



Kandidaatintutkielma

# Indusoidut pluripotentit kantasolut

Mira Paldanius

Oulun yliopisto  
Biokemian ja molekyyli lääketieteen tiedekunta  
2023

## Sisällysluettelo

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 1.     | Pluripotentit kantasolut .....                                       | 6  |
| 1.1.   | Pluripotentit kantasolutyypit.....                                   | 6  |
| 1.1.1. | Embryonaaliset pluripotentit kantasolut.....                         | 7  |
| 1.1.2. | Indusoidut pluripotentit kantasolut.....                             | 7  |
| 2.     | iPS-solujen valmistaminen .....                                      | 8  |
| 3.     | Tuman uudelleenohjelmointi.....                                      | 8  |
| 3.1.   | Yamanakan tekijät .....  | 8  |
| 3.1.1. | OCT4.....  | 9  |
| 3.1.2. | KLF4 .....   | 10 |
| 3.1.3. | SOX2.....  | 11 |
| 3.1.4. | MYC.....   | 11 |
| 3.2.   | Muita uudelleenohjelmointitekijöitä.....                             | 12 |
| 4.     | Pluripotentin uudelleenohjelmoitumisen prosessi.....                 | 13 |
| 4.1.   | Vaihe I: Eitelisoituminen ja ensimmäinen aalto.....                  | 14 |
| 4.1.1. | Mesenkymaali-epiteelinen siirtymä .....                              | 14 |
| 4.1.2. | Muutoksen seuraaminen – I. vaiheen markkerit .....                   | 15 |
| 4.1.3. | ”Ensimmäinen aalto”.....   | 16 |
| 4.2.   | Vaihe II: Maturaatio .....   | 16 |
| 4.2.1. | Muutoksen seuraaminen – II. vaiheen markkerit.....                   | 18 |
| 4.2.2. | ”Toinen aalto” .....   | 18 |
| 4.3.   | Vaihe III: Stabilisaatio.....  | 19 |
| 4.3.1. | Stabilisaation aikana tapahtuvat muutokset .....                     | 19 |
| 4.3.2. | Muutoksen seuraaminen – III. vaiheen markkerit.....                  | 20 |
| 5.     | Uudelleenohjelmoinnin muutokset .....                                | 20 |
| 5.1.   | Epigeneettiset muutokset ja säätelijät uudelleenohjelmoinnissa ..... | 20 |

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 5.1.1. | Kromatiinin dekonkondensaatio .....                                  | 21 |
| 5.1.2. | DNA:n demetylaatio .....   | 21 |
| 5.1.3. | Histonimodifikaatiot.....  | 22 |
| 6.     | iPS-solujen pluripotentsisuuden testaaminen .....                    | 22 |
| 6.1.   | Pluripotentsisuuden määrittäminen .....                              | 22 |
| 6.1.1. | Teratoomamäärittäminen.....  | 23 |
| 6.1.2. | Alkiovartalon erilaistumiskokeet .....                               | 23 |
| 6.1.3. | Kimeerimäärittäminen ja tetraploidisten alkioiden täydennyskoe ..... | 23 |
| 6.1.4. | PluriTest-määrittäminen .....  | 23 |
| 7.     | iPS-solujen käyttö .....   | 24 |
| 7.1.   | iPS-solujen tarjoamat hyödyt, haasteet ja käyttökohteet .....        | 24 |
| 7.2.   | Tulevaisuuden näkymiä .....  | 25 |
| 8.     | Lähteet.....   | 26 |

## Lyhenteet

|                  |   |
|------------------|---|
| <b>MYC</b>       | engl. MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor                           |
| <b>CRISPR</b>    | engl. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats               |
| <b>DPPA4</b>     | engl. Developmental pluripotency-associated 4                                 |
| <b>EB</b>        | Alkiovartalo, engl. embryonic body  |
| <b>EGC</b>       | Alkion suku solu, engl. embryonic germ cell                                   |
| <b>EMT</b>       | Epiteeli-mesenkymaalinen siirtymä, engl. epithelial to mesenchymal transition |
| <b>ES-solu</b>   | Alkion kantasolu, engl. embryonic stem cell                                   |
| <b>FBXO15</b>    | engl. F-box protein 15  |
| <b>FOXA2</b>     | engl. Forkhead box protein A2   |
| <b>GLIS1</b>     | engl. Glis family zinc finger 1   |
| <b>H3/H4</b>     | Histonit H3 ja H4   |
| <b>H3K27</b>     | Histoni H3, lysini 27   |
| <b>H3K4</b>      | Histoni H3, lysini 4  |
| <b>H3K9</b>      | Histoni H3, lysini 9  |
| <b>HCAM</b>      | engl. Homing cell adhesion molecule   |
| <b>hES-solu</b>  | Ihmisen alkion kantasolu, engl. human embryonic stem cell                     |
| <b>hiPS-solu</b> | Ihmisen iPS-solu, engl. human iPS cell  |
| <b>ICM</b>       | Sisäsolu massa, engl. inner cell mass   |
| <b>iPS-solu</b>  | Indusoitu pluripotentti kantasolu, engl. induced pluripotent stem cell        |
| <b>Jak-Stat</b>  | engl. Janus kinase/signal transducers and activators of transcription         |
| <b>KLF4</b>      | engl. Krüppel-like factor 4   |
| <b>LIN28A</b>    | engl. Lin-28 homolog A  |
| <b>MAPK</b>      | engl. Mitogen-activated protein kinase  |
| <b>MET</b>       | Mesenkymaali-epiteelinen siirtymä, engl. mesenchymal to epithelial transition |

|              |  |
|--------------|--|
| <b>miRNA</b> | Mikro-RNA  |
| <b>mRNA</b>  | Lähettilä-RNA  |
| <b>NANOG</b> | engl. Nanog homeobox   |
| <b>NGS</b>   | Uuden sukupolven sekvensointitekniikka, engl. next-generation sequencing |
| <b>Notch</b> | engl. Neurogenic locus notch homolog                                     |
| <b>NuRD</b>  | engl. Nucleosome remodeling deacetylase                                  |
| <b>OCT4</b>  | engl. Octamer-binding transcription factor 4                             |
| <b>p53</b>   | engl. Tumor protein p53  |
| <b>PECAM</b> | engl. Platelet endothelial cell adhesion molecule                        |
| <b>RPC</b>   | Verkkokalvon progenitorisolu, engl. retinal progenitor cell              |
| <b>SALL4</b> | engl. Sal-like protein 4   |
| <b>shRNA</b> | engl. Small hairpin RNA  |
| <b>SNAI1</b> | engl. Snail family transcriptional repressor 1                           |
| <b>SOX2</b>  | engl. SRY-box transcription factor 2                                     |
| <b>SSEA1</b> | engl. Stage-specific embryonic antigen                                   |
| <b>TGF-β</b> | engl. Transforming growth factor-beta                                    |
| <b>THY1</b>  | engl. Thy-1 cell surface antigen   |
| <b>Wnt</b>   | engl. Wingless-related integration site                                  |

## 1. Pluripotentit kantasolut

Pluripotentteja eli useakkyisiä kantasoluja esiintyy nisäkkäillä alkionkehityksen aikana morula-vaiheen jälkeen muodostuvan blastokystin sisäsolumassassa (engl. inner cell mass, ICM). Tätä aiempien alkionkehityksen vaiheiden solut ovat totipotentteja eli kaikkikkyisiä, sillä niillä on edelleen kyky kokonaisen yksilön muodostamiseen. Totipotentteista kantasoluista poiketen, pluripotentit kantasolut eivät enää omaa potentiaalia kehittyä omiksi yksilöikseen. Kuitenkin ne luokitellaan edelleen erilaistumattomiksi soluiksi, sillä niillä on yhä kyky kehittyä sekä kaikkien kolmen alkiokerroksen eli endodermin, mesodermin ja ektodermin soluiksi että alkion sukusoluiksi (engl. embryonic germ cells, EGC) joista ituradan kantasolut kehittyvät. Tämä tarkoittaa sitä, että pluripotentit kantasolut pystyvät erilaistumaan miksi tahansa aikuiselta yksilöltä löytyvän solutyypin soluksi, lukuun ottamatta vain totipotentista kantasolusta kehittyviä sikiön ulkopuoleisiksi kudoksiksi kutsuttuja kudoksia (Wobus & Boheler, 2005).

Erilaistumattomuuden lisäksi pluripotentit kantasolut kykenevät, totipotenttien solujen tavoin, jakautumaan rajoittamattoman monta kertaa tuottaen jokaisella jakautumisella kaksi itsensä kanssa identtistä solua. Tämä mahdollistaa solun kyvyn tuottaa teoriassa loputtomasti itsensä kaltaisia, rajattomasti uusiutuvia, tytärsoluja (Wobus & Boheler, 2005). Solun rajaton jakautumiskyky erottaa kantasolut somaattisista soluista, joiden jakautumiskertojen lukumäärä on rajallinen johtuen telomeerien eli lineaarisen DNA:n päistä löytyvien TTAGGG-toistojaksojen lyhenemisestä jokaisen jakautumiskerran yhteydessä (F. Li *et al.*, 2020). Telomeerien lyheneminen somaattisissa soluissa johtuu siitä, että solun jakautumista varten tapahtuvaa DNA:n replikointia ei pystytä suorittamaan rakennettavien juosteiden 5'-päissä aivan alkuperäisen juosteen 3'-pään loppuun saakka. Kantasoluissa tämän ongelman ratkaisee telomeraasientsyymi, joka estää telomeerien lyhenemisen täydentämällä puuttuvan osuuden juosteen päähän (Gilson & Géli, 2007).

### 1.1. Pluripotentit kantasolutyyppit

Tällä hetkellä käytettävät pluripotentit kantasolut voidaan pääasiallisesti jakaa kahteen ryhmään niiden alkuperän perusteella: embryonaalisiin pluripotentteihin kantasoluihin eli alkion kantasoluihin (engl. embryonic stem cells, ES-solut) ja indusoituihin pluripotentteihin kantasoluihin (engl. induced pluripotent stem cells, iPS-solut). Kumpaankin pluripotenttiin solutyyppiin ja sen alkuperään liittyy omat ongelmansa ja haasteensa, ja etenkin ES-solujen kodalla, eettiset kysymyksensä (Takahashi & Yamanaka, 2006; Romito & Cobellis, 2016).

### ***1.1.1. Embryonaaliset pluripotentit kantasolut***

Embryonaalista alkuperää olevia pluripotentteja kantasoluja saadaan, nimensä mukaisesti, embryon blastokystivaiheen sisäsolumassasta. ES-solujen eristämässä ICM eristetään sitä ympäröivästä solurakenteesta, jota nimitetään trofoblastiksi. Tämä voidaan tehdä esimerkiksi hyödyntämällä menetelmiä, joissa trofoblasti poistetaan ICM:n ympäriltä erilaisten kemiallisten käsittelyjen avulla. Käytännössä metodin tarkoituksena on trofoblastin tuhoaminen siten, että ICM:n solut säilyvät vahingoittumattomina (Solter & Knowles, 1975; Sviridova-Chailakhvan *et al.*, 2008).

Embryonaalista alkuperää olevien solujen käyttöön liittyy erityisiä haasteita etenkin, kun käsitellään ihmisen alkioilta peräisin olevia soluja. Tällöin on mietittävä vaikeita eettisiä kysymyksiä, jotka liittyvät muun muassa ihmisten erilaisiin näkemyksiin siitä, voidaanko 5–7 päivän ikäistä alkioita pitää ihmisenä vai ei. Yleisin ajatustapa on alkion näkeminen potentiaalisena tulevana ihmisenä, joka ei kuitenkaan vielä ole ihminen, mutta joka ansaitsee kuitenkin erityistä kunnioitusta ja jonka käyttöä tutkimuksessa on pohdittava tarkkaan (Lo & Parham, 2009).

Johtuen ihmisen ES-solujen (engl. human ES cells, hES-solut) eettisyyteen liittyvistä kysymyksistä, vaihtelevat niihin liittyvät lait, säädännöt ja käytännöt voimakkaasti eri maiden välillä (Matthews & Moralí, 2020). Suomessa lainsäädäntö sallii hES-solujen keräämisen hedelmöittämishoidoista ylijääneistä alkioista, joiden hedelmöitymishetkestä on kulunut korkeintaan 14 vuorokautta. Tätä vanhemmat alkioita on tuhottava, eikä niitä saa enää hyödyntää tutkimuksessa. Kantasolututkimusta säätelee Sosiaali- ja terveysministeriön Laki Lääketieteellisestä tutkimuksesta 1999/488 (Regulation of Stem Cell Research in Finland, Eurostemcell).

