



**TURUN  
YLIOPISTO**

Matemaattis-luonnontieteellinen  
tiedekunta

# **Indusoidut pluripotentit kantasolut lääketieteessä**

Tuuli Korpinen

Biologia

LuK-tutkielma

Laajuus: 6 op

6.3.2024

Turku

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

Indusoidut pluripotentit kantasolut eli IPS-solut ovat erilaistuneista somaattisista soluista uudelleenohjelmoituja kantasolun kaltaisia soluja. Uudelleenohjelmointi saadaan aikaan Oct3/4-, Sox2-, Klf4- ja c-Myc-transkriptiofaktorien geenien eli Yamanaka-faktorien siirtämisellä somaattiseen soluun. Ensimmäisen kerran uudelleenohjelmointi saatiin aikaan vuonna 2006, jolloin Takahashi & Yamanaka onnistuivat uudelleenohjelmoimaan hiiren fibroblastisoluja kantasoluiksi. Havainto käynnisti aktiivisen tutkimuksen ja kiinnostuksen IPS-solujen käyttöön lääketieteessä. Kuten alkion kantasoluilla myös IPS-soluilla on kyky uusiutua ja erilaistua kaikiksi kudoksiksi lukuun ottamatta istukkaa ja sikiökalvoja, minkä vuoksi IPS-soluilla on useita terapeuttisia käyttökohteita. Terapeuttisiin käyttökohteisiin lukeutuvat tautimallinnus, lääkekehitys, toksisuustestaus, soluterapiat ja geeniterapiat. Käyttökohteita on useita, mutta terapeuttiseen käyttöön liittyy vielä paljon haasteita. IPS-solujen tutkimus on kasvavaa, ja ongelmiin kehitellään ratkaisuja IPS-solujen terapeuttista käyttöä varten.

## Sisällysluettelo

1	Johdanto .....	1
2	Kantasolut .....	2
2.1	Kantasolujen proliferaatio .....	2
2.1.1	Kantasolujen mikroympäristö .....	2
2.1.2	Kantasolujen uusiutuminen .....	3
2.1.3	Kantasolujen erilaistuminen .....	4
3	Kantasolujen indusointi .....	5
3.1	Kasvutekijät .....	7
3.2	Yamanaka faktorien siirtotekniikat soluun .....	8
3.2.1	Virusvektorit .....	8
3.2.2	DNA- ja lähetti-RNA-menetelmät .....	9
3.2.3	Transposonit .....	9
3.2.4	Proteiineihin perustuvat menetelmät .....	10
4	IPS-solujen käyttö lääketieteessä .....	10
4.1	Tautimallinnus .....	11
4.2	Lääkekehitys .....	12
4.2.1	Neurodegeneratiiviset sairaudet .....	13
4.2.2	Sydämen rytmihäiriöt .....	13
4.3	Toksisuustestit .....	14
4.3.1	Neurotoksisuus .....	14
4.3.2	Kardiotoksisuus .....	15
4.3.3	Hepatotoksisuus .....	16
4.4	Soluterapiat .....	16
4.4.1	Fibroosi .....	17
4.4.2	Syöpä .....	18
4.5	Geeniterapiat .....	18
4.5.1	Perinnölliset sairaudet .....	19
4.5.2	Immunoterapia syövän hoidossa .....	20
4.6	IPS-solujen haasteet ja tulevaisuuden näkymä .....	21
5	Yhteenveto .....	22
6	kirjallisuus .....	24

# 1 JOHDANTO

Kantasoluksi luokitellaan solu, joka kykenee tuottamaan uusia kantasoluja ja erilaistumaan toisenlaiseksi soluksi. Kantasolut ovat välttämättömiä alkion yksilönkehityksessä, ja vaurioituneen kudoksen korjaamisessa, mutta myös lääketieteellisessä tutkimuksessa. Perinteisesti kantasoluja on kerätty lääketieteelliseen tutkimukseen alkion blastokystin sisäsolumassasta, missä kantasolut ovat pluripotenttejä eli monikykyisiä. Aikuisen kantasolujen erilaistumiskapasiteetti taas on huomattavasti alhaisempi, mikä tekee alkion pluripotentteistä kantasoluista päteviä lääketieteelle. Tutkimusta on kuitenkin rajoittanut alkion kantasoluihin kohdistuvat eettiset ongelmat, mihin ratkaisuksi on kehitetty aikuisen somaattisista soluista uudelleenohjelmoidut kantasolut eli indusoidut pluripotentit kantasolut.

Indusointi on prosessi, missä erilaistunut somaattinen solu uudelleenohjelmoidaan transkriptiofaktorien avulla kantasoluja muistuttavaan tilaan, jolloin syntyy indusoituja pluripotenttejä kantasoluja eli IPS-soluja. Kuten alkion kantasolut myös IPS-solut ovat monikykyisiä eli ne pystyvät erilaistumaan kolmen alkiokerroksen soluiksi, mikä tekee IPS-soluista käyttökelpoisia eri solutyypin tuottamiseen lääketieteellistä käyttöä varten. Alkion kantasolujen sekä IPS-solujen ominaisuuksiin kuuluvat myös uusiutuminen eli jakautuminen, jonka seurauksena syntyy uusia kantasoluja. IPS-solujen uusiutuminen mahdollistaa jatkuvan solujen tuotannon niin lääkekehitykseen ja tautimallinnukseen kuin esimerkiksi kudostavurion korjaamiseen. Pluripotenttius ja uusiutuminen ovat IPS-solujen avainominaisuuksia lääketieteelle.

Koska IPS-solut voivat erilaistua kaikiksi aikuisen solutyypeiksi, on IPS-soluilla monia terapeuttisia mahdollisuuksia. Erilaistuneita soluja voidaan käyttää alkion kantasolujen ja *in vivo* -mallien sijaan sairauksien mallintamiseen tai esimerkiksi lääkkeiden tehokkuuden ja toksisuuden testaamiseen. Toisaalta uudelleenohjelmointi on luonut mahdollisuuden tuottaa potilasspesifejä soluja soluterapioita varten, jotka voisivat jopa palauttaa solujen ja elinten normaalin toiminnan. Soluterapioiden kehittämistä on myös mullistanut kyky muokata IPS-soluja geneettisesti CRISPR-Cas9-muokkausmenetelmällä, minkä avulla esimerkiksi potilaan geenimutaatiot on pystytty korjaamaan. IPS-soluilla on potentiaalia toimia hoitomuotojen kehittämisessä tai suorana hoitomuotona.

## 2 KANTASOLUT

Kantasolut ovat kudosten uusiutumista ylläpitävä tekijä. Kantasoluja tarvitaan yksilönkehityksessä muodostamaan yksilön solut, kudokset sekä elimet, ja aikuisen kudosten korjaamiseen. Kaikkikykuisiä kantasoluja esiintyy alkiossa hedelmöityksen jälkeen vain rajallisen ajan, kun taas erilaistuneita kantasoluja löytyy myös aikuiselta. Kaikki aikuisen kantasolut ovat erilaistuneita, ja kantasoluja esiintyy lähes kaikissa aikuisen kudoksissa, esimerkiksi luuytimessä ja ohutsuolen mikrovilluksessa.

Kantasolut luokitellaan toti-, pluri-, multi-, oligo- ja unipotentteihin kantasoluihin, mistä totipotentit ja pluripotentit ovat alkion kantasoluja. Totipotentit kantasolut ovat morula-vaiheen alkion kaikkikykuisiä kantasoluja, jotka pystyvät erilaistumaan kaikiksi yksilönkehityksen solutyypeiksi. Pluripotentit kantasolut ovat monikykuisiä kantasoluja, jotka pystyvät erilaistumaan kolmen alkiokerroksen soluiksi eli kaikiksi muiksi kudoksiksi paitsi istukaksi ja sikiökalvoiksi. Alkiokerroksen solut ovat puolestaan multipotentteja kantasoluja, jotka voivat erilaistua useiksi solutyypeiksi tietyssä kategoriassa.

Aikuisen kantasoluja ovat multi-, oligo- ja unipotentit kantasolut. Multipotentteja kantasoluja ovat esimerkiksi luuytimen hematopoieettiset kantasolut, jotka voivat erilaistua myeloidisen tai lymfoidisen linjan kantasoluiksi. Myeloidisen ja lymfoidisen linjan kantasolut ovat puolestaan oligopotenteja kantasoluja, jotka voivat erilaistua tietyiksi verisoluiksi. Oligopotentit kantasolut voivat siis muodostaa vain tiettyjä solutyyppejä kuten multipotentit kantasolut. Kuitenkin unipotentit kantasolut voivat erilaistua ainoastaan yhdenlaiseksi solutyypiksi kuten satelliittisoluiksi, jotka tuottavat vain luustolihasoluja.

### *2.1 Kantasolujen proliferaatio*

#### 2.1.1 Kantasolujen mikroympäristö

Niche on kantasolujen erilaistumattomuutta ylläpitävä mikroympäristö, joka säätelee kantasolujen kohtaloa kudoksissa. Se on ympäristö, missä kantasolut vastaanottavat suuren määrän erilaisia signaaleja: solu-solu vuorovaikutukset, soluväliaineen sekä kantasolujen välinen vuorovaikutus ja biokemialliset signaalit kuten erilaiset kasvutekijät

(Nava ym. 2012). Kantasolujen vuorovaikutukset ja signaalintireitit määrittävät kantasolujen kohtalon: kantasolu lähtee tuottamaan uusia kantasoluja tai irtautuu nichestä, ja lähtee erilaistumaan toiminnalliseksi soluksi.

Rakenteeltaan niche koostuu kantasoluista, jotka ovat adheesiomolekyylien kautta yhteydessä tukisoluihin ja soluväliaineen rakenneproteiineihin. Adheesiomolekyylit välittävät kantasolujen tai kantasolun ja soluväliaineen välistä vuorovaikutusta. Adheesiomolekyyleistä kadheriinit ovat reseptoreita, jotka toimivat kantasolujen välisissä solu-solu vuorovaikutuksissa. Integriinit ovat tarttumisreseptoreja, jotka vuorovaikuttavat soluväliaineen proteiinien kanssa, ja ankkuroivat tukisolut ja tätä kautta myös kantasolut soluväliaineeseen. Kantasolujen ankkuroituminen soluväliaineeseen on puolestaan tärkeää, koska soluväliaineen säikeiset rakenneproteiinit antavat rakenteellista tukea sekä joustavuutta ja auttavat kantasolujen välisessä signaloinnissa. Soluväliaineen rakenneproteiineihin kuuluvat esimerkiksi kollageeni, laminiini, fibronektiini ja elastaani.

