustakas A. Reprogramming during epithelial to mesenchymal transition under the control of TGFbeta. *Cell Adh Migr* 2015; 9: 233-46.
- Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292: 154-6.
- Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78: 7634-8.
- Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, Durning M, Harris CP, Becker RA, et al. Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 7844-8.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282: 1145-7.
- Xu RH, Peck RM, Li DS, Feng X, Ludwig T, Thomson JA. Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells. *Nat Methods* 2005; 2: 185-90.
- Amit M, Itskovitz-Eldor J. Maintenance of human embryonic stem cells in animal serum- and feeder layer-free culture conditions. *Methods Mol Biol* 2006; 331: 105-13.
- Xu RH, Sampsell-Barron TL, Gu F, Root S, Peck RM, Pan G, et al. NANOG is a direct target of TGFbeta/activin-mediated SMAD signaling in human ESCs. *Cell Stem Cell* 2008; 3: 196-206.
- Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, et al. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 2003; 113: 643-55.
- Young RA. Control of the embryonic stem cell state. *Cell* 2011; 144: 940-54.
- Jaenisch R, Young R. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell* 2008; 132: 567-82.
- Amit M, Itskovitz-Eldor J. Derivation and spontaneous differentiation of human embryonic stem cells. *J Anat* 2002; 200: 225-32.
- Kriks S, Shim JW, Piao J, Ganat YM, Wakeman DR, Xie Z, et al. Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease. *Nature* 2011; 480: 547-51.
- Reubinoff BE, Itsykson P, Turetsky T, Pera MF, Reinhartz E, Itzik A, et al. Neural progenitors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2001; 19: 1134-40.
- Kirkeby A, Grealish S, Wolf DA, Nelander J, Wood J, Lundblad M, et al. Generation of regionally specified neural progenitors and functional neurons from human embryonic stem cells under defined conditions. *Cell Rep* 2012; 1: 703-14.
- Yang L, Soonpaa MH, Adler ED, Roepke TK, Kattman SJ, Kennedy M, et al. Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR+ embryonic-stem-cell-derived population. *Nature* 2008; 453: 524-8.
- Laflamme MA, Chen KY, Naumova AV, Muskheli V, Fugate JA, Dupras SK, et al. Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat Biotechnol* 2007; 25: 1015-24.
- Kehat I, Khimovich L, Caspi O, Gepstein A, Shofti R, Arbel G, et al. Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2004; 22: 1282-9.
- Van Laake LW, Van Hoof D, Mummery CL. Cardiomyocytes derived from stem cells. *Ann Med* 2005; 37: 499-512.
- Tachibana M, Amato P, Sparman M, Gutierrez NM, Tippner-Hedger R, Ma H, et al. Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. *Cell* 2013; 153: 1228-38.
- Lög um tæknifriðvögun og notkun kynfrumna og fósturvísna manna til stofnfrumrannsóknna. *Lagasafn. Íslensk lög* 1. október 2009.
- Rossant J, Mummery C. NOBEL 2012 Physiology or medicine: Mature cells can be rejuvenated. *Nature* 2012; 492: 56.
- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126: 663-76.
- Briggs R, King TJ. Transplantation of Living Nuclei From Blastula Cells into Enucleated Frogs' Eggs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1952; 38: 455-63.
- King TJ, Briggs R. Changes in the Nuclei of Differentiating Gastrula Cells, as Demonstrated by Nuclear Transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1955; 41: 321-5.
- Waddington CH. The strategy of the gene. A discussion of some aspects of theoretical biology. Allen and Unwin Ltd, London 1957.
- Gurdon JB. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J Embryol Exp Morphol* 1962; 10: 622-40.
- Kolata G. Clone: The Road To Dolly, And The Path Ahead. William Morrow and Company Inc, New York 1998.
- Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, et al. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 2003; 113: 631-42.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131: 861-72.
- Gonzalez F, Boue S, Izpisua Belmonte JC. Methods for making induced pluripotent stem cells: reprogramming a la carte. *Nat Rev Genet* 2011; 12: 231-42.
- Chun YS, Byun K, Lee B. Induced pluripotent stem cells and personalized medicine: current progress and future perspectives. *Anat Cell Biol* 2011; 44: 245-55.