### ***1.1.2. Indusoidut pluripotentit kantasolut***

iPS-soluja voidaan valmistaa, ES-soluista poiketen, aikuiselta ihmiseltä otetuista somaattisista eli erilaistuneista soluista eräänlaisen solujen uudelleenohjelmoinnin avulla. Lukuisat tutkimukset ovat osoittaneet, että uudelleenohjelmointi on mahdollista toteuttaa suurimmalle osalle, ellei jopa kaikille, somaattisille solutyypeille (Romito & Cobellis, 2016).

Koska iPS-solut eivät ole embryonaalista alkuperää, niihin eivät päde samat eettiset ongelmat, jotka rajoittavat ES-solujen käyttöä ja niitä tarvitsevien menetelmien kehittämistä. Tämä tekee iPS-soluilla tehtävästä tutkimuksesta huomattavasti ES-soluja tarvitsevia tutkimuksia helpompaa ja vähemmän vastustettua, joten ne tarjoavat hyvän ratkaisun kantasolututkimuksia aiemmin hidastaneisiin eettisiin ongelmiin. (Lo & Parham, 2009).

## **2. iPS-solujen valmistaminen**

iPS-soluista puhuttiin ensimmäisen kerran vuonna 2006 julkaistussa Takahashin ja Yamanakan aihetta käsittelevässä artikkelissa (Takahashi & Yamanaka, 2006). He onnistuivat tutkimuksensa avulla määrittämään neljä faktoria eli tekijää, joiden avulla somaattisia soluja, kuten ihosoluja, on mahdollista saada käyttäytymään ES-solujen tavoin ja saavuttamaan jälleen pluripotentin tilan. Takahashin ja Yamanakan kokeiden perusteella näiden neljän uudelleenohjelmointitekijän eli Yamanakan tekijöiden, todettiin mahdollistavan iPS-solujen valmistaminen (Takahashi & Yamanaka, 2006).

Myöhemmät tutkimukset ovat näyttäneet muidenkin tekijöiden vaikuttavan solujen uudelleenohjelmoitumiseen ja jopa tehostavan sitä. Lisäksi on pystytty kokeellisesti osoittamaan muidenkin uudelleenohjelmointitekijäyhdistelmien toimivan iPS-solujen valmistamisessa yhtä hyvin, ellei jopa paremmin kuin Yamanakan ja Takahashin alkuperäiset neljä uudelleenohjelmointitekijää (Takahashi & Yamanaka, 2006; Yu *et al.*, 2007; Buganim *et al.*, 2013).

## **3. Tuman uudelleenohjelmointi**

Tuman uudelleenohjelmoinnilla tarkoitetaan iPS-solujen tapauksessa niitä tumassa tapahtuvia muutoksia, jotka vaaditaan pluripotentin tilan saavuttamiseen. Solun uudelleenohjelmointi vaatii muutoksia erityisesti tuman toiminnassa, sillä somaattinen solu on saatava käyttäytymään pluripotentin solun tavoin. Näiden muutosten aikaansaamiseksi voidaan käyttää erilaisia geneettisiä uudelleenohjelmointitekijöitä, kuten Yamanakan ja Takahashin pioneeritutkimuksessa määritettyjä Yamanakan tekijöitä. Tällaiset transkriptiotekijät vaikuttavat muun muassa solun epigeneettiseen tilaan, signaalintireitteihin ja transkriptioverkostoihin (Buganim *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2015).

### **3.1. Yamanakan tekijät**

Yamanakan tekijöiksi kutsutaan Yamanakan ja Takahashin tutkimuksen perusteella iPS-solujen valmistukseen vaadittavia neljää geenisäätelyproteiinia. Yamanakan tekijöitä ovat OCT4 (engl. octamer-binding transcription factor 4), KLF4 (engl. Kruppel-like factor 4), SOX2 (engl. SRY-box transcription factor 2) ja MYC (engl. MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor). Yamanakan ja Takahashin tutkimuksissa näitä neljää proteiinia koodaavien geenien yhtäaikaisella ilmentämisellä aikaansaatii pluripotenttien kantasolujen



muodostuminen somaattisista soluista. Kun kokeiltiin jättää jokin Yamanakan tekijöistä pois, ei vastaavia tuloksia saatu aikaiseksi. Lisäksi havaittiin, että näillä neljällä tekijällä saatiin samoja tai jopa parempia tuloksia kuin muilla, niiden lisäksi myös muita tekijöitä sisältäneillä kombinaatiolla (Takahashi & Yamanaka, 2006).

Myöhemmissä tutkimuksissa on havaittu Yamanakan tekijöiden olevan kriittisiä säätelijöitä useille solun pluripotenttisuudelle välttämättömistä kehityksellisistä signaalintireiteistä, mikä selittää niiden kykyä indusoida solun pluripotenttisuutta. Tutkimusten perusteella, ne vaikuttavat erilaisiin signaalintireitteihin sekä yksin, että yhdessä toistensa kanssa erilaisin kombinaatioin. Lisäksi ne myös osallistuvat toistensa säätelyyn. OCT4, SOX2 ja KLF4 vaikuttavat erityisen usein samoihin kohteisiin toistensa kanssa, kun taas niiden ja MYC:n välillä on havaittavissa runsaammin eroja vaikutuskohteissa. (Liu *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2009).

### **3.1.1. OCT4**

OCT4 on yksi solun pluripotenttisuutta säätelevistä transkriptiotekijöistä. OCT4:ää tuottavaa geeniä on havaittu ekspressoitavan luonnollisesti ainoastaan alkion aikaisten kehitysvaiheiden soluissa sekä ituradan soluissa. Tämän lisäksi OCT4:ää tuottava geeni on aktiivisena pluripotenttejen kantasoluviljelmien soluissa, mikä viittaa sen toiminnan liittyvän jollain tavalla solujen pluripotenttisuuteen. Ihmisillä *OTF3*-geeni koodaa kolmea eri OCT4:n isoformia, jotka ovat OCT4A, OCT4B ja OCT4B1. Näistä vain yhden, OCT4A:n, on havaittu olevan kykenevä osallistumaan solujen pluripotentin tilan ylläpitämiseen, hiirten Oct4:n tavoin (Herr & Cleary, 1995; Shi & Jin, 2010; Wang & Dai, 2010).

Tutkimukset ovat osoittaneet OCT4:n toimivan tiettyjen geenien säätelijänä vuorovaikuttaen useiden muiden molekyylien kanssa ja säädellen erilaisten kohdemolekyylien toimintaa. Riippuen siitä, minkä molekyylien kanssa se toimii, voi OCT4 vaikuttaa joko aktivoivasti tai tukahduttavasti. Esimerkiksi yhdessä SOX2:n, NANOG:n (engl. nanog homeobox) ja SALL4:n (engl. Sal-like protein 4) kanssa, OCT4 yleensä aktivoi geeniekspressiota ylläpitäen solun pluripotenttisuutta ja uusiutumiskykyä sekä estäen samalla solun erilaistumista. Kuitenkin yhdessä esimerkiksi NuRD:n (engl. nucleosome remodeling deacetylase) kanssa se aikaansaa kasvuun ja kehitykseen liittyvien geenien hillitsemistä (Shi & Jin, 2010).

OCT4:n on havaittu vaikuttavan useisiin tunnettuihin solun pluripotenttisuuteen liittyviin säätelyreitteihin. Näitä ovat Wnt- (engl. wingless-related integration site), p53- (engl. tumor protein p53), TGF- $\beta$ - (engl. transforming growth factor-beta), Hedgedog-, Notch- (engl. neurogenic locus notch homolog), MAPK- (engl. mitogen-activated protein kinase) ja Jak-Stat-

säätelyreitit (engl. Janus kinase/signal transducers and activators of transcription signaling pathway). OCT4:n vaikutuksia eri säätelyreitteihin kuvataan tarkemmin taulukossa I. Lisäksi OCT4 vaikuttaa aktivoivasti *KLF4*:n, *SOX2*:n ja itseään koodaavan geenin ilmentämiseen, vahvistaen siten myös muiden tekijöiden vaikutuksia. (Liu *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2009).

**Taulukko I.** Yamanakan tekijöiden vaikutuksia pluripotentsuuteen tunnetusti liittyviin solun säätelyreitteihin. On tärkeää huomioida, että transkriptiotekijät vaikuttavat kunkin säätelyreitit kohdalla eri tavoin (aktivoivasti tai inhiboivasti) saman säätelyreitit eri osiin. Taulukon tiedot perustuvat Liun ja kollegojen artikkeliin (Liu *et al.*, 2008) ja ”Transkriptiotekijöiden vaikutus” -sarake kuvaa transkriptiotekijöiden tunnettuja kokonaisvaikutuksia säätelyreitteihin.

|               |              | Säätelyreittiin vaikuttavat transkriptiotekijät |      |      |     | Transkriptiotekijöiden vaikutus |
|---------------|--------------|---|------|------|-----|---------------------------------|
|               |              | OCT4  | KLF4 | SOX2 | MYC |                                 |
| Säätelyreitit | Wnt          | x   |      | x    | x   | aktivoiva                       |
|               | p53          | x   | x    | x    | x   | aktivoiva                       |
|               | TGF- $\beta$ | x   |      | x    | x   | aktivoiva                       |
|               | Hedgehog     | x   | x    |      |     | aktivoiva                       |
|               | Notch        | x   |      |      | x   | aktivoiva                       |
|               | MAPK         | x   |      |      |     | aktivoiva                       |
|               | Jak-Stat     | x   | x    |      | x   | inhiboiva                       |

### 3.1.2. *KLF4*

*KLF4* on sinkkisormirakenteinen transkriptiotekijä, joka vaikuttaa solun pluripotentsisuuden ylläpitoon säätlemällä erityisesti muiden transkriptiotekijöiden, kuten OCT4:n, *SOX2*:n ja *NANOG*:n tuottoa soluissa. *KLF4*:n normaalia runsaamman ilmentämisen on havaittu aktivoivan *OCT4*:n ilmentämistä, mikä johtaa *OCT4*:n vaikutusten kautta esimerkiksi tehostuneeseen solun pluripotentsisuuden ylläpitoon. Tätä ominaisuutta voidaan hyödyntää pluripotentialisuutensa menettäneiden solujen, kuten somaattisten solujen, pluripotentsisuuden palauttamisessa, ja siten iPS-solujen valmistuksessa. (Y. Li *et al.*, 2005).

*KLF4*:n vaikutus ES-soluille spesifien proteiinien ilmentämiseen tapahtuu suurilta osin solusykliä säätelevän p53-proteiinin avulla siten, että ES-soluissa ja niiden kaltaisissa soluissa *KLF4* tukahduttaa p53:n synteesiä. Vähentynyt p53-taso mahdollistaa esimerkiksi *NANOG*:n ilmentämisen lisääntymisen. *KLF4* vaikuttaa p53-proteiinin lisäksi myös muihin p53-säätelyreitit osiin. Lisäksi sen on todettu vaikuttavan myös Hedgehog-, Wnt- ja Jak-Stat-säätelyreitteihin (Taulukko I) (Y. Li *et al.*, 2005; Rowland *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2015; Wong *et al.*, 2016).

### 3.1.3. *SOX2*

*SOX2* on yksi *OCT4*:n kanssa yhdessä toimivista transkriptiotekijöistä. *OCT4*:n lisäksi, *SOX2* toimii myös yhdessä *NANOG*:n ja useiden muiden tekijöiden kanssa, mikä osoittaa sen vaikuttavan solussa useiden eri reittien kautta. Tämä kertoo myös siitä, että *SOX2* on muutakin kuin vain *OCT4*:n kofaktori. Oleellisinta iPS-solujen valmistuksen kannalta on, että *SOX2* vaikuttaa positiivisesti solujen pluripotentsisuuden ja uusiutumiskyvyn ylläpitoon, mikä tarkoittaa käytännössä ES-soluille tyypillisten ominaisuuksien säilyttämistä (Wong *et al.*, 2016).