### 2.1.2 Kantasolujen uusiutuminen

Kantasolut jakautuvat joko symmetrisesti tai epäsymmetrisesti. Symmetrinen jakautuminen tuottaa joko kaksi uutta kantasolua tai kaksi erilaistunutta solua, kun taas epäsymmetrinen jakautuminen tuottaa yhden uuden kantasolun ja lyhytaikaisen esisolun, joka erilaistuu toiminnalliseksi soluksi. Epäsymmetrisen jakautumisen läpikäyvät esimerkiksi hermojen kantasolut, kun taas symmetrisen jakautumisen läpikäyvät esimerkiksi karvafollikkelien kantasolut.

Kun jakautumisen seurauksena syntyy uusia tytärkantasoluja, puhutaan kantasolujen uusiutumisesta (self renewal). Uusiutumisella ylläpidetään kantasolujen populaatiota läpi elämän. Uusia kantasoluja syntyy kudosten tarpeiden mukaan, mikä johtaa joko kantasolujen uusiutumiseen tai vastaavasti uusiutumisen rajoittamiseen (He ym. 2009). Kun kantasolut ohjataan uusiutumaan, tapahtuu geenitoiminnan ja solusyklin muutoksia, mitkä vaikuttavat nichen ja kantasolujen väliseen vuorovaikutukseen. Geenitoiminnan muutokset pitävät kantasolut vuorovaikutuksessa nichen tukisoluihin, jolloin kantasolut uusiutuvat erilaistumisen sijaan.

Uusiutuessa kantasolujen ydintranskriptiofaktorit vuorovaikuttavat aputranskriptiofaktorien kanssa, jotka puolestaan aktivoivat kantasoluja ylläpitävien geenien toimintaa ja estävät erilaistumiseen vieviä geenejä. Ydintranskriptiofaktoreita ovat esimerkiksi Nanog, Sox2 ja Oct4, joita ilmennetään runsaasti alkion kantasoluissa. Ydintranskriptiofaktorit vaikuttavat myös uusiutumista indusoivien proto-onkogeenien toimintaan, jotka vievät solusykliä eteenpäin edistämällä solunjakautumista ja estämällä apoptoosia. Kasvunrajoitegeenit puolestaan toimivat vastakkaisesti rajoittaen uusien kantasolujen synteesiä estämällä solua jakautumasta ja edistämällä apoptoosia.

### 2.1.3 Kantasolujen erilaistuminen

Yksilönkehityksessä kantasolut erilaistuvat ja muodostavat kaikki sikiön kudokset. Toisaalta kantasoluja vaaditaan myös esimerkiksi aikuisen kudoksen korjaamiseen, jolloin kudokset signaloi erilaistuneiden solujen tarpeesta. Kun erilaistuneita kantasoluja tarvitaan lisää, irtautuvat kantasolut nichin tukisoluista, ja lähtevät erilaistumaan. Esimerkiksi kudoksen vaurio lisää uusien valkosolujen tarvetta, jolloin valkosolujen tuotanto eli hematopoiesi aktivoituu ja hematopoieettiset kantasolut erilaistuvat eri valkosoluiksi. Lisäksi vaurioitunutta kudosta korvataan uusilla erilaistuneilla soluilla.

Erilaistumisen säätelyssä tärkeitä ovat epigeneettiset säätelytekijät, ei-koodaavat RNA:t (non-coding RNA), pienet RNA:t (small RNA) ja mikro-RNA:t (Chen ym. 2022). Epigeneettisiä muokkauksia ovat esimerkiksi DNA:n metylaatio ja histonien modifikaatiot. Metylaatiot uusiutumista edistävissä transkriptiofaktoreissa saavat kantasolut erilaistumaan, kun taas demetylaatiot edistävät kantasolujen uusiutumista. Esimerkiksi erilaistuneissa soluissa pluripotentiudelle tärkeiden Nanog- ja Oct4-transkriptiofaktorien ilmentyminen on vähentynyt metylaatioiden seurauksena. Myös histonien modifikaatiot eroavat kantasoluissa ja erilaistuneissa soluissa, sillä alkion kantasoluissa 87 % histoneista ei ole trimetylysoituneita, kun taas erilaistuneissa soluissa trimetylaatiot ovat yleisiä (Fouse ym. 2008).

RNA-molekyyleistä mikro RNA:t toimivat geenejä hiljentävinä tekijöinä, minkä vuoksi osa mikro RNA:sta estää pluripotentiudelle tärkeiden transkriptiofaktorien toimintaa sitoutumalla kohdegeenin lähetti-RNA:han. Esimerkiksi let-7 mikro-RNA estää uusiutumista edistävän *Myc*-geenin toimintaa, jolloin *myc*-transkriptiofaktorilla ei muodostu ja

solut erilaistuvat. Puolestaan pitkät ei-koodaavat RNA:t pystyvät aktivoimaan uusiutumiseen tärkeitä geenejä sekä ATP:aasien aktiivisuutta edistäen kantasolujen tuotantoa.

### 3 KANTASOLUJEN INDUSOINTI

Kantasolujen indusoinnilla tarkoitetaan erilaistuneen somaattisen solun uudelleenohjelmointia pluripotentiksi kantasoluksi ja uudelleenohjelmoitua kantasolua kutsutaan indusoiduksi pluripotentiksi kantasoluksi. Erilaistuneet solut saadaan uudelleenohjelmoitua alkion kantasoluja muistuttavaan tilaan siirtämällä neljän transkriptiofaktorin geenit somaattiseen soluun, jolloin kantasoluille tyypillinen geenitoiminta aktivoituu, ja solu muuttuu pluripotentiksi. Ennen siirtämistä somaattiset solut kerätään halutusta kudoksesta, jonka jälkeen soluja kasvatetaan, ja valmistellaan uudelleenohjelmointiin. Uudelleenohjelmointi tapahtuu kullekin solutyypille spesifisissä kasvatusolosuhteissa, johon on lisätty esimerkiksi tyypillisiä kasvutekijöitä ja muita pieniä molekyyliä, jotka auttavat uudelleenohjelmoinnissa.

Innovaatio IPS-soluista pohjautuu kolmeen havaintoon, joista ensimmäinen oli havainto siitä, että erilaistuneilla soluilla on sama geneettinen informaatio kuin alkion soluilla. Briggs & King 1952 osoittivat tumansiirtoa käyttäen, että sammakkojen erilaistuneilla soluilla on tarvittava geneettinen materiaali sammakkojen kloonaukseen. Toinen havainto syntyi pluripotenttien solulinjojen kehittämisestä teratokarsinomasoluista. Kun kyseiset syöpäsolut fuusioitiin somaattisten solujen kanssa, ilmensivät hybridisolulinjat teratokarsinomasolujen ominaisuuksia, ja puolestaan somaattisten solujen ominaisuudet olivat hiljentyneinä (Miller & Ruddle 1976). Pluripotentin tilan suosiminen viittasi siihen, että teratokarsinomasolujen pluripotenttia tilaa ylläpitävät tietyt liukoiset tekijät, jotka olisi mahdollista tunnistaa. Kolmas löytö oli transkriptiofaktorien avainaseman havaitseminen solujen kohtalon määrittämisessä. Tietyt transkriptiofaktorit pystyivät muuttamaan solujen kohtalon, kun niitä ilmenettiin soluissa, joissa kyseisiä faktoreita ei normaalisti ilmenetty (Stadtfeld & Hochedlinger 2010). Nämä havainnot käynnistivät tutkimuksen transkriptiofaktorien löytämiseen, jotka pystyisivät uudelleenohjelmoimaan erilaistuneet solut monikykyisiksi soluiksi.



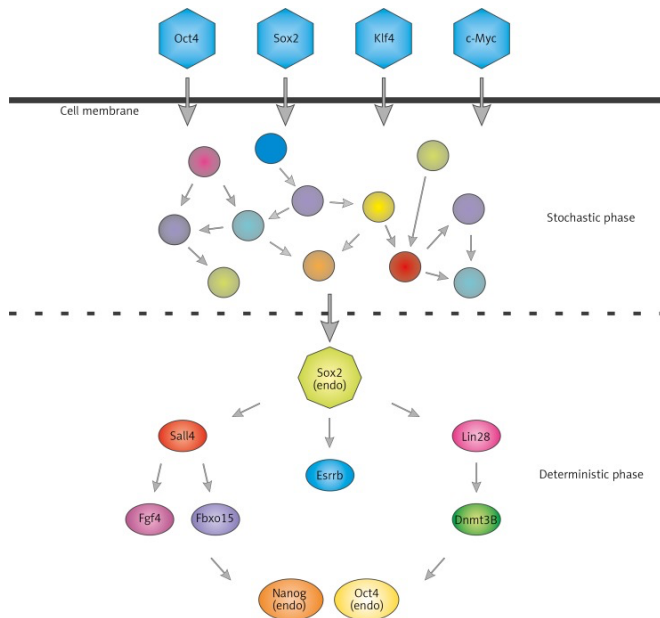
Vuonna 2006 Takahashi & Yamanaka tutkivat 24:n transkriptiofaktorin vaikutusta alkion erilaistumattomissa kantasoluissa ilmentyvän *Fbxo15*-geenin aktivaatioon, ja havaitsivat, että 24:n transkriptiofaktorin pooli sai aikaan kyseisen geenin aktivaation. Tämän havainnon jälkeen he selvittivät, mitkä transkriptiofaktoreista olivat välttämättömiä pluripotentialle tilalle poistamalla aina yhden faktorin kerrallaan. He huomasivat lopulta, että ainoastaan neljällä transkriptiofaktorilla saavutettiin pluripotentialien kantasolujen kaltainen tila hiiren fibroblastisoluilla. Kyseiset transkriptiofaktorit ovat Oct3/4, Sox2, Klf4 ja c-Myc, joita alettiin myöhemmin kutsua Yamanaka-faktoreiksi. Kuitenkin tämän löydön jälkeen vuonna 2007 Thomson ym. osoittivat, että myös Oct3/4-, Sox2-, Nanog - ja Lin28-transkriptiofaktoreilla saatiin indusoitua ihmisen fibroblastien uudelleenohjelmointi.

Yamanaka faktoreista c-Myc on transkriptiofaktori, jota koodaa Myc perheen proto-onkogeeni *myc*. c-Myc edistää solujen proliferaatiota solun normaalissa toiminnassa, minkä vuoksi mutatoitunut *myc* toimii onkogeeninä ja liittyy myös monien syöpien syntyn. c-Myc toimii uudelleenohjelmoinnin alkuvaiheessa aktivoimalla histoneita asetyloivan histoniasetyylitransferaasi-entsyymin (Soufi ym., 2012). Asetylaatio puolestaan avaa kromatiinirakennetta ja siten helpottaa RNA-polymeraasin toimintaa transkription aikana, jolloin indusointia edistävien geenien ekspressio kasvaa. Kromatiinin avaus lisää myös Oct4- ja Sox2-transkriptiofaktorien kiinnittymistä DNA:han.