38. Li R, Liang J, Ni S, Zhou T, Qing X, Li H, et al. A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell* 2010; 7: 51-63.
39. Samavarchi-Tehrani P, Golipour A, David L, Sung HK, Beyer TA, Datti A, et al. Functional genomics reveals a BMP-driven mesenchymal-to-epithelial transition in the initiation of somatic cell reprogramming. *Cell Stem Cell* 2010; 7: 64-77.
40. Polo JM, Hochedlinger K. When fibroblasts MET iPSCs. *Cell Stem Cell* 2010; 7: 5-6.
41. Santostefano KE, Hamazaki T, Biel NM, Jin S, Umezawa A, Terada N. A practical guide to induced pluripotent stem cell research using patient samples. *Lab Invest* 2015; 95: 4-13.
42. Terrenoire C, Wang K, Tung KW, Chung WK, Pass RH, Lu JT, et al. Induced pluripotent stem cells used to reveal drug actions in a long QT syndrome family with complex genetics. *J Gen Physiol* 2013; 141: 61-72.
43. Musunuru K. Personalized genomes and cardiovascular disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2015; 5: a014068.
44. Reinhardt P, Schmid B, Burbulla LF, Schondorf DC, Wagner L, Glatza M, et al. Genetic correction of a LRRK2 mutation in human iPSCs links parkinsonian neurodegeneration to ERK-dependent changes in gene expression. *Cell Stem Cell* 2013; 12: 354-67.
45. Bellin M, Casini S, Davis RP, D'Aniello C, Haas J, Ward-van Oostwaard D, et al. Isogenic human pluripotent stem cell pairs reveal the role of a KCNH2 mutation in long-QT syndrome. *Embo J* 2013; 32: 3161-75.
46. Cyranoski D. Japanese woman is first recipient of next-generation stem cells 2014. 15.03.2015; nature.com/news/japanese-woman-is-first-recipient-of-next-generation-stem-cells-1.15915 - april 2015.
47. Pilot safety study of iPSC-based intervention for wet-type AMD 2013. 12.03.2015; riken-ibri.jp/AMD/english/research/index.html - april 2015.
48. Moretti A, Laugwitz KL, Dorn T, Sinnecker D, Mummery C. Pluripotent stem cell models of human heart disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013; 3: 49.
49. Li HL, Fujimoto N, Sasakawa N, Shirai S, Ohkame T, Sakuma T, et al. Precise Correction of the Dystrophin Gene in Duchenne Muscular Dystrophy Patient Induced Pluripotent Stem Cells by TALEN and CRISPR-Cas9. *Stem Cell Reports* 2015; 4: 143-54.
50. Fu Y, Sander JD, Reyon D, Cascio VM, Joung JK. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat Biotechnol* 2014; 32: 279-84.
51. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc* 2013; 8: 2281-308.
52. Tsai SQ, Wyvekens N, Khayter C, Foden JA, Thapar V, Reyon D, et al. Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing. *Nat Biotechnol* 2014; 32: 569-76.
53. Davis RL, Weintraub H, Lassar AB. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* 1987; 51: 987-1000.
54. Zhou Q, Brown J, Kanarek A, Rajagopal J, Melton DA. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature* 2008; 455: 627-32.
55. Islas JF, Liu Y, Weng KC, Robertson MJ, Zhang S, Prejusa A, et al. Transcription factors ETS2 and MESP1 trans-differentiate human dermal fibroblasts into cardiac progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109: 13016-21.
56. Efe JA, Hilcove S, Kim J, Zhou H, Ouyang K, Wang G, et al. Conversion of mouse fibroblasts into cardiomyocytes using a direct reprogramming strategy. *Nat Cell Biol* 2011; 13: 215-22.
57. Qian L, Huang Y, Spencer CI, Foley A, Vedantham V, Liu L, et al. In vivo reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes. *Nature* 2012; 485: 593-8.
58. Song K, Nam YJ, Luo X, Qi X, Tan W, Huang GN, et al. Heart repair by reprogramming non-myocytes with cardiac transcription factors. *Nature* 2012; 485: 599-604.

## ENGLISH SUMMARY

### Breakthrough in research on pluripotent stem cells and their application in medicine

Guðrún Valdimarsdóttir, Anne Richter

Embryonic stem cells are, as the name indicates, isolated from embryos. They are pluripotent cells which can be maintained undifferentiated or induced to differentiate into any cell type of the body. In 1998 the first isolation of human embryonic stem cells was successful and they became an interesting source for stem cell regenerative medicine. Only 8 years later pluripotent stem cells were generated by reprogramming somatic cells into induced pluripotent stem cells (iPSCs). This was a

revolution in the way people thought of cell commitment during development. Since then, a lot of research has been done in understanding the molecular biology of pluripotent stem cells. iPSCs can be generated from somatic cells of a patient and therefore have the same genome. Hence, iPSCs have great potential application in medicine, as they can be utilized in disease modelling, drug screening and cell replacement therapy.

Dept. Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine, BMC, University of Iceland

**Key words:** pluripotent stem cells, differentiation, reprogramming, iPSCs, direct lineage reprogramming.

**Correspondence:** Guðrún Valdimarsdóttir [gudrunva@hi.is](mailto:gudrunva@hi.is)