*SOX2*:n on todettu vaikuttavan Wnt-, p53- ja TGF- $\beta$ -reaktioteihin (Taulukko I). Mikäli *SOX2*:ta tuotetaan runsaasti ja sitä pääsee kertymään soluun, alkaa se normaalissa tilanteessa vaikuttaa omaan transkriptioonsa negatiivisesti vähentämällä itseään vastaavan endogeenisen, eli solun omien geenien koodaaman, lähetti-RNA:n (mRNA) ilmentämistä. Kuitenkin *SOX2*:n ja *OCT4*:n eksogeeninen, eli solun omien geenien ulkopuolinen, ilmentäminen solun uudelleenohjelmoinnin yhteydessä voi aktivoida useita ES-soluille tyypillisiä tekijöitä. (Liu *et al.*, 2008).

### 3.1.4. *MYC*

*MYC*, joka tunnetaan myös nimellä c-*MYC*, on *MYC*-proteiiniperheeseen kuuluva, *MYC*-proto-onkogeenin koodaama transkriptiotekijä, jota tarvitaan solussa useissa eri solun erilaistumiseen ja selviytymiseen liittyvissä prosesseissa. Koska *MYC* on solun selviytymiselle tärkeä, syntetisoidaan sitä käytännössä kaikissa jakautuvissa somaattisissa soluissa sekä kantasoluissa niin sikiöllä kuin aikuisellakin. *MYC* säätelee usean, toistensa kanssa hyvin erilaisen, proteiinin ekspressiota. Tämä on mahdollista siksi, että se kykenee toimimaan sekä transkriptionaalisen aktivaattorina että inhibiittorina tilanteesta riippuen (Nakagawa *et al.*, 2007; Sammak *et al.*, 2019).

Yamanakan ja Takahashin pioneiritutkimuksessa *MYC* nimitettiin yhdeksi iPS-solujen valmistamiselle välttämättömistä transkriptiotekijöistä. Myöhemmissäkin tutkimuksissa on osoitettu *MYC*:n edistävän solun siirtymistä pluripotentiin tilaan, mutta iPS-soluja on onnistuttu myös valmistamaan korvaamalla *MYC* muilla transkriptiotekijöillä. Lisäksi useat tutkimukset ovat osoittaneet *MYC*:n edistävän iPS-solujen generaation lisäksi myös kasvainten kehittymistä. Kasvaimia on havaittu muun muassa iPS-peräisissä kimeerisissä hiirissä, ja niiden on ajateltu johtuvan pääasiassa iPS-solujen uudelleenohjelmoinnissa käytettävän *MYC*-retroviruksen uudelleenaktivoitumisesta (Okita *et al.*, 2007; Nakagawa *et al.*, 2010; Sammak *et al.*, 2019).

MYC:n on todettu vaikuttavan useisiin iPS-solujen valmistuksen kannalta oleellisiin aineenvaihduntareihin, kuten Notch-, Wnt-, p53-, Jak-Stat- ja TGF- $\beta$ -reaktioteihin (Taulukko I). Lisäksi se osallistuu muiden kolmen Yamanakan tekijän säätelyyn. MYC:n toiminnan on havaittu eroavan merkittävästi KLF4:n toiminnasta käytettäessä näitä yhdessä OCT4:n ja SOX2:n kanssa. Siinä missä KLF4:n keskittyy voimistamaan OCT4:n ja SOX2:n vaikutuksia, on MYC:n voitu havaita omaavan selkeä rooli aineenvaihdunnan säätelijänä (Liu *et al.*, 2008).

### 3.2. Muita uudelleenohjelmointitekijöitä

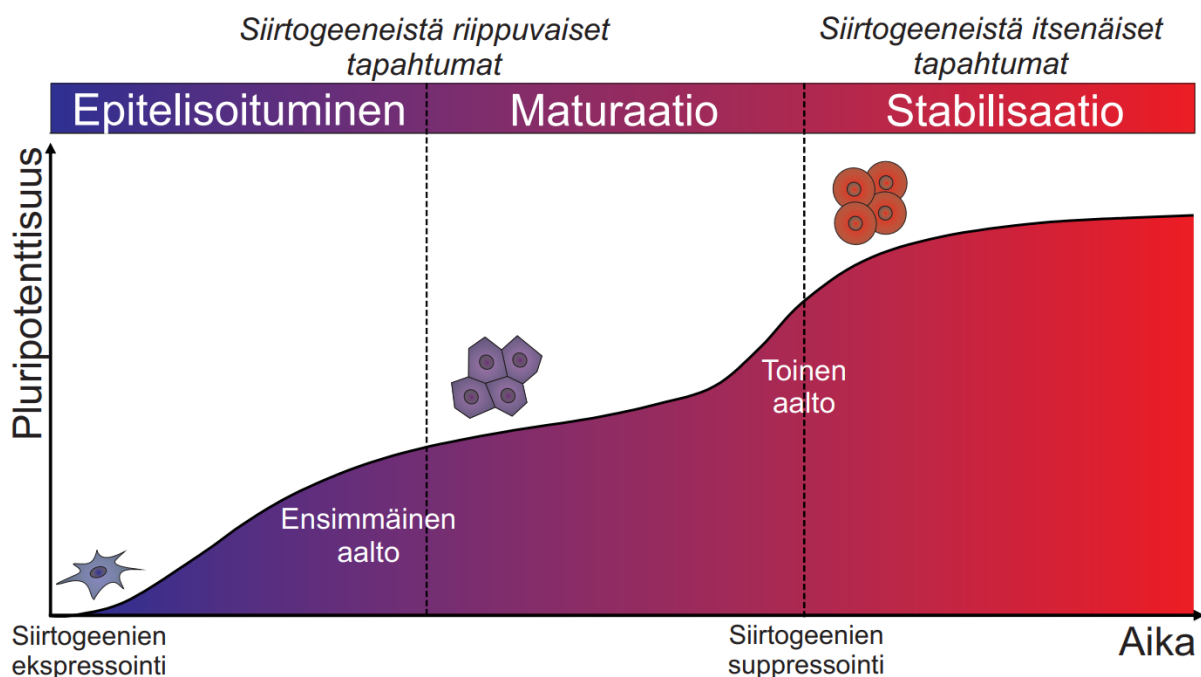
Yamanakan ja Takahashin pioneeritutkimuksen julkaisun jälkeen on havaittu, etteivät Yamanakan tekijät suinkaan ole ainoa iPS-solujen valmistamisessa toimiva transkriptiotekijäyhdistelmä. Esimerkiksi MYC:n korvaamista on kokeiltu onnistuneesti ainakin Glisin kaltaisella transkriptiotekijällä GLIS1:llä (engl. Glis family zinc finger 1). GLIS1 toimii MYC:n korvaajana, sillä se toimii ES-soluille tyypillisiä ominaisuuksia edistävänä aineenvaihduntaa säätelevänä tekijänä. Se transaktivoi muun muassa Wnt-reaktiotien ligandien, LIN28A:n (engl. Lin-28 homolog A), NANOG:n ja FOXA2:n (engl. forkhead box protein A2) genejä (Okita *et al.*, 2007; Maekawa *et al.*, 2011).

Onkogeneinä tunnetut *MYC* ja *KLF2* on myös onnistuttu korvaamaan käyttämällä niiden sijaan NANOG:a koodaavaa geeniä. NANOG on erityisen tärkeä solun erilaistumattoman tilan ylläpitämiselle ja se toimii yhdessä SOX2:n ja OCT4:n kanssa kontrolloiden genejä, joilla on tärkeitä rooleja solun pluripotenttisuuden ylläpidossa. Nämä tekijät toimivat hyvin yhdessä, sillä ne muodostavat eräänlaisen säätelyverkoston, jossa ne sekä tukevat toistensa että rajoittavat toistensa ekspressiotasoja. Onkin havaittu, että tämä säätelyverkosto on tärkeä osa ES-solujen kykyä säilyttää pluripotenttisuus. NANOG:n toiminta pluripotenttisuuden ylläpitäjänä perustuu sen kykyyn estää solun erilaistumista. Ei siis ole yllättävää, että solun erilaistuminen vaatii luonnossa NANOG:n määrän laskemista solussa vähentämällä sen ekspressiota (Chambers *et al.*, 2003; Pan & Thomson, 2007; Y. Li *et al.*, 2010).

Eriilaisten ES-soluille tyypillisten transkriptiotekijöiden ja solusykliä säätelevien tekijöiden lisäksi joidenkin kromatiinin muokkaukseen vaikuttavien entsyymien, soluadheesiomolekyylien ja mRNA-molekyylien on havaittu mahdollistavan tai tehostavan tuman uudelleenohjelmointia. Lisäksi iPS-solujen valmistukseen liittyvä tekniikka kehittyi koko ajan, ja aiheeseen liittyen tehdään jatkuvasti uusia tutkimuksia. Tämä johtaa siihen, että tietämys aiheesta laajenee ja tarkentuu koko ajan (Weltner *et al.*, 2014)

#### 4. Pluripotentin uudelleenohjelmoitumisen prosessi

Somaattisen solun uudelleenohjelointi pluripotentiksi kantasoluksi voidaan nähdä kolmivaiheisena prosessina, jonka vaiheita voidaan nimittää epitelisoitumiseksi, maturaatioksi ja stabilisaatioksi (kuva 1). Jokaiseen vaiheeseen liittyy omat tärkeät tapahtumansa ja muutoksensa, jotka johtavat lopulta iPS-solujen muodostumiseen somaattisista soluista. Samalla iPS-solulle tyypillinen transkriptomi saavutetaan kahden pääasiallisen askelen kautta. Niitä voidaan kutsua ensimmäiseksi ja toiseksi aalloksi (kuva 1). Soluissa tapahtuvia muutoksia voidaan seurata muun muassa tarkkailemalla muutoksia solujen morfologiassa sekä erilaisten, jokaiselle vaiheelle ominaisten, markkereiden avulla (David & Polo, 2014; Lodrini *et al.*, 2020).



**Kuva 1.** Pluripotentin uudelleenohjelmoitumisen prosessin eteneminen. Prosessi voidaan jakaa kolmeen vaiheeseen: epitelisoitumiseen, maturaatioon ja stabilisaatioon. Kahden ensimmäisen vaiheen aikaiset tapahtumat ovat siirtogeeniriippuvaisia, eli ne vaativat tapahtuakseen sopivien siirtogeenisten transkriptiotekijöiden, esimerkiksi Yamanakan tekijöiden, pakotettua ekspressointia soluissa. Kolmannen vaiheen eli stabilisaation aikaiset tapahtumat ovat siirtogeneistä itsenäisiä ja ne voivat tapahtua vasta sen jälkeen, kun siirtogeenien pakotettu ilmentäminen soluissa on lopetettu siirtogeeniä suppressoimalla. Prosessin edetessä solujen voidaan havaita muuttuvan muotoaan, mikä kertoo niissä tapahtuvista muutoksista. Solujen pluripotenttisuus kehittyi prosessin aikana, kun soluissa tapahtuu siihen vaadittavia muutoksia. Erityisen runsaasti näitä muutoksia tapahtuu vaiheissa, joita kutsutaan ensimmäiseksi ja toiseksi aalloksi. Kuva perustuu Davidin ja Polon artikkelin iPS-solujen vaiheita esittävään kuvaan ja on muokattu CC BY-NC-ND 3.0 -luvan mukaisesti (David & Polo, 2014).

#### **4.1. Vaihe I: Eitelisoituminen ja ensimmäinen aalto**

Eitelisoitumisvaiheella tarkoitetaan uudelleenohjelmoinnin alkuosaa ja erityisesti niitä prosesseja, jotka tapahtuvat ennen ensimmäisten pluripotenttisuuteen liittyvien geenien ilmentämistä uudelleenohjelmoitavissa soluissa (Polo *et al.*, 2012). Näihin kuuluvat ainakin muutokset solun metaboliassa, apoptoosin eli ohjelmoituneen solukuoleman ja seneskenssin eli solujen vanhenemisen inhibitio, solujen lisääntymisen tehostuminen, somaattisen solun ohjelmoinnin katoamisen alkaminen ja mesenkymaali-epiteelinen siirtymä (David & Polo, 2014).

Molekulaarisella tasolla tarkasteltuna eitelisoitumisvaiheen aikana tapahtuu useita solun sisäiseen säätelyyn liittyviä muutoksia. Eksogeeniset tekijät KLF4, MYC, OCT4 ja SOX2 esimerkiksi suppressoivat TGF- $\beta$ -signalointia, estäen solun erilaistumista ajavan ja ylläpitävän epiteeli-mesenkymaalisen siirtymän (EMT) jatkumista. OCT4 ja SOX2 suppressoivat myös ainakin SNAI1-transkriptiotekijää (engl. Snail family transcriptional repressor 1), joka on voimakas E-cadheriinin ja endogeenisen KLF4:n inhibiittori. E-cadheriiniin kohdistuvan inhibition väheneminen mahdollistaa mesenkymaali-epiteelisen siirtymän (MET) aktivoitumisen. Eksogeeninen KLF4 auttaa vahvistamaan tätä aktivaatiota, joka johtaa lopulta yhdessä TGF- $\beta$ -signaloinnin suppressoinnin kanssa MET:n aktivoimiseen EMT:n sijasta, ja siten solun erilaistuneisuuteen liittyvän ohjelmoinnin katoamiseen (R. Li *et al.*, 2010).