Klf4 kuuluu Klf perheen koodaamiin transkriptiofaktoreihin, ja toimii sekä alkuvaiheessa että myöhemmässä vaiheessa indusointia. Polo ym. 2012 osoittivat, että Klf4 estää solujen uudelleenohjelmoinnin indusoinnin alkuvaiheessa inhiboimalla uudelleenohjelmointiin erikoistuneiden geenien toimintaa. Myöhemmässä vaiheessa Klf4 edistää indusointia aktivoimalla pluripotentialiudelle tärkeitä genejä kuten *Nanog*-geeniä, mikä tapahtuu p53-kasvunrajoitegeenin ekspressiota vähentämällä.

Sox2 kuuluu Sox perheen transkriptiofaktoreihin, ja toimii ainoana transkriptiofaktorina jokaisessa indusoinnin vaiheessa. Alkuvaiheessa toimii eksogeeninen Sox2 ja myöhemmässä vaiheessa toimii endogeeninen Sox2 kuten kuvassa 1 näkyy. Endogeeninen Sox2 aktivoi SALL4-transkriptiofaktorin ja LIN28-RNA:ta sitovaan proteiiniin (Buganim ym. 2012). Buganim ym. 2012 havaitsivat myös, että SALL4 aktivoi FGF4-kasvutekijän sekä *Fbxo15*-proteiinin, ja LIN28 puolestaan aktivoi DNMT3B-metyylitransferaasin. SALL4 johtava signaalintireitti saa aikaan *Nanog*-kasvutekijän ilmentymisen, kun taas LIN28 aktivoi endogeenisen Oct3/4 ilmentymisen. Oct3/4-transkriptiofaktori on

osa POU perheen koodaamia transkriptiofaktoreita. Oct3/4 aktivoi kantasolujen uusiutumista ylläpitävien ja pluripotentiudelle tärkeiden geenien toimintaa sekä estää erilaistumiseen liittyvien geenien toimintaa. Oct3/4 on tärkeä transkriptiofaktori, koska se pysyy sitoutumaan myös tiukemmin pakattuun kromatiiniin.



Kuva 2. Yamanaka faktorien vasteet kohdesolussa.

(Kulcenty ym., 2015)

### 3.1 Kasvutekijät

Yamanaka-faktorit vuorovaikuttavat keskenään, mutta myös kasvutekijöiden kanssa tehostaen indusoinnin tehokkuutta. Kasvutekijät edistävät solun proliferaatiota ja lisäävät indusoinnin yhteydessä Yamanaka-faktorien ja muiden tärkeiden transkriptiofaktorien määrää solussa aktivoimillaan signaalireiteillä. Tunnettu kasvutekijä uudelleenohjelmoinnissa on LIF eli leukemian vaimennustekijä, joka kuuluu IL-6 perheen sytokiineihin. LIF edistää uusiutumista ja estää erilaistumista aktivoimalla Jak-Stat3 signaalireitin ja stimuloimalla PI3K:n eli fosfoinositodi3-kinaasin toimintaa, mikä puolestaan edistää kantasolun jakautumista ja kasvua. LIF sitoutuu LIF-reseptoriin muodostaen heterodimeerin gp130-membraaniproteiinin kanssa, mikä johtaa Jak:n fosforylaatioon ja akti-

vaatioon, jolloin myös Stat3 ja PI3K fosforyloituu (Niwa ym. 2009). Jak-Stat3 signaalireitti lisää Klf4 ja Sox2 määrää, kun taas PI3K lisää c-Myc- ja Nanog-transkriptiofaktorien määrää. Jak-Stat3 signaalireitin on todettu edistävän indusointia hiiren soluissa, mutta ei ihmisen soluissa, kun taas PI3K reitti vahvistaa indusointia molemmissa soluissa.

Toinen indusointia edistävä kasvutekijä on FGF eli fibroblastinen kasvutekijä, joka vaikuttaa tyrosiinikinaasireseptorien välityksellä. FGF:n sitoutumisen myötä reseptori dimerisoituu ja autofosforyloituu, mikä aktivoi PI3K-Akt ja MAPK-Erk signaalireitin. MAPK-Erk reitissä reseptorin yhteyteen muodostuu myös SHP2-, Grb2- ja SOS-proteiinien muodostama kompleksi, joista SOS on osa GEF eli guanine exchange faktoria (Overmeyer & Maltese, 2011). GEF aktivoi Ras-GTP:aasin, joka indusoi signaalireitin kinaasien fosforylaation ja aktivaation, mikä puolestaan lisää Nanog-transkriptiofaktorin ekspressiota, ja siten ylläpitää pluripotenttia tilaa. PI3K-Akt signaalireitti taas toimii mTOR-proteiinin kautta, joka säätelee Sox2-, Nanog- ja Oct4-transkriptiofaktorien ilmenemistä. Lisäksi mTOR:n on todettu estävän ihmisen pluripotentteja kantasoluja erilaistumasta alkiokerroksiksi.

## 3.2 *Yamanaka-faktorien siirtotekniikat soluun*

### 3.2.1 Virusvektorit

Virusvektorit ovat Yamanaka-faktorien siirrossa eniten käytetty tekniikka, ja viruksista usein käytössä ovat retrovirukset ja adenovirukset. Virusvektoreiden käyttö perustuu viruksen geneettiseen muokkaukseen, jossa poistetaan infektiota aiheuttavat tekijät ja usein viruksen replikaatioon vaadittavat tekijät. Tämän lisäksi viruksen genomiin on liitetty Yamanaka-faktoreita koodaavat geenit, jotka siirtyvät viruksen kautta somaattisiin soluihin. Retrovirukset ovat paljon käytettyjä IPS-solujen tuotannossa korkeammasta transduktiotehokkuudesta johtuen. Adenovirukset eivät ole yhtä tehokkaita Yamanaka-faktorien siirrossa, mutta saavat uudelleenohjelmoinnin aikaan ilman kohdesolun genomien muokkausta toisin kuin retrovirukset, jotka integroivat genominsa kohdesolun genomiin. Genomin integroituminen kohdesoluun voi laukaista mutageneesin, minkä vuoksi ei-integroituvat menetelmät ovat solujen kannalta turvallisempia.

### 3.2.2 DNA- ja lähetti-RNA-menetelmät

Kun Yamanaka-faktorit siirretään ilman virusvektoria, puhutaan transfektiosta. Transfektiossa vektorina voidaan sen sijaan käyttää plasmidi-DNA:ta, jolloin siirretty DNA ei integroidu osaksi kohdesolun genomia. Plasmidi-DNA voi olla esimerkiksi episomaalinen plasmisi, joka sisältää replikaation aloituskohdan, ja pystyy siten kahdentumaan kohdesolussa. Indusoinnissa on käytetty myös minirengasvektoreita, jotka sisältävät Yamanaka-faktorit, eukaryoottisen promootorialueen sekä säätelysekvenssit, ja ainoastaan lyhyen segmentin prokaryootti-DNA:ta (Alves ym. 2021). DNA-vektorien lisäksi solut voidaan transfektoida Yamanaka-faktoreita koodaavalla lähetti-RNA:lla, joka on muihin menetelmiin verrattuna hyvin tehokas.

Plasmidi-DNA voidaan transfektoida soluun mekaanisesti partikkelipommituksella, jossa DNA:lla päällystettyjä partikkeleita ammutaan kohdesoluihin. Toisaalta sekä plasmidi-DNA että lähetti-RNA voidaan siirtää mekaanisesti soluun korkeajännitteisen sähkövirran avulla. Menetelmää kutsutaan elektroporaatioksi, joka tuottaa solukalvoon pieniä reikiä, ja siten lisää solukalvon läpäisevyyttä vieraille molekyyille. Transfektio voidaan toteuttaa myös kemiallisesti esimerkiksi kationisilla polymeereilla, jotka pakkaavat Yamanaka-faktoreita koodaavan DNA:n tai lähetti-RNA:n kationisen polymeerin ympäröimäksi nanopartikkeliksi. Kationiset nanopartikkelit siirtyvät soluihin elektrostaattisten vuorovaikutusten vaikutuksesta negatiivisesti varatun solukalvon kanssa.

### 3.2.3 Transposonit

Liikkuvat elementit eli transposonit ovat DNA-sekvenssejä, jotka pystyvät liikkumaan genomissa paikasta toiseen mekanismeilla, jotka eroavat homologisesta rekombinaatiosta. Yamanaka-faktorien siirrossa on käytetty kahta transposonipohjaista menetelmää, jotka ovat Piggybac- ja Sleeping Beauty -menetelmä. Molemmissa menetelmissä käytetään DNA-transposoneja, joissa transposonien liikkuminen eli transpositio tapahtuu leikkaa ja liitä -mekanismilla. Transpositio perustuu transposonin päissä oleviin käänteisiin toistojaksoihin, joiden välissä siirrettävät Yamanaka-faktorit sijaitsevat. Yamanaka-faktorit sisältävä transposoni saadaan siirrettyä kohde-DNA:han transposaasi-entsyymin avulla, joka katalysoi transposonin integraation kohdesolujen genomiin.

Transposonipohjaiset Piggybac- ja Sleeping Beauty -menetelmät vaativat toisin sanoen plasmidin, joka sisältää transposonin, ja plasmidin, joka sisältää transposaasia koodaavan geenin. Uudelleenohjelmoitavat solut transfektoidaan molemmilla plasmideilla, jolloin Yamanaka-faktorit siirtyvät transposition kautta genomiin. Uudelleenohjelmoinnissa transposaasi on joko hyperaktiivinen Sleeping Beauty -transposaasi tai Piggybac -transposaasi. Sleeping Beauty -transposaasin geeninsiirtotehokkuus on korkeampi kuin Piggybac -transposaaissa. Lisäksi Sleeping Beauty -transposaasi on turvallisempi, sillä Piggybac -transposonilla on taipumus integroitua transkription säätelyalueille, mikä voi johtaa esimerkiksi geenien inaktivoitumiseen tai mutatoitumiseen (Grabundzija ym. 2013). Transposonipohjaiset menetelmät ovat kuitenkin kokonaisuudessaan yksinkertaisia ja tehokkaita geeninsiirtomenetelmiä.