Ensimmäinen transkriptionaalinen aalto ja siihen liittyvät muutokset tapahtuvat samanaikaisesti eitelisoitumisvaiheen kanssa, ja ne voidaankin siten ajatella osaksi eitelisoitumisvaihetta (David & Polo, 2014). Transkriptionaalisten aaltojen ajoituksia iPS-solujen valmistusprosessissa havainnollistetaan kuvassa 1. Lähes kaikkien uudelleenohjelmoituvien solujen on todettu olevan kykeneviä läpikäymään eitelisoitumisvaiheeseen ja ensimmäiseen aaltoon liittyvät muutokset. Tämä kertoo siitä, että vaihe ei ole erityisen ongelmallinen valmistettavien iPS-solujen saannon kannalta (Polo *et al.*, 2012).

##### **4.1.1. Mesenkymaali-epiteelinen siirtymä**

Eitelisoitumisvaiheen muutoksista helpoiten havaittava on uudelleenohjelmoitavien fibroblastien läpikäymä mesenkymaali-epiteelinen siirtymä, jossa mesenkymaalit tai mesenkymaalin kaltaiset solut muuntuvat epiteelisoluiksi. Tämä voidaan havaita solun morfologian muutoksena, jossa mesenkymaalisten solujen neulamainen muoto ja multipolaarisuus vaihtuvat epiteelisolujen polaarisuuteen ja pyöreämpään muotoon (R. Li *et al.*, 2010; Sipos & Galamb, 2012).

MET on erityisen oleellinen uudelleenohjelmoitaessa fibroblasteja (Polo & Hochedlinger, 2010), jotka ovat ominaisuuksiltaan mesenkymaalisten solujen kaltaisia soluja (Soundararajan & Kannan, 2018). Tutkimukset ovatkin osoittaneet iPS-solujen valmistuksen olevan tehokkaampaa ja nopeampaa käytettäessä fibroblastien sijaan epiteelisoluja, kuten ihon keratinosyyttejä (Aasen *et al.*, 2008; Stadtfeld *et al.*, 2008; R. Li *et al.*, 2010). Tämän voidaan olettaa johtuvan siitä, ettei epiteelisolujen tarvitse aloittaa muutostaan läpikäymällä MET prosessia, jonka on todettu olevan ainakin fibroblastien kohdalla tärkeä uudelleenohjelmoinnin nopeutta määrittävä tekijä. Muiden ei-mesenkymaalisten solujen, kuten verisolujen, tarvetta läpikäydä MET:n kaltaista prosessia ei olla vielä onnistuttu selvittämään (Polo & Hochedlinger, 2010).

Käytännössä MET on vastakkainen tapahtuma EMT:lle, joka indusoi muun muassa mesodermin ja hermostoputkien kehitystä ja on tärkeä osa yksilönkehitystä. EMT:lla on roolinsa myös useissa patogeenisissä tapahtumissa, kuten syövän etäpesäkkeiden muodostumisessa ja interstitiaalisessa fibroosissa. EMT:n tavoin, myös MET on soluille luonnollinen prosessi, jota ilmenee muun muassa sydämen ja munuaisten kehityksen aikana, sekä limakalvojen paranemisessa. Sillä on myös havaittu olevan osuutta syövän etäpesäkkeiden muodostumisessa (Polo & Hochedlinger, 2010). Tämä kaikki viittaa siihen, että yksilönkehityksen, syövän ja solujen uudelleenohjelmoinnin välillä on yhtäläisyyksiä tiettyihin prosesseihin liittyen (Sipos & Galamb, 2012).

#### **4.1.2. Muutoksen seuraaminen – I. vaiheen markkerit**

Soluissa tapahtuvat molekulaariset muutokset aiheuttavat muutoksia solun eri aineenvaihdunta- ja säätelyreittien toiminnassa, ja siten myös näissä mukana olevien molekyylien pitoisuuksissa, aktiivisuuksissa ja toiminnassa. Eitelisoitumisvaiheen etenemistä voidaan siten seurata MET:n aiheuttaman solun morfologian muutoksen lisäksi mittaamalla eri markkeriproteiineja, etenkin tunnettuja pluripotenttisuudesta kertovia markkereita, joista ensimmäiset ilmenevät epitelisoitumisvaiheen aikana (David & Polo, 2014).

Eitelisoitumisvaiheelle tyypilliseksi muutoksiksi on havaittu THY1:n (engl. thy-1 cell surface antigen), HCAM:n (engl. homing cell adhesion molecule) ja SNAI1:n säätely, joka aikaansaa niiden ilmentämisen merkittävän vähenemisen. Samalla solussa tapahtuvat molekulaariset ja aineenvaihdunnalliset muutokset johtavat ensimmäisten pluripotettisuudesta kertovien markkereiden, kuten E-cadheriinin, alkaliinifosfataasin ja SSEA1:n (engl. stage-specific embryonic antigen) ilmentämisen voimakkaaseen lisääntymiseen (Brambrink *et al.*, 2008; David & Polo, 2014).

### 4.1.3. ”Ensimmäinen aalto”

Ensimmäinen transkriptionaalinen aalto sijoittuu ajallisesti epitelisaatiovaiheen loppupuolelle, missä ensimmäiset pluripotenttisuuteen liittyvät markkerit alkavat ilmetä soluissa (kuva 1). Käsitteellä kuvataan tilannetta, jossa tapahtuu lyhyessä ajassa runsaasti sellaisia muutoksia solujen transkriptomissa, jotka vievät solut lähemmäksi valmiin iPS-solun transkriptomia eli sille tyypillistä RNA-molekyylien kokonaisuutta (Polo *et al.*, 2012; David & Polo, 2014).

Valmistettaessa iPS-soluja Yamanakan tekijöiden avulla, ensimmäisen aallon on havaittu olevan enimmäkseen MYC-välitteinen. Muutoksia tapahtuu kuitenkin myös muiden tekijöiden kohdegeenien ilmentämisessä. Esimerkiksi KLF4:llä on tärkeä rooli useiden aikaisten somaattisten geenien suppressorijana. Ensimmäisen aallon aikana soluissa siis tapahtuu voimakkaita muutoksia erilaisten mRNA:den määrässä. Nukleinihaposta riippuen, niiden ilmentäminen joko voimistuu tai heikkenee voimakkaasti. Nämä muutokset vaikuttavat puolestaan solun sisäiseen säätelyyn, joko inhiboiden tai vahvistaen erilaisia molekulaarisia prosesseja ja siten aiheuttaen erilaisia, lopulta pluripotenttisuuteen johtavia, muutoksia soluissa (Polo *et al.*, 2012).

Proteiineja koodaavien mRNA:den lisäksi muutoksia tapahtuu myös proteiinia koodaamattomien mikro-RNA:den (miRNA) määrässä. Tämä viittaa siihen, että Yamanakan tekijöiden pakotettu ilmentäminen soluissa vaikuttaa samankaltaisella tavalla sekä koodaavaan että ei-koodaavaan DNA:han. (Polo *et al.*, 2012). Erilaisten miRNA:den on havaittu joko inhiboivan tai vahvistavan iPS-solujen muodostumista vaikuttamalla geeniekspressioon post-transkriptionaalisesti (Huo & Zambidis, 2013).

## 4.2. Vaihe II: Maturaatio

Epitelisoitumista seuraavaa vaihetta kutsutaan maturaatioksi ja sen katsotaan alkavan ensimmäisten pluripotenttisuuteen liitettävien geenien vaikutusten ilmetessä. Maturaatiovaihe on epitelisoitumista pitkittyneempi, ja se voidaan jakaa aikaiseen ja myöhäiseen vaiheeseen, jotka eroavat toisistaan sen suhteen, mitkä geenit ovat jo aktivoituneet. Toinen transkriptionaalinen aalto sijoittuu ajallisesti maturaation myöhäiseen vaiheeseen (David & Polo, 2014).

Maturaatiovaiheen alku- ja keskivaihe ovat riippuvaisia Yamanakan tekijöiden eksogeenisestä ilmentämisestä siirtogeenien avulla, kun taas vaiheen loppupuolella soluista tulee pikkuhiljaa siirtogeneistä riippumattomia. Saavutettuaan siirtogeneistä riippumattoman tilan, solut eivät enää voi edetä uudelleenohjelmoinnissa pidemmälle ennen siirtogeenien hiljentämistä. Tämä johtuu siitä, että Yamanakan tekijät suppressoivat maturaatiovaiheen lopussa ekspressoitavia



pluripotentsuusgeenejä, jotka siten pääsevät aktivoitumaan kunnolla vasta uudelleenohjelmoinnin viimeisen vaiheen aikana. Kyseisten geenien ekspressointiin vaadittavat muutokset näyttävät siis tapahtuvan soluissa jo maturaatiovaiheen aikana, vaikka itse geenien ekspressoinnin vaikutukset pääsevät ilmenemään vasta stabilisaatiovaiheessa, siirtogeneien ekspression loputtua (Golipour *et al.*, 2012).

Maturaatiovaihe on kaiken kaikkiaan epitelisoitumisvaihetta heikommin tunnettu niin mekanismiensa kuin muutostensa osalta. Kuitenkin on selvää, että sen aikana soluissa tapahtuu pluripotentsuuteen liittyvien geenien vaiheittaista aktivoitumista. Lisäksi solut valmistautuvat hiljalleen toimimaan siirtogeneistä riippumattomasti (David & Polo, 2014). Vaihe itsessään on soluille epitelisoitumista haasteellisempi, sillä sen aikana menetetään huomattavasti enemmän soluja kuin aiemmin, mikä näkyy siinä, että läheskään kaikki maturaatiovaiheen aloittaneet solut eivät selviydy sen loppuun saakka. Tämä on ongelma, joka johtaa lopulta alhaiseen iPS-solujen saantoon (Tanabe *et al.*, 2013).

Siirtymää epitelisaatiovaiheen ja maturaatiovaiheen välillä voidaan pitää eräänlaisena pullonkaulana, sillä suuri osa soluista, joissa epitelisoituminen on tapahtunut onnistuneesti, ei kykene etenemään edes maturaatiovaiheen alkuun saakka. Tämä johtunee siitä, että suuri osa epitelisaation läpikäyneistä soluista tulee ikään kuin vastustuskykyisiksi uudelleenohjelmoinnille, kun taas jotkin harvat solut kykenevät jatkamaan suoraan seuraaville uudelleenohjelmoinnin tasoille (Buckley *et al.*, 2012; Polo *et al.*, 2012; David & Polo, 2014).

On mahdollista, että uudelleenohjelmointiin kohdistuva vastustuskyky on seurausta synnynnäisen immunitetin aktivoitumisesta osassa soluista, epitelisaatioon liittyvien muutosten seurauksena. Uudelleenohjelmointinsa keskeyttäneitä soluja voidaan kuitenkin yrittää pelastaa lisäämällä niissä Yamanakan tekijöiden yliekspressointia (Buckley *et al.*, 2012; Polo *et al.*, 2012). Lisäksi on todettu, että iPS-solujen saantoa voidaan parantaa käyttämällä Yamanakan tekijöiden lisäksi muita tekijöitä, joita ovat muun muassa LIN28, sykliini D1 ja p53-shRNA (small hairpin RNA). Näiden kolmen tekijän on havaittu merkittävästi lisäävän iPS-solupesäkkeiden muodostumista. Sykliini D1:n ja p53-shRNA:n toiminta uudelleenohjelmoinnin saannon parantamisessa perustuu niiden kykyyn estää solukuolemaa ja lisätä iPS-solupesäkkeiden leviämistä. LIN28:n rooli solupesäkkeiden muodostumisen tehostumisessa on vielä epäselvä, mutta sillä vaikuttaa olevan tärkeä rooli maturaatiovaiheen edistämässä (Tanabe *et al.*, 2013).

#### **4.2.1. Muutoksen seuraaminen – II. vaiheen markkerit**

Maturaatiovaiheen aikaista geenien aktivoitumista voidaan seurata eri pluripotenttisuusmarkkereiden avulla. Tutkimukset ovat osoittaneet tämän tapahtuvan vaiheittaisesti, sillä sekä yksittäissoluanalyysi (engl. single-cell analysis) että muut rinnakkaiset moniviljelmätekniikat (engl. multi-culture techniques) näyttävät joidenkin markkerien ilmenevän jo maturaatiovaiheen alussa, kun taas toiset ilmenevät selvästi myöhemmin, viimeiset vasta stabilisaatiovaiheen puolella (Buganim *et al.*, 2012; Polo *et al.*, 2012).

Markkereita, joita aletaan ilmentämään heti maturaatiovaiheen alussa, ovat ainakin FBXO15 (engl. F-box protein 15), SALL4 ja endogeeninen OCT4. Näiden jälkeen, maturaatiovaiheen jo edettyä pidemmälle, ilmennetään muun muassa NANOG:a sekä ESRR:ää (engl. estrogen-related receptor beta). Aivan vaiheen loppupuolella, juuri ennen stabilisaatiovaiheen alkua, on vielä mahdollista havaita uusia markkereita. Näihin kuuluvat endogeeninen SOX2 ja DPPA4 (engl. developmental pluripotency associated 4), jotka kielivät itsenäisestä uusiutumiskyvystä ilman siirtogeenien apua (Buganim *et al.*, 2012; Golipour *et al.*, 2012; Polo *et al.*, 2012).

#### **4.2.2. ”Toinen aalto”**

Toinen transkriptionaalinen aalto tapahtuu aivan maturaatiovaiheen loppupuolella ja on seurausta OCT4:n ja SOX2:n kohteiden ilmentymistasojen noususta, joka johtaa lopulta pluripotenttisuusgeenien, kuten NANOG:n, aktivaatioon. Tapahtuvat muutokset vahvistavat pluripotenttisuuteen liittyvien transkriptiotekijöiden verkostoa, ja johtavat lopulta sellaisiin epigeneettisiin muutoksiin, jotka mahdollistavat solujen pluripotenttisuuden ilman Yamanakan tekijöitä. Myös KLF4:llä on roolinsa toisessa aallossa, jonka aikana se osallistuu pluripotenttisuusgeenien ilmentämisen lisäykseen (Polo *et al.*, 2012).

Ensimmäisen aallon tavoin, myös toisen aallon aikana tapahtuu lyhyessä ajassa runsaasti muutoksia solun transkriptomissa. Kuten kuvasta 1 voidaan havaita, osa ensimmäisen aallon muutoksista sijoittuu vasta stabilisaatiovaiheen alkuun, johtuen luultavasti siitä, että Yamanakan tekijöiden ekspressoinnin aiheuttama tiettyjen pluripotenttisuusgeenien suppressointi lakkaa vasta silloin, mahdollistaen näiden geenien ja geenituotteiden kunnollisen aktivoitumisen (Golipour *et al.*, 2012; Polo *et al.*, 2012).

Toisen aallon päätyttyä, stabilisaatiovaiheen alkuvaiheessa, solujen voidaan katsoa päässeen hyvin lähelle iPS-soluille tyypillistä, ES-soluja vastaavaa transkriptia. Kuitenkin vaaditaan vielä joitain muutoksia, jotta soluviljelmissä saadaan tuotettua stabiileja ja loppuun asti ohjelmoituneita iPS-soluja (Polo *et al.*, 2012; David & Polo, 2014).

### 4.3. Vaihe III: Stabilisaatio

Stabilisaatiovaihe on uudelleenohjelmointiprosessin kolmas ja viimeinen vaihe. Sen aikana solut saavuttavat täyden pluripotentsuutensa. Lisäksi vaiheen aikana iPS-soluissa tapahtuu pluripotentsuutta tilaa stabiloivia muutoksia aikaansaaden solujen pysyvän ja vakaan pluripotentin tilan ja kyvyn itsenäiseen uusiutumiseen ilman siirtogenejä. (Polo *et al.*, 2012; David & Polo, 2014).

Kimeeristä yhdistämistä (engl. chimeric aggregation) hyödyntävien kokeiden avulla on saatu selville, että solut saavuttavat pluripotentsuuden hyvin nopeasti siirtogeenien suppressoinnin jälkeen. Pluripotentsuuden saavuttaminen mahdollistaa viimeisten muutosten tapahtumisen, ennen kuin solut ovat valmiita käytettäväksi (Chin *et al.*, 2009; David & Polo, 2014).

Stabilisaatiovaiheen aikana iPS-solujen kokoa ja määrää pyritään kasvattamaan. Tämä toteutetaan sarjasiirtojen avulla, mikä tarkoittaa käytännössä sitä, että soluviljelmiä jaetaan jatkuvasti uusille kasvatusalustoille, joilla niiden annetaan kasvaa ja jakaantua ennen seuraavaa siirtoa (Borys *et al.*, 2020). Sarjasiirtoja hyödynnetään myös ihmisen iPS-solujen (hiPS-solut) kasvatusolosuhteiden vaihteellisessa muuttamisessa uudelleenohjelmointiprosessin aikaisista olosuhteista niihin olosuhteisiin, joissa hES-soluja yleensä kasvatetaan. Lisäksi ne auttavat vähentämään hiPS-solujen ja hES-solujen välisiä eroavaisuuksia (Chin *et al.*, 2009).

#### 4.3.1. Stabilisaation aikana tapahtuvat muutokset

Epigeneettisellä muistilla tarkoitetaan iPS-solujen yhteydessä sitä, että solujen epigenetiikassa voidaan havaita niiden aikaisempaan erilaistuneisuuteen liittyviä piirteitä ajalta, jolloin ne olivat somaattisia soluja. Uudelleenohjelmoinnin aikana, erityisesti kolmannen vaiheen aikana, solut menettävät suurimman osan näistä piirteistä johtuen niissä tapahtuvista epigeneettisistä ja solujen transkriptiin liittyvistä muutoksista. Kuitenkin on mahdollista, että iPS-solut säilyttävät ainakin osan epigeneettisestä muististaan uudelleenohjelmoinnista huolimatta, mikä selittäisi ES-solujen ja iPS-solujen välillä havaittuja epigeneettisiä eroja (Kim *et al.*, 2010; Noguchi *et al.*, 2018).

Ajatusta epigeneettisen muistin säilymisestä tukee myös se, että monissa tapauksissa iPS-solut erilaistuvat mielellään takaisin alkuperäisen solulinjan soluiksi. Esimerkiksi verisoluista valmistettujen iPS-solujen on havaittu erilaistuvan fibroblastista alkuperää olevia iPS-soluja helpommin hematopoieettisen solulinjan soluiksi (Kim *et al.*, 2011). Eri alkuperää olevien iPS-solujen välillä onkin havaittu epigeneettisiä eroja (Nishizawa *et al.*, 2016).

Myös telomeerien elongaatio ja X-kromosomien aktivoituminen ovat seurausta epigeneettisistä muutoksista. Telomeerien elongaatiokyvyn saavuttaminen on välttämätöntä solun loputtoman uusiutumiskyvyn kannalta, sillä ilman sitä solujen telomeerit lyhenevät jokaisen jakautumiskerran yhteydessä estäen solun rajattoman jakautumiskyvyn (F. Li *et al.*, 2020). Stabilisaatiovaiheen aikana solujen telomeerit palautuvat lopulta samaan mittaan, jossa ne olivat solujen ollessa embryonaalisessa vaiheessa (Stadtfeld *et al.*, 2008; Marion *et al.*, 2009). Hiljennettyjen X-kromosomien uudelleenaktivoinnin merkitys on epäselvempi. Sitä on todettu tapahtuvan valmistettaessa iPS-soluja hiirten soluista. Ihmisperäisten iPS-solujen suhteen on kuitenkin yhä epäselvyyttä siitä, missä määrin tällaista inaktivaatiota tapahtuu (Pasque & Plath, 2015).

#### **4.3.2. Muutoksen seuraaminen – III. vaiheen markkerit**

Kuten aiempienkin vaiheiden kohdalla, myös stabilisaatiovaiheen etenemistä voidaan seurata markkerimolekyylien avulla. Stabilisaatiovaiheessa lisääntyvissä määrin ilmennettäviä markkereita ovat monet pluripotenttisuuteen liittyvät geenit, kuten endogeeninen SOX2, PECAM (engl. platelet endothelial cell adhesion molecule), DPPA4 ja LIN28A. Tutkimukset ovat osoittaneet näiden ilmentämisen kasvavan samanaikaisesti siirtogeenien ilmentämisen kanssa, mikä tukee ajatusta siitä, että siirtogeenien suppressointi on tärkeä osa stabilisaatiovaihetta (Golipour *et al.*, 2012; Polo *et al.*, 2012).

## **5. Uudelleenohjelmoinnin muutokset**

Uudelleenohjelmoinnin onnistumisen kannalta on tärkeää, että solut saadaan ekspressoimaan uudelleen tiettyjä pluripotenttisuutta ylläpitäviä geenejä, joiden ilmentäminen on lopetettu solun erilaistuessa. Toisaalta solut on myös saatava lopettamaan solun erilaistuneisuuteen liittyvien ja sitä ajavien ja ylläpitävien geenien ilmentäminen (David & Polo, 2014).

### **5.1. Epigeneettiset muutokset ja säätelijät uudelleenohjelmoinnissa**

Aiemmassa kehitysvaiheessa hiljennettyjen geenien uudelleenilmentäminen vaatii useita epigeneettisiä muutoksia uudelleenohjelmitavissa soluissa. Näihin epigeneettisiksi esteiksi kutsuttuihin muutoksiin kuuluvat muun muassa kromatiinin dekonkondensaatio, DNA:n demetylaatio, ja geeniä hiljentävien inaktiivisten histonimarkkereiden vaihtaminen aktiivisiin, transkriptiota käynnistäviin, histonimarkkereihin. Hiljennettävien geenien kohdalla on puolestaan tapahtuttava vastakkaiset muutokset, jotta kyseisiä geenejä ei enää ilmennettäisi (Pasque *et al.*, 2011).

Toistaiseksi on vielä epävarmaa, miten nämä epigeneettiset muutokset tarkalleen ottaen saadaan aikaan uudelleenohjelmointiprosessissa. Epäselvää on myös näiden muutosten tarkka ajoittuminen prosessin muihin vaiheisiin nähden (Soufi *et al.*, 2012). Tutkimusten avulla on kuitenkin löydetty yhteyksiä kromatiinia modifioivien tekijöiden ja pluripotenttisuutta säätelevän transkriptioverkoston väliltä (van den Hurk *et al.*, 2016). Lisäksi tutkimukset osoittavat OCT4:n, SOX2:n ja KLF4:n sitoutuvan epitelisoitumisvaiheen ja ensimmäisen aallon aikana huomattavasti normaalia useampiin geneihin, johtuen niiden pakotetusta yliekspressoinnista soluissa (Soufi *et al.*, 2012). Kun tämän lisäksi huomioidaan iPS-solujen uudelleenohjelmoinnin tehottomuus valmistettaessa niitä Yamanakan tekijöiden avulla, on syytä olettaa muidenkin säätelytekijöiden, kuten epigeneettisten modulaattoreiden, vaikuttavan prosessin indusoimiseen ja toisaalta myös pluripotentin tilan säilyttämiseen (van den Hurk *et al.*, 2016).

### **5.1.1. Kromatiinin dekonkondensaatio**

Kromatiinin kondensaatio on somaattisten solujen kehittyessä luonnollisesti tapahtuva prosessi, jonka seurauksena kromatiini pakataan tiiviiseen muotoon kromosomeiksi. DNA:n pakkaaminen alkaa DNA:n kiertämisellä histoneista koostuvien säätelyproteiinien ympärille, jolloin muodostuu nukleosomeja eli histoneiden ympärille pakattuja DNA-jaksoja. Nukleosomien muodostamisen on ajateltu inhiboivan uudelleenohjelmointia, sillä ne voivat estää tiettyjen transkriptiotekijöiden kiinnittymisen kohteisiinsa (Pasque *et al.*, 2011).

Kromatiinin dekonkondensaatio on kromatiinin kondensaatiolle vastakkainen tapahtuma, jossa aiemmin tiiviiksi pakattu kromatiini vapautuu löyhempään muotoon, mahdollistaen, tai ainakin helpottaen, uudelleenohjelmoinnille tärkeiden geenien transkriptiota (Pasque *et al.*, 2011).