#### 3.2.4 Proteiineihin perustuvat menetelmät

Proteiineihin perustuvia menetelmiä on rajoittanut proteiinien kyky ylittää puoliläpäisevä solukalvo. Yamanaka-faktorit on kuitenkin onnistuttu siirtämään somaattisiin soluihin CPP:n eli solukalvon läpäisevän peptidin avulla (Kim ym. 2009). Kyseisessä menetelmässä hyödynnetään rekombinanttiproteiineja, joissa kukin indusoiva proteiini on fuusioitunut CPP:n kanssa. Toinen solukalvon läpi proteiineja kuljettava peptidi on proteiinin transduktiodomeiini eli PTD. Rekombinanttiproteiinien tuotanto tapahtuu usein *Escherichia coli* -bakteerissa, jonka jälkeen proteiinit puhdistetaan ja siirretään somaattisiin soluihin. Proteiineihin perustuvien menetelmien tehokkuus on kuitenkin muihin menetelmiin verrattuna hyvin heikko, minkä vuoksi usein muita menetelmiä suositaan proteiinien sijaan.

## 4 IPS-SOLUJEN KÄYTTÖ LÄÄKETIETEESSÄ

IPS-soluja on käytetty laajasti viimeisen vuosikymmenen ajan lääketieteellisessä tutkimuksessa, sillä IPS-solut pystyvät uusiutumaan ja erilaistumaan kaikiksi aikuisen solutyypeiksi. Indusoinnilla tehty muutos geenitoimintaan on soluperiytyvää, minkä vuoksi myös IPS-solujen jakautuessa syntyy IPS-soluja, mikä tekee indusoinnista alkion kantasoluille vaihtoehdoisen menetelmän tuottaa uusia kantasoluja lääketieteelliseen käyttöön. Toisaalta IPS-soluja käyttämällä voidaan luoda potilaan omista soluista potilasspesifisiä

soluja, jotka ottavat huomioon potilaan perimän ja siten vähentävät esimerkiksi hylkimisreaktioiden riskiä, mikä on etu muihin kantasoluhoidoihin verrattuna. IPS-soluilla on terapeuttista potentiaalia jopa elinsiirroissa, sillä luovutettavia elimiä on hyvin rajallinen määrä. IPS-solujen kyky uusida ja korvata kudosta luo mahdollisuuksia soluterapioihin sekä elinsiirtoihin.

#### 4.1 Tautimallinnus

IPS-soluilla on mahdollisuuksia toimia monenlaisten sairauksien tautimalleina. IPS-solujen ominaisuuksiin kuuluu solujen uusiutuminen, minkä vuoksi myös tautimallien solut uusiutuvat. Lisäksi IPS-soluilla on samat geneettiset mutaatiot kuin potilaalla, jolta solut on kerätty, minkä takia IPS-soluista tehdyt potilasspesifiset mallit ilmentävät potilaalle tai taudille tyypillisiä fenotyyppiä. IPS-solujen etuna on myös niiden kyky ilmentää taudille tyypillistä patofysiologiaa kuten Torrent ym. 2015 osoittivat Parkinsonin taudin kohdalla. He osoittivat, että Parkinsonin tautia sairastavilta potilailta erilaistetut neuronit ilmensivät taudille ominaista mitokondrion heikentyntä toimintaa, oksidatiiviseen stressiin liittyvien geenien ekspression kasvua sekä  $\alpha$ -synukleinin aggregaatiota. Geneettisesti ihmisestä poikkeavat eläinmallit eivät usein anna todenmukaista kuvaa ihmisen fysiologisista muutoksista ja siten taudin molekulaarisista mekanismeista.

IPS-soluja on käytetty laajalti 2D-tautimalleissa, sillä 2D-mallit ovat 3D-malleihin verrattuna yksinkertaisempia, edullisempia ja helpommin ylläpidettävissä. Kuitenkin 2D-malleissa ongelmana on, etteivät solut kasva 2D-ympäristössä *in vivo*, ja 2D-ympäristössä esimerkiksi vuorovaikutukset muiden solujen ja soluväliaineen kanssa ovat puutteellisia. Lisäksi erityisesti 2D-malleissa IPS-soluista erilaistuneiden solujen kypsyysaste on usein aikuisen soluja alhaisempi. Baxter ym. 2015 osoittivat, että IPS-soluista erilaistuneet maksan hepatosyyttisolut osoittivat enemmän epäkypsiä piirteitä kuin aikuisen solun kaltaisia piirteitä käytettäessä 2D-mallia, mikä puolestaan voisi viitata 2D-mallien soveltuvuuteen varhaisemman iän sairauksissa. Kuitenkin IPS-soluista erilaistuneilla hermosoluilla on mallinnettu onnistuneesti aikuisten sairauksista esimerkiksi neurodegeneratiivisia eli hermostoa rappeuttavia sairauksia kuten Parkinsonin tautia sekä Alzheimeria. IPS-soluilla on mallinnettu myös sydänlihassairauksista oikean kammion arytmogeenista kardiomyopatiaa käyttäen IPS-soluista erilaistuneita sydänlihassoluja.

IPS-soluja hyödyntävä 3D-mallinnus luo puolestaan tulevaisuudelle suurta potentiaalia, sillä kyseinen malli tuottaa todenmukaisemman *in vitro* -ympäristön soluille. IPS-soluista luodut 3D-mallit eli organoidiviljelmät saadaan aikaan erilaistamalla IPS-solut halutuksi solulinjaksi, minkä jälkeen solut siirretään 3D tukirakenteeseen kuten hydrogeeliin. Hydrogeeli on runsaasti vettä sitonut polymeeriverkko, joka tekee soluille soluväliainetta muistuttavan kasvualustan, jossa solut pystyvät vuorovaikuttamaan sekä toistensa että soluväliaineen kanssa. IPS-soluista luotuja hydrogeelipohjaisia organoideja käytetään esimerkiksi luustolihasia vahingoittavien sairauksien molekulaaristen mekanismien tutkimisen (Pinton ym. 2023), sillä monet letaalit sairaudet vaikuttavat luustolihasiin.

## 4.2 Lääkekehitys

Lääkekehitys on pitkä ja monivaiheinen prosessi, missä yli 90 % lääkkeistä ei läpäise klinisiä testejä (Yu ym. 2013). Eläinmalleilla testatuista lääkkeistä vain noin 6 % todetaan turvallisiksi ja tehokkaiksi, minkä lisäksi eläinmallit ovat todella kalliita verrattuna *in vitro*-malleihin. Lääkkeiden sietotasoissa on myös eroja, sillä esimerkiksi hiiren on todettu sietävän noin kymmenenkertaisesti paremmin 37 % lääkkeistä verrattuna ihmiseen (Rajamohan ym. 2013). Tämän takia, vaikka lääke olisi turvallinen ja tehokas eläimillä, voi se silti olla jopa vaarallinen ihmisille. Esimerkiksi talidomidi todettiin eläinkokeissa turvallisiksi, mutta aiheutti vakavia kehityshäiriöitä ihmisille.

IPS-solut luovat ratkaisuja eläinmalleja koskeviin ongelmiin. Iso syy miksi vain pieni osa eläinmalleilla testatuista lääkkeistä läpäisee kaikki kliiniset kokeet, ovat geneettiset erot ihmisen ja eläimen välillä. Toisaalta myös ihmisten geneettiset variaatiot yhdessä ympäristötekijöiden ja epigeneettisten tekijöiden kanssa voivat johtaa erilaisiin ja epätoivottuihin lääkevasteisiin. IPS-soluista luotuja potilasspesifisiä soluja voidaan tutkia myös farmakogeneettisestä näkökulmasta, jolloin yksilön perimä ja esimerkiksi geneettiset mutaatiot huomioidaan minimoidakseen epätoivotut lääkevasteet ja maksimoiden lääkkeen tehokkuus. Potilasspesifit solut ovat lupaavia myös yksilöllisen lääkehoidon kehittämisessä ja toisaalta lääkkeen tehokkuuteen vaikuttavien geenivarianttien löytämisessä.

#### 4.2.1 Neurodegeneratiiviset sairaudet

Neurodegeneratiiviset sairaudet ovat etenkin ikääntyvien ihmisten ongelma, ja esimerkiksi Parkinsonin taudista kärsii yli 10 miljoonaa ihmistä ympäri maailman. Johtuen puutteellisesta ymmärryksestä tautien molekulaarisiin mekanismeihin ei neurodegeneratiivisiin sairauksiin ei ole parannuskeinoja. Kuitenkin IPS-soluja on pystytty hyödyntämään niin taudin mekanismien kuin myös potentiaalisten lääkkeiden tutkimuksissa. Peng ym. 2013 tutkivat 44:n jyrksijöillä toimiviksi todettujen yhdisteiden hermosoluja suojaavia vaikutuksia Parkinsonin taudissa. Vaikutuksia tutkittiin dopaminenergisiksi hermosoluiksi erilaistuneilla soluilla, jotka ovat tärkein dopamiinin lähde nisäkkäiden keskushermostossa, ja kyseisten hermosolujen tuhoutumisesta johtuvaa dopamiinivajetta pidetään Parkinsonin taudin kehittymisen taustalla. Peng ym. 2013 havaitsivat, että ainoastaan 16:ta yhdisteellä oli hermosoluja suojaava vaikutus IPS-soluista tuotetuilla hermosoluilla, vaikka kaikilla 44 yhdisteillä oli aiemmin havaittu olevan hermosoluja suojaavia ominaisuuksia jyrksijöillä. Tämä havainto tukee IPS-solupohjaisten mallien käyttöä lääkekehityksessä, ja ihmisen solulinjan käytön merkitystä tehokkaan lääkkeen löytämiseksi Parkinsonin tautiin.

#### 4.2.2 Sydämen rytmihäiriöt

Sydämen rytmihäiriöt eli rytmien poikkeavuudet ovat yleinen vaiva, johon altistavat esimerkiksi stressi, valvominen ja liiallinen alkoholin käyttö. IPS-soluista erilaistuneilla sydänlihassoluilla on tutkittu lääkkeitä rytmihäiriöiden hoitoon. Yokoo ym. 2009 havaitsivat, että IPS-sydänlihassolujen ja alkion kantasoluista erilaistuneiden sydänlihassolujen supistumiskyky ja lyöntitiheys reagoivat sydänsairauksien hoidossa käytettyihin lääkkeisiin samankaltaisesti. Koska IPS-sydänlihassolut osoittautuivat toimivaksi menetelmäksi lyöntitiheyden ja supistumiskyvyn tutkimiseen, voitaisiin IPS-soluja käyttää myös yksilöllisen hoidon kehittämiseen rytmihäiriötä sairastavalle. Rytmihäiriölääkkeissä kuten muissakin lääkkeissä ongelmana on ollut löytää potilaalle sopivaa lääkettä, koska sama lääke ei toimi halutulla tavalla kaikilla potilailla. Tätä vasten potilaan perimän huomioivat potilasspesifit IPS-sydänlihassolut voisivat mahdollistaa toimivan ja turvallisen rytmihäiriölääkkeen löytämisen.



IPS-sydänlihassoluja on hyödynnetty myös katekoliamiiniherkän polymorfisen kammiotakykardian eli CPTV:n ja pitkän QT-oireyhtymän lääkekehityksessä. CPTV on harvinainen periytyvä sydänsairaus, jossa sarkoplasmakalvostosta vapautuu poikkeuksellisesti kalsiumioneja diastolisessa vaiheessa, mikä johtaa rytmihäiriöihin. Jung ym. 2012 havaitsivat, että hypertermiaan käytetty dantroleeni palautti potilasspesifeillä IPS-lihasoluilla kalsiumionien normaalin vapautumisen, ja siten vähensi rytmihäiriöitä. Toisaalta Itzhaki ym. 2011 käyttivät IPS-soluja tutkiakseen pitkää QT-syndroomaa, missä natrium- ja kaliumkanavat toimivat epätavallisesti. He huomasivat, että tutkimistaan yhdisteistä kaliumkanavia estävät yhdisteet pahensivat tautia ja kalsiumkanavien toimintaa estävät yhdisteet lievensivät taudin vaikutuksia. Molemmat tutkimukset osoittivat, että IPS-soluilla on mahdollista luoda rytmihäiriöitä muistuttava fenotyyppi, joka mahdollistaa sairauksien lääkekehityksen.

### *4.3 Toksisuustestit*

Lääkekehityksessä lääkkeen toksisuus tai huono tehokkuus ovat yleisimpiä syitä miksi lääke ei läpäise kliinisiä testejä. Toksisuustesteissä määritetään yhdisteen myrkyllisyys ja vaikutukset biologisiin toimintoihin. Testeissä on perinteisesti käytetty eläinmalleja, syöpäsolulinjoja tai geneettisesti manipuloituja kuolemattomia solulinjoja, mutta ongelmanna ovat olleet erot solujen toiminnoissa, koska normaaleilta soluilta puuttuvat kyky jakautua loputtomasti. Koska IPS-soluista tuotetut solut jäljittelevät paremmin normaalia kudosta, pystytään IPS-soluja hyödyntämään myös lääkkeiden toksisuuden määrittämisessä.

#### *4.3.1 Neurotoksisuus*

Neurotoksiset yhdisteet eli hermoston rakenteelle tai toiminnalle haitalliset yhdisteet ovat kasvava ongelma yhteiskunnassa kemikaaleille altistumisen myötä. Pei ym. 2016 tutkivat neurotoksisuutta aiheuttavien yhdisteiden ja potentiaalisesti neurotoksisuutta aiheuttavien yhdisteiden vaikutuksia IPS-soluilla sekä IPS-soluista erilaistuneilla hermo-

solun kantasoluilla, hermosoluilla sekä astrosyyttisoluilla. He antoivat jokaista yhdistettä 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  ja 100  $\mu\text{M}$  konsentraatioissa ja selvittivät vasteiden eroja solutyyp-  
pien ja annoskoiden välillä. 80:stä yhdisteestä 50:llä oli merkittäviä sytotoksisia vaikutuksia ainakin yhdessä solutyypissä, kun taas neljä yhdistettä osoitti sytotoksisuutta kaikissa solutyypeissä. Kuitenkin solutyypistä ja annetusta konsentraatiosta riippuen syto-  
toksisten vaikutuksen vahvuus vaihteli näillä neljällä yhdisteellä, mikä osoitti toksisuuden vertailun solutyyp-  
pien välillä hyvin tärkeäksi. Koska solutyyp-  
pien toksisten vaikutuksen selvittämiseen ja toksisten vaikutusten vertailemiseen.

#### 4.3.2 Kardiotoxisuus

Kardiotoxisuudella tarkoitetaan esimerkiksi lääkkeiden aiheuttamaa sydänlihaksen va-  
jaatoimintaa. Kardiotoxisuutta määrittäessä on yleisesti käytetty CHO-solulinjaa (Chi-  
nese hamster ovary-cell line) tai HEK-solulinjaa (Human embryonic kidney-cell line),  
joiden käyttö perustuu solulinjojen geneettiseen muokkaukseen. CHO- ja HEK-solulin-  
jat eivät kuitenkaan kuvaa sydänlihaksen biokemiallisia ominaisuuksia täysin toden-  
maukaisesti johtuen solulinjojen geneettisistä eroista ja poikkeavasta ionikanavien eks-  
pressiosta ihmisen sydänlihassoluihin verrattuna. IPS-soluista erilaistuneet sydänlihas-  
solut sen sijaan ilmentävät monia ihmisen sydänlihakselle ominaisia toimintoja kuten  
tyypillistä supistumiskykyä. Erilaistuneiden sydänlihassolujen on myös osoitettu reagoi-  
van sydän- ja verisuonilääkkeisiin samankaltaisesti kuin alkion kantasolut, mikä on teh-  
nyt IPS-soluista päteviä *in vitro* -malleja kardiotoxisuuden määrittämiselle (Laustriat  
ym. 2010).

Kardiotoksisia vaikutuksia ovat esimerkiksi reaktiivisten happiradikaalien syntyminen,  
apoptoosi ja sydämen rytmihäiriöt. Kardiotoxisuuden määrittäminen kuuluu osaksi sydän- ja  
verisuonisairauksien lääkekehitystä sekä joidenkin syöpähoitojen kehitykseen. Syöpä-  
hoidoissa käytetyt tyrosiinikinaasi-inhibiittorit ovat esimerkki lääkkeistä, joiden syto-  
toksisia vaikutuksia on tutkittu IPS-soluilla. Osassa syövästä tyrosiinikinaasit toimivat  
liian aktiivisina, minkä vuoksi inhibiittorit ovat toimiva hoitomuoto. Tästä huolimatta  
inhibiittorien sivuvaikutukset ovat kardiotoksisia. Sharma ym. 2017 osoittivat IPS-so-  
luista erilaistuneiden sydänlihaksen endoteelisolujen ja fibroblastien toimivan tyrosiini-

kinaasi-inhibiittorien kardiotoksisten vaikutusten tutkimisessa. He havaitsivat molempien solutyypin ilmentävän kardiotoksisia vaikutuksia altistuessaan tyrosiinikinaasi-inhibiittoreille.

#### 4.3.3 Hepatotoksisuus

Hepatotoksisuudella viitataan maksan vaurioitumiseen tai vajaatoimintaan kemikaalien vaikutuksesta, ja lääkkeiden aiheuttama maksavaurio (drug-induced liver injury) on yleisin syy maksan vajaatoiminnalle. Lääkkeiden aiheuttama maksavaurio on myös yksi yleisimmistä syistä lääkkeiden takaisinvetoon myynnistä. Hepatotoksisuustesteissä on käytetty tarkasti leikattuja maksapaloja (precision-cut liver slices) ja kuolemattomia solulinjoja kuten HepaRG-solulinjaa, mutta ongelmana ovat olleet, etteivät mallit ole osoittaneet ihmisen metabolisia reaktioita todenmukaisesti. Tätä vasten primääriset hepatosyyttisolut eli suoraan maksasta eristetyt hepatosyyttisolut ovat toimineet pätevinä *in vitro* -alustoina esimerkiksi lääkkeiden biotransformaation tutkimiselle, ja siten hepatotoksisten vaikutusten tutkimiselle. Primäärinen hepatosyyttisolujen eristäminen on kuitenkin rajallista.

Sen sijaan IPS-soluista erilaistuneilla hepatosyyttisolulla on havaittu olevan primääristen hepatosyyttien kaltaisia ominaisuuksia, ja tavallisista primäärisistä hepatosyyteistä poiketen IPS-hepatosyyttien tuottaminen on tehokkaampaa. Primäärinen hepatosyyttien ominaisuuksista esimerkiksi glukoosin varastoitumista, urean tuotantoa ja veren albumiinin ekspressiota on havaittu IPS-hepatosyyteillä (Choi ym. 2013). Szkolnicka ym. 2014 hyödynsivät primääristen hepatosyyttien kaltaisia IPS-hepatosyyttejä, ja osoittivat, että lääkkeiden aiheuttamaa maksavauriota on mahdollista mallintaa IPS-hepatosyyteillä. Tutkimus osoittaa, että IPS-hepatosyyteillä pystytään tutkimaan hepatotoksia vaikutuksia lääkkeiden aiheuttamassa maksavauriossa tuottamalla potilasspesifisiä IPS-hepatosyyttejä.

#### 4.4 Soluterapiat

IPS-solujen käyttö laajentuu myös regeneratiiviseen lääketieteeseen, jossa korvataan tai elvytetään solujen, kudosten ja elinten normaalia toimintaa. IPS-solut saadaan erilaistumaan halutuiksi soluiksi, jotka puolestaan voidaan siirtää esimerkiksi vaurioituneeseen kudokseen. Kuitenkaan IPS-soluja ei vielä käytetä aktiivisesti sairauksien hoidossa toisin kuin kantasoluhoidoja, jotka ovat tehokkaita hoitomuotoja esimerkiksi leukemiassa. IPS-solujen käyttöön liittyy vielä haasteita esimerkiksi riittävän toiminnallisuusasteen saavuttamisessa kuin myös kasvaimen muodostumisen riskin pienentämisessä.

#### 4.4.1 Fibroosi

Fibroosilla tarkoitetaan arpeutumista, missä sidekudosta kertyy kudoksen solujen tilalle, mikä johtaa elinten toimintahäiriöihin. Fibroosiin liittyy usein sidekudoksen fibroblastien aktivaatio sekä soluväliaineen proteiinien kertyminen, ja sitä esiintyy usein elimissä, joissa kudokseksi uusiutuu hitaasti. Fibroosiin eli ole parantavaa hoitokeinoa, mutta IPS-solujen kyky uusiutua ja erilaistua luo mahdollisuuksia korvata vaurioitunutta kudosta terveillä soluilla. Esimerkiksi maksa-, sydänlihaski- ja keuhkofibroosiin on tutkittu hoitokeinoja IPS-soluterapioita käyttämällä.