### **5.1.2. DNA:n demetylaatio**

DNA:n demetylaatio tarkoittaa DNA:n metylaatiassa DNA:han liitettyjen metyyliryhmien poistamista. DNA:n metylaatiota tapahtuu somaattisten solujen erilaistumisen aikana ja sen tarkoituksena on tiettyjen, muun muassa pluripotenttisuuteen liittyvien, geenien hiljentäminen. Tämä mahdollistuu siten, että metyyliryhmiä liitetään sytosiini-aminohappotähteisiin, jotka sijaitsevat sellaisessa kohdassa DNA:ta, jossa sytosiini ja guaniini esiintyvät vierekkäin. Koska geenien promoottorialueet sisältävät yleensä runsaasti sytosiinista ja guaniinista koostuvia dinukleotideja, kertyy metyyliryhmiä erityisen runsaasti näille alueille (van den Hurk *et al.*, 2016; Pasque *et al.*, 2011). Promoottorialueisiin kiinnittyneet metyyliryhmät stabiloivat nukleosomeja ja estävät metyloituja promoottoreita seuraavien geenien transkriptiota (Gilbert, 2000).

### 5.1.3. *Histonimodifikaatiot*

Erilaistuneet somaattiset solut ja pluripotentit kantasolut eroavat toisistaan myös kromatiinimodifikaatioidensa osalta. Voimakkaasti tiivistyneet heterokromatiinijaksot ja niihin liittyvät repressiiviset histonimodifikaatiot, kuten H3K9:n (histoni H3, lysyiini 9) ja H3K27:n (histoni H3, lysyiini 27) metyloinnit, ovat tunnuksenomaisia nimenomaan erilaistuneille soluille. Nämä muutokset ovat tärkeitä, sillä niitä käytetään esimerkiksi tiettyjen geenien hiljentämiseen solujen erilaistuesssa (van den Hurk *et al.*, 2016).

ES-solun kaltaiset pluripotentit solut eroavat erilaistuneista soluista niissä esiintyvien kromatiinimodifikaatioiden suhteen. Pluripotenteille soluille tyypillisiä ovat heterokromatiinijaksojen sijaan löyhemmin pakkautuneet eukromatiinijaksot, sekä H3K4:n (histoni H3, lysyiini 4) metylaation ja H3/H4:n (histonit H3 ja H4) hyperasetylaation kaltaiset aktivoivat histonimarkkerit. Uudelleenohjelmoinnin kannalta on siis tärkeää, että somaattisten solujen erilaistuesssa modifioitu kromatiini saadaan palautettua takaisin siihen tilaan, jossa se oli ennen näitä modifikaatioita. Tällöin se vastaa paremmin ES-soluille tyypillistä kromatiinia, ilmentäen jälleen pluripotenttisuuteen liittyviä geenejä, joita erilaistuneissa soluissa suppressoidaan voimakkaasti (van den Hurk *et al.*, 2016).

## 6. **iPS-solujen pluripotenttisuuden testaaminen**

Ennen iPS-solujen käyttöönottoa on tärkeää varmistaa solujen uudelleenohjelmoitumisen onnistuminen testaamalla solujen pluripotenttisuutta. Testaamisen tarkoituksena on varmistaa solujen käyttökelpoisuus ja laatu niiden mahdollista jatkokäyttöä varten (Allison *et al.*, 2018).

### 6.1. **Pluripotenttisuuden määrittäminen**

Vaikka eri markkereiden avulla saadaankin hyvää tietoa uudelleenohjelmointiprosessin etenemisestä ja soluissa tapahtuvista vaiheittaisista muutoksista, on tärkeää huomioida, että niiden ilmentäminen ei itsessään takaa solujen täydellistä uudelleenohjelmoitumista, vaan tämän varmistamiseen tarvitaan muita keinoja (Buganim *et al.*, 2012; Golipour *et al.*, 2012; Polo *et al.*, 2012).

Erilaisia pluripotenttisuuden määrittämiseen soveltuvia menetelmiä on useita ja sopivan menetelmän valinta riippuu siitä, mihin testattavia iPS-soluja halutaan jälkeenkäyttää. Menetelmät perustuvat pääasiassa joko solujen erilaistumiskyvyn testaamiseen tai niiden transkriptomin bioinformatiikan menetelmiin perustuvaan analyysiin (Allison *et al.*, 2018).

### **6.1.1. Teratoomamääritys**

Erilaistumiskykyä voidaan testata esimerkiksi teratoomamäärityksessä (engl. teratoma assay), jossa testattavia iPS-soluja istutetaan immuunipuutteisiin hiiriin injektoiden avulla. Nämä solut muodostavat hiirissä teratoomien, eli itusoluista alkunsa saaneita kasvaimia. Testattavien solujen pluripotenttisyys voidaan määrittää tutkimalla näitä kasvaimia: mikäli teratooma sisältää kaikista kolmesta alkiokerroksesta muodostuneita soluja, voidaan testatut solut todeta pluripotenteiksi (Nelakanti *et al.*, 2015; Allison *et al.*, 2018).

### **6.1.2. Alkiovartalon erilaistumiskokeet**

Solujen erilaistumiskykyä voidaan testata myös alkiovartalon (engl. embryonic body, EB) erilaistumiskokeilla, joissa seurataan iPS-soluista muodostettujen alkiovartaloiden solujen erilaistumista. Erikokoisista iPS-soluklustereista muodostettuja EB:ta käyttämällä ja kasvumediaa ja muun muassa sen sisältämiä transkriptiotekijöitä säätelemällä voidaan myös vaikuttaa siihen, minkä alkiokerroksen soluja pluripotenteista soluista tuotetaan (Ng *et al.*, 2005; Allison *et al.*, 2018). Tekniikkaa voidaan siten hyödyntää myös silloin, kun halutaan tuottaa tietyn solulinjan soluja jatkokäyttöä varten (Lin & Chen, 2014).

### **6.1.3. Kimeerimääritys ja tetraploidisten alkioden täydennyskoe**

Testattavat solut voidaan todeta pluripotenteiksi myös, mikäli niitä käyttämällä onnistutaan tuottamaan kimeerisiä hiiriä, joilta löytyy ituradan säilymiskyky. Tässä metodissa testattavia soluja aggregoidaan hiirien alkioihin blastokysti-injektoiden avulla, mikä mahdollistaa kahta eri solulinjaa olevien solujen ilmenemisen samassa yksilössä. Kimeerimääritys ei kuitenkaan välttämättä takaa solujen täyttä pluripotenssia (Allison *et al.*, 2018; Kang & Gao, 2012).

Toinen samankaltainen mutta luotettavampi tekniikka on tetraploidisten, eli neljä kappaletta kutakin kromosomia kantavien, alkioden täydennyskoe. Siinä pyritään tuottamaan täysiaikaisia organismeja injektoimalla testattavia soluja hiiren tetraploidisiin blastokysteihin. Pluripotentit kantasolut mahdollistavat itsessään kehittymiskyvyttömiä tetraploidisten blastokystien kehityksen elinkelpoisiksi yksilöiksi kompensoimalla niissä kromosomimuutoksen vuoksi esiintyvää vakavaa kehitysvajetta, joka normaalisti aiheuttaa yksilön kuoleman ennen syntymää (Kang & Gao, 2012).

### **6.1.4. PluriTest-määritys**

PluriTest-määritys on vaihtoehtoinen menetelmä, solujen erilaistumiskyvyn testaamisen sijaan testattavien solujen transkriptomin määrittämiseen ja vertaamiseen sellaisten solujen transkriptomiin, joiden tiedetään olevan pluripotenteja. Testiä voidaan hyödyntää pluripotenttien solujen tunnistamiseen, mutta se ei varsinaisesti anna tuloksia solujen

erilaistumiskykyyn liittyen. Kuitenkin se on nopea tapa testata pluripotenttisuutta pienellä määrällä soluja ja toimii siten erityisen hyvin, kun uutta pluripotettia solulinjaa tuottaessa halutaan erottaa erilaistuneet solut erilaistumattomista (Allison *et al.*, 2018)

## **7. iPS-solujen käyttö**

Pluripotenttien kantasolujen käyttö on ollut haasteellista muun muassa ES-soluihin liittyvien eettisten ongelmien ja rajallisen saatavuuden, sekä toisaalta iPS-solujen valmistukseen ja erilaistamiseen liittyvien ratkaisemattomien ongelmien vuoksi. Nykyään saatavilla olevista kantasoluhoidoista turvallisimpia ja siten myös käytetyimpiä ovat somaattisia kantasoluja hyödyntävät hoidot, kuten luuydinsiirrot, joilla hoidetaan muun muassa verisairauksia kuten leukemiaa, mutta myös pluripotentteja kantasoluja hyödyntäviä hoitoja tutkitaan ja kehitetään aktiivisesti (Trounson & McDonald, 2015; Poulos, 2018; Aly, 2020).

### **7.1. iPS-solujen tarjoamat hyödyt, haasteet ja käyttökohteet**

Pluripotentteja kantasoluja ja niiden erilaistumismahdollisuuksia hyödyntäviä hoitoja tutkitaan paljon. Toistaiseksi niiden suhteen on kuitenkin vielä paljon epävarmuutta erityisesti hoitojen turvallisuuden suhteen, johtuen pluripotenttejen kantasolujen mahdolliseen hallitsemattomaan erilaistumiseen liittyvistä ongelmista (Trounson & McDonald, 2015; Aly, 2020; Deinsberger *et al.*, 2020). Tällä hetkellä yksi isoimmista haasteista onkin iPS-solujen erilaistumisen hallitsemiseen liittyvät haasteet ja toisaalta hallitsemattomasti erilaistuvien solujen taipumus syöpäkasvaimien muodostamiseen. Ongelmana ovat myös tekniikan kalleus, hitaus ja sitä rajoittavat säädökset (Cherry & Daley, 2013; P. Liu *et al.*, 2016).

iPS-soluilla on kuitenkin useita merkittäviä etuja verrattaessa niitä ES-soluihin. Ne muun muassa ratkaisevat ES-solujen eettisyyteen ja saatavuuteen liittyvät ongelmat. Regeneratiivisen lääketieteen sovelluksiin liittyen iPS-solut tarjoavat ratkaisun hylkimisongelmaan, sillä ne ovat immunologisesti yhteensopivia potilaan elimistön kanssa. Nykyisellään hylkimisreaktioon liittyvät ongelmat voidaan ratkaista vain potilaan loppuelämän mittaisten lääkehoitojen avulla. Mikäli siirrettävät kudokset, elimet ja solut voitaisiin valmistaa potilaan omista soluista, voitaisiin kyseinen ongelma välttää. Tämä mahdollistaisi tarkasti personalisoitujen hoitojen mahdollisuuden. Toistaiseksi menetelmä on kuitenkin suurimmilta osin liian riskialtis ja kallis saavuttaakseen laajaa käyttöä (P. Liu *et al.*, 2016).

iPS-soluja voidaan kehittää lähes mistä tahansa potilaan soluista, joten niiden tuottamiseen tarvittavien solujen kerääminen on huomattavasti helpompaa kuin muunlaisten kantasolujen



kerääminen. Lisäksi ne tarjoavat myös uniikkeja mahdollisuuksia *in vitro* -tautimallien kehittämiseen ja tutkimiseen, sillä niiden avulla tautimalleja voidaan valmistaa geneettisiä sairauksia, kuten Alzheimerin tautia, sairastavien potilaiden soluista (Nishikawa *et al.*, 2008; P. Liu *et al.*, 2016).

Tällä hetkellä iPS-soluja käytetään erityisesti tautimallinnuksissa ja uusien lääkkeiden kehittämisessä. Tautimallinnuksessa käytettyinä ne tarjoavat koe-eläimiä eettisemmän vaihtoehdon, joka on myös geneettisesti hiirtä tai muuta mallintamisessa käytettyä organismia tarkempi. Uusien lääkkeiden kehittämisessä pluripotenteista kantasoluista erilaistettuja soluja ja kudoksia voidaan käyttää muun muassa lääkeaineen toksisuuden testaamiseen sekä muihin vastaaviin lääkeainekokeisiin (Avior *et al.*, 2016; Parrotta *et al.*, 2019).