Yan ym. 2014 osoittivat, että hiiriin siirretyt IPS-soluista erilaistuneet alveolien homeostasialle tärkeät 2. tyypin alveoliepiteelisolut ennaltaehkäisivät keuhkofibroosia. He havaitsivat, että kyseiset solut edistivät vaurioituneiden alveolien epiteelisolujen uusiutumista ja siten tukivat hiirten keuhkojen toimintaa. Toisaalta myös sydänlihaski- fibroosissa on todettu olevan positiivisia vaikutuksia IPS-soluja käytettäessä (Suzuki ym. 2021). Tutkimuksessa huomattiin IPS-sydänlihassolujen vähentävän sydänlihaski- fibroosia sydäninfarktin rottamallissa, mutta myös muissa *in vivo*-malleissa on huomattu samankaltaisia ominaisuuksia. Suzuki ym. 2021 havaitsivat, että vaikutukset perustuivat IPS-sydänlihassolujen kykyyn lisätä hiussuonten tiheyttä, ja vähentää hypertrofisten eli paksuuntuneiden sydänlihassolujen määrää. Tutkimusten perusteella IPS-soluhoidoilla voitaisiin korvata fibroosissa vaurioitunutta kudosta, mutta myös ennaltaehkäistä fibroosin syntyä.

IPS-soluja voidaan hyödyntää fibroosin hoidossa myös eristämällä IPS-solujen eksoosomeja eli biomolekyylejä kuljettavia nanovesikkeleit. IPS-soluista eristettyjen ekso-somien on todettu ehkäisevän keuhkofibroosia estämällä tautia indusoivien M2-makro-fagien toimintaa (Zhou ym. 2021). IPS-sydänlihassoluista eristetyt IPS-eksosomit ovat

sen sijaan tukeneet sydänlihassolujen uusiutumista sydäninfarktissa ja siten estäneet sydänlihasfibroosia. Tulosten perusteella IPS-alveoliepiteelisolujen tai IPS-sydänlihassolujen sijaan fibroosin hoitokeinona voitaisiin käyttää myös IPS-pohjaisia eksosomeja (Santoso ym. 2020).

#### 4.4.2 Syöpä

Syöpä on sairaus, missä mikään solusyklin tarkistuspisteistä ei toimi, mikä johtaa solujen kontrolloimattomaan ja rajattomaan jakautumiseen. Kuten normaaleja somaattisia soluja, myös syöpäsoluja on onnistuneesti uudelleenohjelmoitu kantasolujen kaltaiseen tilaan, mikä on mahdollistanut pahalaatuiseen syöpään liittyvien solujen neutraloimisen muuttamatta DNA-sekvenssiä. Utikal ym. 2009 uudelleenohjelmoivat hiiren melanoomasolulinjan soluja IPS-soluiksi, jotka injektioitiin hiiren blastokystiin. Blastokystistä kasvatettiin hiirialkioita, ja alkioista kimeerisiä hiiriyksilöitä, joilla ei havaittu kasvaimia. Tulos viittaisi siihen, että syöpäsoluista uudelleenohjelmoidut solut erilaistuisivat normaalisti, mikä puolestaan osoittaa IPS-solujen toimineen pahalaatuisten syöpäsolujen ennallistamisessa.

Lupaavia tuloksia on saatu myös esimerkiksi ihmisen keuhkosityövän, eturauhassyövän ja tukikudossyövän solulinjoista. Pahalaatuisia kasvaimia aiheuttavat solut uudelleenohjelmoitiin IPS-soluiksi, jotka puolestaan saatiin erilaistumaan halutuksi kudokseksi. Eri-laistuneilla soluilla oli huomattavasti pienempi riski muodostaa kasvaimia kuin alkuperäisillä solulinjoilla. Lisäksi normaaleista somaattisista soluista tuotetuilla IPS-soluilla on osoittautunut olevan terapeuttisia ominaisuuksia. Alaa El-Din ym. 2019 havaitsivat, että IPS-solujen injektio sylkirauhasten okasolusyöpää sairastaville rotille lisäsi sylkirauhasten uusiutumista. Tutkimukset osoittavat, että IPS-soluja voitaisiin käyttää mahdollisten syöpähoitojen kehittämiseen.

### 4.5 *Geeniterapiat*

IPS-solujen geneettinen muokkaus on avannut mahdollisuuksia sairauksien parannukseen. IPS-solujen muokkaukseen on käytetty CRISPR-Cas9-muokkausmenetelmää,

joka perustuu bakteerista peräisin olevaan Cas9-endonukleaasiin, jolla on kyky katkaista kohdesekvenssi nukleotidin tarkkuudella. Ohjain-RNA (sg-RNA) sitoutuu muokkauksen kohteena olevaan komplementaariseen sekvenssiin, jolloin endonukleaasi pystyy kiinnittyä DNA:han. Menetelmä mahdollistaa sekvenssien poistamisen, jolloin saadaan indusoitua lukukehysmutaatiota ei-homologisessa katkoskohtien korjauksessa. Kuitenkin myös nukleotidien lisäämisen tai korvaamisen ovat mahdollisia, kun korjauksen yhteydessä lisätään katkaisualueen kanssa osittain homologinen templaatti. Tätä tapahtumaa kutsutaan homologian ohjaamaksi korjaukseksi. Menetelmällä voidaan luoda sairaudelle altistavia mutaatiota tai korjata potilasspesifien IPS-solujen sairautta aiheuttavia mutaatiota isogeenisen solulinjan muodostamiseksi, jotka saadaan erilaistumaan terveiksi soluiksi, ja siirrettyä potilaalle taudin parantamiseksi. Toisaalta isogeeninen solulinja on välttämätön kontrollisolulinja tutkimukselle.

#### 4.5.1 Perinnölliset sairaudet

Geneettisesti muokattuja IPS-soluja on tutkittu verenvuototaudeista esimerkiksi hemofilia A:n ja  $\beta$ -talassemian hoitokeinoksi. Hemofilia A on X-kromosomaalinen sairaus, jossa geenimutaatio on kohdistunut FVIII-hyytymistekijää koodaavaan *F8*-geeniin. Mutaatio johtaa hyytymistekijän puutteeseen, minkä seurauksena veri ei hyydy normaalisti ja verenvuodot pitkittyvät. Son ym. 2022 käyttivät *F8*-geenimutaatiolta korjattuja IPS-soluja, jotka injektoidiin hemofiliaa ilmentäviin hiirimalleihin. He havaitsivat, että FVIII-hyytymistekijän aktiivisuus lisääntyi, verenvuodot lyhenivät huomattavasti ja verenvuotojen uusiutuminen väheni. Sen sijaan  $\beta$ -talassemiaa aiheuttaa *HBB*-geenimutaatio, jolloin hemoglobiiniproteiinin  $\beta$ -globuliiniketjun synteesi vähenee, ja johtaa anemiaan. Ou ym. 2016 osoittivat, että mutaatiolta korjatuista IPS-soluista erilaistuneet hematopoeettiset kantasolut pystyivät erilaistumaan punasoluiksi hiirellä, ja syntetisoimaan  $\beta$ -globuliinia.  $\beta$ -globuliinin tasot todettiin hiirissä normaaleiksi eikä kasvaimia havaittu. Tulokset viittaisivat siihen, että homologian ohjaama korjaus olisi mahdollinen hoitokeino kyseisiin sairauksiin.

Muokattuja IPS-soluja on käytetty myös kystisen fibroosin hoitokeinona tutkiessa. Kystinen fibroosi on periytyvä aineenvaihduntasairaus, jonka aiheuttaa CFTR-kloridikanavaa koodaavan *CFTR*-geenin mutaatio. Oireena sairaudessa on kloridi-ionien kertyminen

soluihin, mikä johtaa liman kertymiseen hengitysteihin. CRISPR-Cas9-muokkausmenetelmää käytettiin potilasspesifisten IPS-solujen *CFTR*-mutaation korjaamiseen kystisessä fibroosissa (Firth ym. 2015). IPS-solut erilaistuivat hengitysteiden epiteelisoluiksi, joiden *CFTR*-kanavalle tyypillisen kloridi-ionien kuljetuksen havaittiin palautuneen, mikä osoittaa, että CRISPR-Cas9-muokkausmenetelmän käyttäminen korjasi mutaation, ja voisi toimia tulevaisuudessa hoitomenetelmänä kystiseen fibroosiin.

#### 4.5.2 Immunoterapia syövän hoidossa

Sytotoksiset T-solut toimivat normaalin immuunipuolustuksen hankitussa immuunivasteessa tunnistuen vaurioituneita ja epänormaaleja soluja kuten syöpäsoluja. Syövän immunoterapiassa voidaan käyttää T-solujen T-solureseptoreita, jotka ovat syöpäsolujen antigeeneille spesifisiä. Esimerkiksi leukemiaa sairastavan potilasspesifisistä T-soluista voidaan indusoida IPS-soluja, jotka saadaan erilaistumaan kasvainspesifisiksi T-soluiksi leukemiaa vastaan. Esimerkiksi NY-ESO-1-antigeeniä ilmentäviä leukemiasoluja vastaan on osoitettu merkittävää sytotoksisuutta IPS-soluja käyttämällä (Montel-Hagen ym. 2019). Kuitenkin somaattisen rekombinaation takia ongelmaksi on muodostunut antigeenispesifityden menettäminen osassa IPS-soluissa. CRISPR-Cas9-menetelmällä on onnistuttu hiljentämään IPS-soluista somaattiseen rekombinaatioon osallistuva RAG2-geeni (rekombination activation gene 2), mikä esti uudelleenjärjestäytymistä ja täten ennaltaehkäisi antigeenispesifityden menetystä.

Myös IPS-soluista erialistuneilla NK-soluilla (natural killer cells) on kehitetty immunoterapioita syövän hoitoon, sillä kuten sytotoksiset T-solut myös NK-solut tuhoavat omia epänormaaleja soluja. Sekä sytotoksisia T-soluja että NK-soluja voidaan geneettisesti muokata ilmentämään CAR-reseptoreja, mutta IPS-soluista tuotettuja NK-soluja on helpompi muokata kuin T-soluja. CAR-reseptorit muuttavat solujen antigeenispesifisyyttä, jolloin soluista tulee spesifisiä syöpäsoluissa ilmentyviä antigeenejä kohtaan. Muodostuneet CAR-T-solut ja CAR-NK-solut ovat lisänneet kasvaimen tuhoamista edistävää toimintaa useiden tutkimusten mukaan esimerkiksi lymfoomassa, leukemiassa ja myeloomassa. Myelooman hoidossa hyödyllistä on ollut myös CD38-reseptorin hiljentäminen NK-soluista CRISPR-Cas9-menetelmällä, sillä myeloomasolut ilmentävät kyseistä reseptoria, ja vasta-ainehoidot tuhoavat täten sekä myeloomasoluja että NK-soluja (Ka-

raroudi ym. 2020). CRISPR-Cas9 on tehokkaampi IPS-soluissa kuin tavallisissa soluissa, minkä vuoksi menetelmällä uskotaan olevan terapeuttisia ominaisuuksia myös IPS-NK-soluissa.

#### 4.6 IPS-solujen haasteet ja tulevaisuuden näkymä

Vaikka IPS-solut ovat monella tavalla hyödyllisiä lääketieteessä, liittyy solujen käyttöön ongelmia, jotka tulee tulvaisuudessa ratkaista. Uudelleenohjelmoinnin tehokkuus on vielä alhainen, minkä vuoksi IPS-solujen tuotto on usein hidasta ja eläinmallien tapaan kallista. Esimerkiksi IPS-sydänlihassolujen tuottaminen kestää noin neljä kuukautta, mikä on tehokkaalle sydänlihassolusiirrolle liian pitkä aika. Ratkaisuksi on ehdotettu biopankkeja, jotka sisältäisivät eri HLA-fenotyypeiltä kerättyjä soluja. Biopankit mahdollistaisivat siirtokäykyisten IPS-solujen tuotannon ja toisaalta myös alentaisivat kustannuksia potilasspesifeihin soluihin verrattuna.

Puolestaan Dos Santos ym. 2014 tutkivat uudelleenohjelmoinnin tehokkuuteen ratkaisua, ja havaitsivat, että indusointitehokkuutta pystytään parantamaan lisäämällä Mbd3/Nurd-kompleksin ekspressiota. Mbd3/Nurd-kompleksi eli nukleosomin uudelleenjärjestäytymis- ja deasetylaatiokompleksi on välttämätön alkion kantasolujen pluri-potentiudelle ja uusiutumiseen. Tutkimuksessa todettiin, että Mbd3-komponentin ekspresion vähentäminen heikensi indusointitehokkuutta, ja toisaalta kompleksin ekspresion kasvu lisäsi tehokkuutta. Tämä puolestaan osoitti kompleksin toimivan avainasemassa solujen uudelleenohjelmoinnissa. Tehokkuus on parantunut myös Lin28- tai Nanog-transkriptiofaktorien yhdistämisellä Yamanaka-faktoreihin.

Lääketieteellisestä käyttöä rajoittaa myös indusoinnin aiheuttama kasvaimen muodostumisen riski sekä geneettinen epävakaus. Erilaistumattomina IPS-solujen on todettu aiheuttavan pahalaatuisia kasvaimia *in vivo* -malleissa, minkä vuoksi soluterapioissa haasteena on erilaistuneiden IPS-solujen kontaminoituminen erilaistumattomilla IPS-soluilla, jolloin terapia synnyttäisi riskin syövän kehittymiselle. Yamanaka-faktoreista *c-Myc* ja *Klf4* ovat onkogeenisia, ja ovat useissa syövässä yliekspressoituneina, minkä vuoksi IPS-soluista saattaa kehittyä tuumorigeenisia. Toisaalta myös indusointiin käytetyistä siirtotekniikoista retrovirukset ja transposonit lisäävät riskiä syövän syntymiselle integroidessaan genominsa kohdesoluun. Integraation aikana isäntäsolun genomiin voi



syntyä mutaatioita, mikä johtaa esimerkiksi *c-Myc*-onkogeenin yliekspressioon ja syövän kehittymiseen. Toisaalta *in vitro* -malleissa IPS-solut voivat kerryttää kromosomimutaatioita ja menettää heterotsygoottisuuden. Esimerkiksi Mandai ym. 2017 tutkivat IPS-soluista erilaistuneiden verkkokalvon solujen siirtämistä silmäpohjan rappeumaa sairastavalle potilaalle. Tutkimuksessa toiselle potilaista ei tehty siirtoa johtuen IPS-soluissa havaituista geneettisistä muutoksista.

Kasvaimen muodostumisen lisäksi ongelmana on solulinjojen heterogeenisyys. Tautimallinnukseen ja toksisuustesteihin oleellisena osana kuuluvat kontrolli IPS-solulinjat, joihin on aikaisemmin käytetty samalta sukupuolelta ja samasta suvusta luovutettuja soluja, joissa on kuitenkin ollut paljon variaatiota. Ratkaisuna ongelmaan on kehitetty geneettisesti muokattuja isogeenisiä solulinjoja, missä uutena haasteena puolestaan ovat epäspesifit ja tahattomat muutokset genomissa. Sekä solulinjojen heterogeenisyys että genomien tahattomat muutokset heikentävät IPS-solulinjojen kykyä toimia soveltuvina kontrollisolulinjoina tautimallinnuksessa ja toksisuustestauksessa.

Toisaalta IPS-solujen epäkypsyys tuo haasteita niin tautimallinnukseen, toksisuustesteihin kuin soluterapioiden kehittämiseen. Varhaisemman vaiheen sairauksissa epäkypsät IPS-solut ovat osoittautuneet soveltuviksi tautimalleiksi, mutta useissa aikuisten sairauksissa IPS-solut eivät ole ilmentäneet taudille tyypillisiä ominaisuuksia epäkypsyyden vuoksi. Kypsyyttä on saatu indusoidua esimerkiksi yliekspressoimalla ennen aikaista vanhentumista aiheuttavaa progeriinia ja käyttämällä 3D-malleja 2D-mallien sijaan. Kypsyyttä ei kuitenkaan ole saatu kasvatettua huomattavalla tavalla, minkä vuoksi ongelma tulee vielä ratkaista tulevaisuudessa.

## 5 YHTEENVETO

IPS-solut ovat oleellinen osa tämänhetkistä ja tulevaisuuden lääketieteellistä tutkimusta sekä kehitystä. Yamanakan & Takahashin innovaatio indusoiduista pluripotentista kantasoluista käynnisti aktiivisen tutkimuksen IPS-solujen käyttömahdollisuuksiin niin tautimallinnuksessa kuin soluterapioiden kehityksessä. IPS-soluilla on kyky erilaistua kaikiksi aikuisen solutyypeiksi ja uusiutua kuten alkion kantasoluilla, mikä tekee IPS-soluista vaihtoehtoisen menetelmän kantasolujen tuottamiselle alkion kantasolujen rinnalle. IPS-soluilla on monia etuja verrattuna alkion kantasoluihin, sillä IPS-solut voidaan tuottaa suoraan potilaan soluista, jolloin saadaan aikaan potilasspesifisiä IPS-so-

luja, joilla on myös pienempi riski hylkimisreaktioihin. Toisaalta IPS-solut antavat eettisemmän, ja mahdollisesti tulevaisuudessa tehokkaamman menetelmän kantasolujen tuotantoon.

IPS-soluja on onnistuttu tuottamaan useista eri solutyypeistä kuten maksan hepatosyyttisoluista, sydänlihassoluista, hermosoluista ja lisäksi myös syöpäsoluista. IPS-soluista erilaistuneet solut ovat osoittaneet solutyypeille ominaisia piirteitä, ja erilaistuneista soluista luodut tautimallit sairaudelle tyypillistä patofysiologiaa. Monet tutkimukset ovat korostaneet ihmisen solulinjan käytön merkitystä niin tautimallinnuksessa kuin lääkekehityksessä, minkä vuoksi IPS-solut ovat potentiaalinen vaihtoehto *in vivo* -malleille tulevaisuudessa.

Kantasolut ovat välttämättömiä niin tutkimukselle kuin monien sairauksien hoitoon. Kantasoluhoidot ovat vakiintunut hoitomuoto esimerkiksi leukemian ja muiden vakavien syöpien hoidossa. Kuitenkin sopivien kantasolujen luovuttajia on rajallinen määrä, minkä vuoksi kantasolujen tarve on kasvava, ja uusia menetelmiä kantasolujen saantiin tarvitaan. IPS-soluja on ryhdytty testaamaan hoitomuotona ihmiselle, mutta soluihin liittyy vielä paljon haasteita, jotka tulee ratkaista ennen kuin IPS-soluja voidaan aktiivisesti käyttää sairauksien hoidossa. IPS-solujen käyttö lääkekehityksessä kuin myös solu- ja geeniterapioiden tutkimuksessa on kasvavaa, ja luo tulevaisuuden kannalta potentiaalisen menetelmän sairauksien hoitoon.

## 6 KIRJALLISUUS

- Alaa El-Din, Y., Sabry, D., Abdelrahman, A. H., & Fathy, S. (2019). Potential therapeutic effects of induced pluripotent stem cells on induced salivary gland cancer in experimental rats. *Biotechnic and Histochemistry*, 92-99.
- Alves, C. P. A., Prazeres, D. M. F., & Monteiro, G. A. (2021). Minicircle Biopharmaceuticals—An Overview of Purification Strategies. *Frontiers in Chemical Engineering*, 2673-2718.
- Baxter, M., Withey, S., Harrison, S., Segeritz, C. P., Zhang, F., Atkinson-Dell, R., Rowe, C., Gerrard, D. T., Sison-Young, R., Jenkins, R., Henry, J., Berry, A. A., Mohamet, L., Best, M., Fenwick, S. W., Malik, H., Kitteringham, N. R., Goldring, C. E., Piper Hanley, K., ... Hanley, N. A. (2015). Phenotypic and functional analyses show stem cell-derived hepatocyte-like cells better mimic fetal rather than adult hepatocytes. *Journal of Hepatology*, 581-589.
- Briggs, R., & King, T. J. (1952). Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs' eggs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 455-463
- Buganim, Y., Faddah, D. a, Cheng, A. W., Itskovich, E., Ganz, K., Klemm, S. L., & Oudenaarden, A. Van. (2012). Single-cell gene expression analyses of cellular reprogramming reveal a stochastic early and hierarchic late phase. *Cell*, 1209-1222.
- Chen, G., Yin, S., Zeng, H., Li, H., & Wan, X. (2022). Regulation of Embryonic Stem Cell Self-Renewal. *Life*, 1151.
- Choi, S. M., Kim, Y., Shim, J. S., Park, J. T., Wang, R. H., Leach, S. D., Liu, J. O., Deng, C., Ye, Z., & Jang, Y. Y. (2013). Efficient drug screening and gene correction for treating liver disease using patient-specific stem cells. *Hepatology*, 2458-2468.
- Dos Santos, R. L., Tosti, L., Radziszewska, A., Caballero, I. M., Kaji, K., Hendrich, B., & Silva, J. C. R. (2014). MBD3/NuRD facilitates induction of pluripotency in a context-dependent manner. *Cell Stem Cell*, 102-110.
- Firth, A. L., Menon, T., Parker, G. S., Qualls, S. J., Lewis, B. M., Ke, E., Dargitz, C. T., Wright, R., Khanna, A., Gage, F. H., & Verma, I. M. (2015). Functional Gene Correction for Cystic Fibrosis in Lung Epithelial Cells Generated from Patient iPSCs. *Cell Reports*, 1385-1390.
- Fouse, S. D., Shen, Y., Pellegrini, M., Cole, S., Meissner, A., Van Neste, L., Jaenisch, R., & Fan, G. (2008). Promoter CpG Methylation Contributes to ES Cell Gene Regulation in Parallel with Oct4/Nanog, PcG Complex, and Histone H3 K4/K27 Trimethylation. *Cell Stem Cell*, 160-169.
- Grabundzija, I., Wang, J., Sebe, A., Erdei, Z., Kajdi, R., Devaraj, A., Steinemann, D., Szuhai, K., Stein, U., Cantz, T., Schambach, A., Baum, C., Izsvák, Z., Sarkadi, B.,