## **7.2. Tulevaisuuden näkymiä**

iPS-solut ja niihin liittyvä tutkimus ovat vielä tuoreita, sillä ennen vuotta 2006 pluripotentteja kantasoluja saatiin vain alkioista. Menetelmän kehittäminen ja mahdollisuus iPS-solujen valmistamiselle oli siis suuri harppaus eteenpäin. Vuonna 2006 julkaistu pioneeritutkimus aiheesta toikin vuonna 2012 Nobel-palkinnon Sir John Takahashille ja Shinya Yamanakalle (The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2012). Kuitenkin iPS-solut tarjoavat jo tällä hetkellä uusia mahdollisuuksia niin lääketieteen tutkimukselle kuin erilaisten sairauksien hoidoille (P. Liu *et al.*, 2016).

iPS-soluja käytetään erilaisten hoitokeinojen, kuten potilaan omia uudelleenohjelmoituja soluja hyödyntävien elin-, solu- ja/tai kudossiirteiden valmistamisessa ja tutkimisessa. Tällaiset uudenlaiset korvaushoidot ovat tekniikan tuoreudesta johtuen kuitenkin vasta kehitysasteella (Cherry & Daley, 2013; P. Liu *et al.*, 2016) Kuitenkin Japanissa aloitettiin vuonna 2014 maailman ensimmäinen potilaan omista iPS-soluista erilaistettuja verkkokalvon pigmenttisoluja hyödyntävä kliininen tutkimus, jonka tavoitteena oli hoitaa potilailla esiintyvää verkkokalvon ikärappeumaa (Garber, 2015). Tutkimuksen tuloksena oli ensimmäinen onnistunut tekniikkaa hyödyntävä siirto. Myöhemmin, vuonna 2017, toteutettiin ensimmäinen onnistunut allogeeninen verkkokalvon progenitorisolujen (engl. retinal progenitor cell, RPC) transplantaatio (The World's First Allogeneic iPS-derived Retina Cell Transplant, Japan Agency for Medical Research and Development).

Masayo Takahashin ryhmä on onnistunut kehittämään menetelmän laadukkaiden RPC-kalvojen tuottamiseksi koneellisesti ja tuotettujen kalvojen laadun testaamiseksi. Löytö on tärkeä, sillä tätä ennen tätä testaus ei ollut mahdollista tuhoamatta sen yhteydessä herkkää yksikerroksista solukkoa. Lisäksi koneellinen tuottomahdollisuus tarjoaa mahdollisuuksia

RPC-kalvojen tehokkaaseen ja nopeaan tuottoon ilman korkeita kustannuksia (Matsumoto *et al.*, 2019; Ye *et al.*, 2020) Tutkimuksen kohteeksi ensimmäisiin kliinisiin tutkimuksiin ja niiden kehittämiseen on valittu juuri retinan pigmenttisolut, sillä RPC-kalvojen ylläpitäminen on kohtalaisen helppoa muihin solurakenteisiin verrattuna (Garber, 2015; Jha & Bharti, 2015).

Indusoidut pluripotentit kantasolut tarjoavat runsaasti uusia mahdollisuuksia lääketieteelle. Aiheeseen liittyen riittää vielä paljon tutkittavaa ja ratkaistavaa, mutta iPS-solut tarjoavat todennäköisesti tulevaisuudessa ennennäkemättömiä ratkaisuja regeneratiivisen lääketieteen ongelmiin niin kudosten, solujen ja elinten korvaushoitona kuin *in vitro* -tautimallinnusten osalta.

Muut uudet menetelmät kuten uuden sukupolven sekvensointitekniikka (engl. next-generation sequencing, NGS) ja CRISPR (engl. clustered regularly-interspaced short palindromic repeats) tarjoavat iPS-soluteknologiaan yhdistettynä lisää mahdollisuuksia. NGS-teknologiaa voidaan hyödyntää solujen tehokkaassa ja tarkassa karakterisoinnissa, kun taas CRISPR tarjoaa mahdollisuuksia iPS-solujen kromatiinin tarkkaan muokkaamiseen (P. Liu *et al.*, 2016).

## 8. Lähteet

- Aasen, T., Raya, A., Barrero, M. J., Garreta, E., Consiglio, A., Gonzalez, F., Vassena, R., Bilić, J., Pekarik, V., Tiscornia, G., Edel, M., Boué, S., & Belmonte, J. C. I. (2008). Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nature Biotechnology*, 26(11), 1276–1284. <https://doi.org/10.1038/NBT.1503>
- Allison, T. F., Andrews, P. W., Avior, Y., Barbaric, I., Benvenisty, N., Bock, C., Brehm, J., Brüstle, O., Damjanov, I., Elefanty, A., Felkner, D., Gokhale, P. J., Halbritter, F., Healy, L. E., Hu, T. X., Knowles, B. B., Loring, J. F., Ludwig, T. E., Mayberry, R., ... Yamanaka, S. (2018). Assessment of established techniques to determine developmental and malignant potential of human pluripotent stem cells. *Nature Communications*, 9(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04011-3>
- Aly, R. M. (2020). Current state of stem cell-based therapies: an overview. *Stem Cell Investigation*, 7(8). <https://doi.org/10.21037/SCI-2020-001>
- Avior, Y., Sagi, I., & Benvenisty, N. (2016). Pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17(3), 170–182. <https://doi.org/10.1038/nrm.2015.27>
- Borys, B. S., So, T., Colter, J., Dang, T., Roberts, E. L., Revay, T., Larijani, L., Krawetz, R., Lewis, I., Argiropoulos, B., Rancourt, D. E., Jung, S., Hashimura, Y., Lee, B., & Kallos, M. S. (2020). Optimized serial expansion of human induced pluripotent stem cells using low-density inoculation to generate clinically relevant quantities in vertical-wheel bioreactors. *STEM CELLS Translational Medicine*, 9(9), 1036–1052. <https://doi.org/10.1002/SCTM.19-0406>

- Brambrink, T., Foreman, R., Welstead, G. G., Lengner, C. J., Wernig, M., Suh, H., & Jaenisch, R. (2008). Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. *Cell Stem Cell*, 2(2), 151–159. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2008.01.004>
- Buckley, S. M., Aranda-Orgilles, B., Strikoudis, A., Apostolou, E., Loizou, E., Moran-Crusio, K., Farnsworth, C. L., Koller, A. A., Dasgupta, R., Silva, J. C., Stadtfeld, M., Hochedlinger, K., Chen, E. I., & Aifantis, I. (2012). Regulation of Pluripotency and Cellular Reprogramming by the Ubiquitin Proteasome System. *Cell Stem Cell*, 11(6), 783–798. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2012.09.011>
- Buganim, Y., Faddah, D. A., Cheng, A. W., Itskovich, E., Markoulaki, S., Ganz, K., Klemm, S. L., Van Oudenaarden, A., & Jaenisch, R. (2012). Single-cell expression analyses during cellular reprogramming reveal an early stochastic and a late hierarchic phase. *Cell*, 150(6), 1209–1222. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2012.08.023>
- Buganim, Y., Faddah, D. A., & Jaenisch, R. (2013). Mechanisms and models of somatic cell reprogramming. In *Nature Reviews Genetics*, 14(6), 427–439. <https://doi.org/10.1038/nrg3473>
- Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., & Smith, A. (2003). Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*, 113(5), 643–655. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00392-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00392-1)
- Cherry, A. B. C., & Daley, G. Q. (2013). REPROGRAMMED CELLS FOR DISEASE MODELING AND REGENERATIVE MEDICINE. *Annual Review of Medicine*, 64, 277–290. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-MED-050311-163324>
- Chin, M. H., Mason, M. J., Xie, W., Volinia, S., Singer, M., Peterson, C., Ambartsumyan, G., Aimiwu, O., Richter, L., Zhang, J., Khvorostov, I., Ott, V., Grunstein, M., Lavon, N., Benvenisty, N., Croce, C. M., Clark, A. T., Baxter, T., Pyle, A. D., ... Lowry, W. E. (2009). Induced Pluripotent Stem Cells and Embryonic Stem Cells Are Distinguished by Gene Expression Signatures. *Cell Stem Cell*, 5(1), 111–123. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2009.06.008>
- David, L., & Polo, J. M. (2014). Phases of reprogramming. *Stem Cell Research*, 12(3), 754–761. <https://doi.org/10.1016/J.SCR.2014.03.007>
- Deinsberger, J., Reisinger, D., & Weber, B. (2020). Global trends in clinical trials involving pluripotent stem cells: a systematic multi-database analysis. *Npj Regenerative Medicine*, 5(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41536-020-00100-4>
- Evans, M. J., & Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292(5819), 154–156. <https://doi.org/10.1038/292154a0>
- Garber, K. (2015). RIKEN suspends first clinical trial involving induced pluripotent stem cells. *Nature Biotechnology*, 33(9), 890–891. <https://doi.org/10.1038/NBT0915-890>
- Gilbert, S. F. (2000). *Methylation Pattern and the Control of Transcription*. Sunderland (MA): Sinauer Associates (2000) Developmental Biology. 6th edition. Saatavissa: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10038/>

- Gilson, E., & Géli, V. (2007). How telomeres are replicated. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(10), 825–838. <https://doi.org/10.1038/NRM2259>
- Golipour, A., David, L., Liu, Y., Jayakumaran, G., Hirsch, C. L., Trcka, D., & Wrana, J. L. (2012). A late transition in somatic cell reprogramming requires regulators distinct from the pluripotency network. *Cell Stem Cell*, 11(6), 769–782. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2012.11.008>
- Herr, W., & Cleary, M. A. (1995). The POU domain: versatility in transcriptional regulation by a flexible two-in-one DNA-binding domain. *Genes & Development*, 9(14), 1679–1693. <https://doi.org/10.1101/GAD.9.14.1679>
- Huang, J., Chen, T., Liu, X., Jiang, J., Li, J., Li, D., Liu, X. S., Li, W., Kang, J., & Pei, G. (2009). More synergetic cooperation of Yamanaka factors in induced pluripotent stem cells than in embryonic stem cells. *Cell Research*, 19(10), 1127–1138. <https://doi.org/10.1038/cr.2009.106>
- Huo, J. S., & Zambidis, E. T. (2013). Pivots of pluripotency: the roles of non-coding RNA in regulating embryonic and induced pluripotent stem cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830(2), 2385–2394. <https://doi.org/10.1016/J.BBAGEN.2012.10.014>
- Jha, B. S., & Bharti, K. (2015). Regenerating Retinal Pigment Epithelial Cells to Cure Blindness: A Road Towards Personalized Artificial Tissue. *Current Stem Cell Reports*, 1(2), 79–91. <https://doi.org/10.1007/S40778-015-0014-4>
- Kang, L., & Gao, S. (2012). Pluripotency of induced pluripotent stem cells. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 3(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/2049-1891-3-5/FIGURES/2>
- Kent, L. (2009). Culture and Maintenance of Human Embryonic Stem Cells. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, (34), 1427. <https://doi.org/10.3791/1427>
- Kim, K., Doi, A., Wen, B., Ng, K., Zhao, R., Cahan, P., Kim, J., Aryee, M. J., Ji, H., Ehrlich, L. I. R., Yabuuchi, A., Takeuchi, A., Cunniff, K. C., Hongguang, H., McKinney-Freeman, S., Naveiras, O., Yoon, T. J., Irizarry, R. A., Jung, N., ... Daley, G. Q. (2010). Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature*, 467(7313), 285–290. <https://doi.org/10.1038/NATURE09342>
- Kumar, D., Talluri, T. R., Anand, T., & Kues, W. A. (2015). Induced pluripotent stem cells: Mechanisms, achievements and perspectives in farm animals. *World Journal of Stem Cells*, 7(2), 315–328. <https://doi.org/10.4252/WJSC.V7.I2.315>
- Li, F., Ge, Y., Liu, D., & Songyang, Z. (2020). The role of telomere-binding modulators in pluripotent stem cells. *Protein & Cell*, 11(1), 60–70. <https://doi.org/10.1007/S13238-019-0651-Y>
- Li, R., Liang, J., Ni, S., Zhou, T., Qing, X., Li, H., He, W., Chen, J., Li, F., Zhuang, Q., Qin, B., Xu, J., Li, W., Yang, J., Gan, Y., Qin, D., Feng, S., Song, H., Yang, D., ... Pei, D. (2010). A mesenchymal-to-Epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell*, 7(1), 51–63. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.04.014>