- & Ivics, Z. (2013). Sleeping Beauty transposon-based system for cellular reprogramming and targeted gene insertion in induced pluripotent stem cells. *Nucleic Acids Research*, 1829-1847.
- He, S., Nakada, D., & Morrison, S. J. (2009). Mechanisms of stem cell self-renewal. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 377-406.
- Itzhaki, I., Maizels, L., Huber, I., Zwi-Dantsis, L., Caspi, O., Winterstern, A., Feldman, O., Gepstein, A., Arbel, G., Hammerman, H., Boulos, M., & Gepstein, L. (2011). Modelling the long QT syndrome with induced pluripotent stem cells. *Nature*, 225-229.
- Jung, C. B., Moretti, A., Mederos y Schnitzler, M., Iop, L., Storch, U., Bellin, M., Dorn, T., Ruppenthal, S., Pfeiffer, S., Goedel, A., Dirschinger, R. J., Seyfarth, M., Lam, J. T., Sinnecker, D., Gudermann, T., Lipp, P., & Laugwitz, K. L. (2012). Dantrolene rescues arrhythmogenic RYR2 defect in a patient-specific stem cell model of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *EMBO Molecular Medicine*, 180-191.
- Kararoudi, M. N., Nagai, Y., Elmas, E., Pereira, M. de S. F., Ali, S. A., Imus, P. H., Wethington, D., Borrello, I. M., Lee, D. A., & Ghiaur, G. (2020). CD38 deletion of human primary NK cells eliminates daratumumab-induced fratricide and boosts their effector activity. *Blood*, 2416-2427.
- Kim, D., Kim, C. H., Moon, J. Il, 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. *Cell Stem Cell*, 472-476.
- Kulcenty, K., Wróblewska, J., Mazurek, S., Liszewska, E., & Jaworski, J. (2015). Molecular mechanisms of induced pluripotency. *Wspolczesna Onkologia*, 22-29
- Laustriat, D., Gide, J., & Peschanski, M. (2010). Human pluripotent stem cells in drug discovery and predictive toxicology. *Biochemical Society Transactions*, 1051-1057.
- Mandai, M., Watanabe, A., Kurimoto, Y., Hiram, Y., Morinaga, C., Daimon, T., Fujihara, M., Akimaru, H., Sakai, N., Shibata, Y., Terada, M., Nomiya, Y., Tanishima, S., Nakamura, M., Kamao, H., Sugita, S., Onishi, A., Ito, T., Fujita, K., ... Takahashi, M. (2017). Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. *New England Journal of Medicine*, 1038-1046.
- Miller, R. A., & Ruddle, F. H. (1976). Pluripotent teratocarcinoma-thymus somatic cell hybrids. *Cell*, 45-55
- Montel-Hagen, A., Seet, C. S., Li, S., Chick, B., Zhu, Y., Chang, P., Tsai, S., Sun, V., Lopez, S., Chen, H. C., He, C., Chin, C. J., Casero, D., & Crooks, G. M. (2019). Organoid-Induced Differentiation of Conventional T Cells from Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 376-389

- Nava, M. M., Raimondi, M. T., & Pietrabissa, R. (2012). Controlling self-renewal and differentiation of stem cells via mechanical cues. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 797410.
- Niwa, H., Ogawa, K., Shimosato, D., & Adachi, K. (2009). A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. *Nature*, 118-122.
- Ou, Z., Niu, X., He, W., Chen, Y., Song, B., Xian, Y., Fan, D., Tang, D., & Sun, X. (2016). The Combination of CRISPR/Cas9 and iPSC Technologies in the Gene Therapy of Human  $\beta$ -thalassemia in Mice. *Scientific Reports*, 32463.
- Overmeyer, J. H., & Maltese, W. A. (2011). Death pathways triggered by activated Ras in cancer cells. *Frontiers in Bioscience*, 1693-1713.
- Pei, Y., Peng, J., Behl, M., Sipes, N. S., Shockley, K. R., Rao, M. S., Tice, R. R., & Zeng, X. (2016). Comparative neurotoxicity screening in human iPSC-derived neural stem cells, neurons and astrocytes. *Brain Research*, 57-73.
- Peng, J., Liu, Q., Rao, M. S., & Zeng, X. (2013). Using human pluripotent stem cell-derived dopaminergic neurons to evaluate candidate Parkinson's disease therapeutic agents in MPP<sup>+</sup> and rotenone models. *Journal of Biomolecular Screening*, 522-533.
- Pinton, L., Khedr, M., Lionello, V. M., Sarcar, S., Maffioletti, S. M., Dastidar, S., Negroni, E., Choi, S. W., Khokhar, N., Bigot, A., Counsell, J. R., Bernardo, A. S., Zammit, P. S., & Tedesco, F. S. (2023). 3D human induced pluripotent stem cell-derived bioengineered skeletal muscles for tissue, disease and therapy modeling. *Nature Protocols*, 1337-1376.
- Polo, J. M., Anderssen, E., Walsh, R. M., Schwarz, B. A., Nefzger, C. M., Lim, S. M., Borkent, M., Apostolou, E., Alaei, S., Cloutier, J., Bar-Nur, O., Cheloufi, S., Stadtfeld, M., Figueroa, M. E., Robinton, D., Natesan, S., Melnick, A., Zhu, J., Ramaswamy, S., & Hochedlinger, K. (2012). A molecular roadmap of cellular reprogramming into iPS cells. *Cell*, 151(7).
- Rajamohan, D., Matsa, E., Kalra, S., Crutchley, J., Patel, A., George, V., & Denning, C. (2013). Current status of drug screening and disease modelling in human pluripotent stem cells. *BioEssays*, 281-298.
- Santoso, M. R., Ikeda, G., Tada, Y., Jung, J. H., Vaskova, E., Sierra, R. G., Gati, C., Goldstone, A. B., von Bornstaedt, D., Shukla, P., Wu, J. C., Wakatsuki, S., Joseph Woo, Y., & Yang, P. C. (2020). Exosomes from induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes promote autophagy for myocardial repair. *Journal of the American Heart Association*, 14345.
- Sharma, A., Burridge, P. W., McKeithan, W. L., Serrano, R., Shukla, P., Sayed, N., Churko, J. M., Kitani, T., Wu, H., Holmström, A., Matsa, E., Zhang, Y., Kumar, A., Fan, A. C., Del Álamo, J. C., Wu, S. M., Moslehi, J. J., Mercola, M., & Wu, J. C. (2017). High-throughput screening of tyrosine kinase inhibitor cardiotoxicity

- with human induced pluripotent stem cells. *Science Translational Medicine*, 9(377).
- Son, J. S., Park, C. Y., Lee, G., Park, J. Y., Kim, H. J., Kim, G., Chi, K. Y., Woo, D. H., Han, C., Kim, S. K., Park, H. J., Kim, D. W., & Kim, J. H. (2022). Therapeutic correction of hemophilia A using 2D endothelial cells and multicellular 3D organoids derived from CRISPR/Cas9-engineered patient iPSCs. *Biomaterials*, 283.
- Soufi, A., Donahue, G., & Zaret, K. S. (2012). Facilitators and impediments of the pluripotency reprogramming factors' initial engagement with the genome. *Cell*, 994-1004
- Stadtfeld, M., & Hochedlinger, K. (2010). Induced pluripotency: History, mechanisms, and applications. *Genes and Development*, 2239-2263.
- Suzuki, K., Miyagawa, S., Liu, L., Kawamura, T., Li, J., Qu, X., Harada, A., Toda, K., Yoshioka, D., Kainuma, S., Kawamura, A., & Sawa, Y. (2021). Therapeutic efficacy of large aligned cardiac tissue derived from induced pluripotent stem cell in a porcine ischemic cardiomyopathy model. *Journal of Heart and Lung Transplantation*, 767-777.
- Szkolnicka, D., Farnworth, S. L., Lucendo-Villarin, B., Storck, C., Zhou, W., Iredale, J. P., Flint, O., & Hay, D. C. (2014). Accurate Prediction of Drug-Induced Liver Injury Using Stem Cell-Derived Populations. *Stem Cells Translational Medicine*, 141-148.
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, 663-676.
- Torrent, R., De Angelis Rigotti, F., Dell'era, P., Memo, M., Raya, A., & Consiglio, A. (2015). Using iPS cells toward the understanding of parkinson's disease. *Journal of Clinical Medicine*, 548-566.
- Utikal, J., Maherali, N., Kulalert, W., & Hochedlinger, K. (2009). Sox2 is dispensable for the reprogramming of melanocytes and melanoma cells into induced pluripotent stem cells. *Journal of Cell Science*, 3502-3510.
- Yan, Q., Quan, Y., Sun, H., Peng, X., Zou, Z., Alcorn, J. L., Wetsel, R. A., & Wang, D. (2014). A site-specific genetic modification for induction of pluripotency and subsequent isolation of derived lung alveolar epithelial type II cells. *Stem Cells*, 402-413.
- Yokoo, N., Baba, S., Kaichi, S., Niwa, A., Mima, T., Doi, H., Yamanaka, S., Nakahata, T., & Heike, T. (2009). The effects of cardioactive drugs on cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 428-488.

- Yu, D. X., Marchetto, M. C., & Gage, F. H. (2013). Therapeutic translation of iPSCs for treating neurological disease. *Cell Stem Cell*, 678-688.
- Zhou, Y., Gao, Y., Zhang, W., Chen, Y., Jin, M., & Yang, Z. (2021). Exosomes derived from induced pluripotent stem cells suppresses M2-type macrophages during pulmonary fibrosis via miR-302a-3p/TET1 axis. *International Immunopharmacology*, 99.