- Li, Y., McClintick, J., Zhong, L., Edenberg, H. J., Yoder, M. C., & Chan, R. J. (2005). Murine embryonic stem cell differentiation is promoted by SOCS-3 and inhibited by the zinc finger transcription factor Klf4. *Blood*, *105*(2), 635–637. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2004-07-2681>
- Li, Y., Zhao, H., Lan, F., Lee, A., Chen, L., Lin, C., Yao, Y., & Li, L. (2010). Generation of human-induced pluripotent stem cells from gut mesentery-derived cells by ectopic expression of OCT4/SOX2/NANOG. *Cellular Reprogramming*, *12*(3), 237–247. <https://doi.org/10.1089/cell.2009.0103>
- Lin, Y., & Chen, G. (2014). Embryoid body formation from human pluripotent stem cells in chemically defined E8 media [online]. *StemBook*. Harvard Stem Cell Institute. [Viitattu 14.4.2023]. Saatavissa: <https://doi.org/10.3824/STEMBOOK.1.98.1>
- Liu, P., Li, K., & Xu, S. (2016). The future of iPS cells in advancing regenerative medicine. *Genetics Research*, *98*, e4. <https://doi.org/10.1017/S001667231600001X>
- Liu, X., Huang, J., Chen, T., Wang, Y., Xin, S., Li, J., Pei, G., & Kang, J. (2008). Yamanaka factors critically regulate the developmental signaling network in mouse embryonic stem cells. *Cell Research* *2008* *18*(12), 1177–1189. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.309>
- Lo, B., & Parham, L. (2009). Ethical Issues in Stem Cell Research. *Endocrine Reviews*, *30*(3), 204–213. <https://doi.org/10.1210/ER.2008-0031>
- Lodrini, A. M., Barile, L., Rocchetti, M., & Altomare, C. (2020). Human Induced Pluripotent Stem Cells Derived from a Cardiac Somatic Source: Insights for an In-Vitro Cardiomyocyte Platform. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(2), 507. <https://doi.org/10.3390/IJMS21020507>
- Maekawa, M., Yamaguchi, K., Nakamura, T., Shibukawa, R., Kodanaka, I., Ichisaka, T., Kawamura, Y., Mochizuki, H., Goshima, N., & Yamanaka, S. (2011). Direct reprogramming of somatic cells is promoted by maternal transcription factor Glis1. *Nature*, *474*(7350), 225–228. <https://doi.org/10.1038/NATURE10106>
- Marion, R. M., Strati, K., Li, H., Tejera, A., Schoeftner, S., Ortega, S., Serrano, M., & Blasco, M. A. (2009). Telomeres Acquire Embryonic Stem Cell Characteristics in Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell*, *4*(2), 141–154. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.12.010>
- Matsumoto, E., Koide, N., Hanzawa, H., Kiyama, M., Ohta, M., Kuwabara, J., Takeda, S., & Takahashi, M. (2019). Fabricating retinal pigment epithelial cell sheets derived from human induced pluripotent stem cells in an automated closed culture system for regenerative medicine. *PLoS ONE*, *14*(3), e0212369. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0212369>
- Matthews, K. R. W., & Morali, D. (2020). National human embryo and embryoid research policies: a survey of 22 top research-intensive countries. *Regenerative medicine*, *15*(7), 1905–1917. <https://doi.org/10.2217/RME-2019-0138>

- Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Okita, K., Mochiduki, Y., Takizawa, N., & Yamanaka, S. (2007). Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nature Biotechnology*, 26(1), 101–106. <https://doi.org/10.1038/nbt1374>
- Nakagawa, M., Takizawa, N., Narita, M., Ichisaka, T., & Yamanaka, S. (2010). Promotion of direct reprogramming by transformation-deficient Myc. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(32), 14152–14157. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1009374107/-DCSUPPLEMENTAL/SD01.XLS>
- Nelakanti, R. V., Kooreman, N. G., & Wu, J. C. (2015). Teratoma formation: a tool for monitoring pluripotency in stem cell research. *Current protocols in stem cell biology*, 32, 4A.8.1–4A.8.17. <https://doi.org/10.1002/9780470151808.sc04a08s32>
- Ng, E. S., Davis, R. P., Azzola, L., Stanley, E. G., & Elefanty, A. G. (2005). Forced aggregation of defined numbers of human embryonic stem cells into embryoid bodies fosters robust, reproducible hematopoietic differentiation. *Blood*, 106(5), 1601–1603. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2005-03-0987>
- Nishikawa, S. I., Goldstein, R. A., & Nierras, C. R. (2008). The promise of human induced pluripotent stem cells for research and therapy. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 9(9), 725–729. <https://doi.org/10.1038/NRM2466>
- Nishizawa, M., Chonabayashi, K., Nomura, M., Tanaka, A., Nakamura, M., Inagaki, A., Nishikawa, M., Takei, I., Oishi, A., Tanabe, K., Ohnuki, M., Yokota, H., Koyanagi-Aoi, M., Okita, K., Watanabe, A., Takaori-Kondo, A., Yamanaka, S., & Yoshida, Y. (2016). Epigenetic Variation between Human Induced Pluripotent Stem Cell Lines Is an Indicator of Differentiation Capacity. *Cell Stem Cell*, 19(3), 341–354. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2016.06.019>
- Noguchi, H., Miyagi-Shiohira, C., & Nakashima, Y. (2018). Induced Tissue-Specific Stem Cells and Epigenetic Memory in Induced Pluripotent Stem Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4), 930. <https://doi.org/10.3390/IJMS19040930>
- Okita, K., Ichisaka, T., & Yamanaka, S. (2007). Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*, 448(7151), 313–317. <https://doi.org/10.1038/NATURE05934>
- Pan, G., & Thomson, J. A. (2007). Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. *Cell Research*, 17(1), 42–49. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7310125>
- Parrotta, E. I., Scalise, S., Scaramuzzino, L., & Cuda, G. (2019). Stem cells: The game changers of human cardiac disease modelling and regenerative medicine. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(22), 5760. <https://doi.org/10.3390/ijms20225760>
- Pasque, V., Jullien, J., Miyamoto, K., Halley-Stott, R. P., & Gurdon, J. B. (2011). Epigenetic factors influencing resistance to nuclear reprogramming. *Trends in Genetics*, 27(12), 516–525. <https://doi.org/10.1016/J.TIG.2011.08.002>
- Pasque, V., & Plath, K. (2015). X Chromosome Reactivation in Reprogramming and in Development. *Current Opinion in Cell Biology*, 37, 75–83. <https://doi.org/10.1016/J.CEB.2015.10.006>

- 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 reprogramming somatic cells into iPS cells. *Cell*, *151*(7), 1617–1632. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2012.11.039>
- Polo, J. M., & Hochedlinger, K. (2010). When fibroblasts MET iPSCs. *Cell Stem Cell*, *7*(1), 5–6. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.05.018>
- Poulos, J. (2018). The limited application of stem cells in medicine: a review. *Stem Cell Research & Therapy*, *9*(1), 1. <https://doi.org/10.1186/S13287-017-0735-7>
- Regulation of stem cell research in Finland | Eurostemcell.* (n.d.). [Viitattu 13.2.2023]. Saatavissa: <https://www.eurostemcell.org/regulation-stem-cell-research-finland>
- Romito, A., & Cobellis, G. (2016). Pluripotent Stem Cells: Current Understanding and Future Directions. *Stem Cells International*, *9451492*. <https://doi.org/10.1155/2016/9451492>
- Rowland, B. D., Bernards, R., & Peeper, D. S. (2005). The KLF4 tumour suppressor is a transcriptional repressor of p53 that acts as a context-dependent oncogene. *Nature Cell Biology*, *7*(11), 1074–1082. <https://doi.org/10.1038/NCB1314>
- Sammak, S., Hamdani, N., Gorrec, F., Allen, M. D., Freund, S. M. V., Bycroft, M., & Zinzalla, G. (2019). Crystal Structures and Nuclear Magnetic Resonance Studies of the Apo Form of the c-MYC:MAX bHLHZip Complex Reveal a Helical Basic Region in the Absence of DNA. *Biochemistry*, *58*(29), 3144–3154. [https://doi.org/10.1021/ACS.BIOCHEM.9B00296/ASSET/IMAGES/LARGE/BI-2019-002966\\_0007.JPEG](https://doi.org/10.1021/ACS.BIOCHEM.9B00296/ASSET/IMAGES/LARGE/BI-2019-002966_0007.JPEG)
- Schwartz, P. H., Brick, D. J., Nethercott, H. E., & Stover, A. E. (2011). Traditional Human Embryonic Stem Cell Culture. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *767*, 107–123. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-201-4\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-201-4_8)
- Shi, G., & Jin, Y. (2010). Role of Oct4 in maintaining and regaining stem cell pluripotency. *Stem Cell Research and Therapy*, *1*(5), 1–9. <https://doi.org/10.1186/SCRT39/FIGURES/2>
- Sipos, F., & Galamb, O. (2012). Epithelial-to-mesenchymal and mesenchymal-to-epithelial transitions in the colon. *World Journal of Gastroenterology*, *18*(7), 601–608. <https://doi.org/10.3748/WJG.V18.I7.601>
- Solter, D., & Knowles, B. B. (1975). Immunosurgery of mouse blastocyst. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *72*(12), 5099–5102. <https://doi.org/10.1073/PNAS.72.12.5099>
- Soufi, A., Donahue, G., & Zaret, K. S. (2012). Facilitators and impediments of the pluripotency reprogramming factors' initial engagement with the genome. *Cell*, *151*(5), 994–1004. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2012.09.045>
- Soundararajan, M., & Kannan, S. (2018). Fibroblasts and mesenchymal stem cells: Two sides of the same coin? *Journal of Cellular Physiology*, *233*(12), 9099–9109. <https://doi.org/10.1002/JCP.26860>

- Stadtfeld, M., Maherali, N., Breault, D. T., & Hochedlinger, K. (2008). Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse. *Cell Stem Cell*, 2(3), 230–240. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2008.02.001>
- Sviridova-Chailakhyan, T. A., Tzoy, N. G., Panchenko, M. M., Akatov, V. S., & Chailakhyan, L. M. (2008). An efficient method for isolation of inner cell masses from the mouse blastocysts for culturing embryonic stem cells. *Doklady Biological Sciences: Proceedings of the Academy of Sciences of the USSR, Biological Sciences Sections / Translated from Russian*, 423, 469–472. <https://doi.org/10.1134/S001249660806029X>
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4), 663–676. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2006.07.024>
- Tanabe, K., Nakamura, M., Narita, M., Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2013). Maturation, not initiation, is the major roadblock during reprogramming toward pluripotency from human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(30), 12172–12179. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1310291110>
- The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2012*. (n.d.). [Viitattu 17.3.2023]. Saatavissa <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2012/summary/>
- The World's First Allogeneic iPS-derived Retina Cell Transplant | Japan Agency for Medical Research and Development*. (n.d.). [Viitattu 18.3.2023]. Saatavissa: <https://www.amed.go.jp/en/seika/fy2018-05.html>
- Trounson, A., & McDonald, C. (2015). Stem Cell Therapies in Clinical Trials: Progress and Challenges. *Cell Stem Cell*, 17(1), 11–22. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2015.06.007>
- Van Den Hurk, M., Kenis, G., Bardy, C., Van Den Hove, D. L., Gage, F. H., Steinbusch, H. W., & Rutten, B. P. (2016). Transcriptional and epigenetic mechanisms of cellular reprogramming to induced pluripotency. *Epigenomics*, 8(8), 1131–1149. <https://doi.org/10.2217/EPI-2016-0032>
- Wang, X., & Dai, J. (2010). Concise Review: Isoforms of OCT4 Contribute to the Confusing Diversity in Stem Cell Biology. *Stem Cells*, 28(5), 885–893. <https://doi.org/10.1002/STEM.419>
- Weltner, J., Trokovic, R., & Otonkoski, T. (2014). Indusoidut pluripotentit kantasolut lääketieteellisessä tutkimuksessa. *Lääketieteellinen Aikakausikirja Duoecim*, 130(8), 785–792. <https://www.duoecimlehti.fi/duo11597>
- Wobus, A. M., & Boheler, K. R. (2005). Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiological Reviews*, 85(2), 635–678. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00054.2003>
- Wong, F. C. K., Chambers, I., & Mullin, N. P. (2016). *Sox2: Biology and Role in Development and Disease*. Academic Press. SOX2-Dependent Regulation of Pluripotent Stem Cells. 163–185. Saatavissa: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800352-7.00010-4>



- Ye, K., Takemoto, Y., Ito, A., Onda, M., Morimoto, N., Mandai, M., Takahashi, M., Kato, R., & Osakada, F. (2020). Reproducible production and image-based quality evaluation of retinal pigment epithelium sheets from human induced pluripotent stem cells. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70979-y>
- Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G. A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, I. I., & Thomson, J. A. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, *318*(5858), 1917–1920. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1151526>