





## **KAJIAN INDUCED PLURIPOTENT STEMCELL(iPS) (HARAPAN DAN TANTANGAN)**

Masagus Zainuri\* dan    

Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan  
Jl. Percetakan Negara No. 29, Jakarta. Indonesia  
E-mail :masagus\_zainuria@yahoo.com

## **INDUCED PLURIPOTENT STEMCELL(iPS) ASSESSMENT (HOPE AND CHALLENGE)**

### **Abstract**

*Induced Pluripotent Stemcell (iPS) are adult cells which the genetic information in the nucleus of those cells being reprogrammed (reprogram) by inserting exogenous pluripotential genes. The exogenous gene transduction is using vectors, such as lentivirus, retrovirus, or adenovirus, which suppressed the gene expression of the original cells, so they will express the transduced exogenous gene. Viral vectors are then used to reprogramming and producing iPS clones that are pluripotent. iPS derived from adult cells of patient with certain diseases will be used as a tool to study the mechanisms of those specific diseases and the effects of selected drugs against the diseases. Several previous studies have shown that iPS clones developed from specific genetic disease have its original genotype and retain the character of the response to the drug that similar as the original adult cells. Opportunities for the utilization of autologous iPS cell therapy in the future is wide open as expected iPS transplant will not be rejected when transplanted back to the patient. Behind all its potential, iPS production is still facing some problems to be applicable clinically. The use of viruses as vectors may cause problems due to virus gene sequences may be integrated into the genome of the DNA donor cell, thereby causing mutations of the iPS clones. Several subsequent studies have succeeded in replacing the use of viruses as vectors, but the level of efficiency obtained is still very low. Another problem that arises is that epigenetic changes may occur in iPS cultures. Many advanced research related to iPS may be developed in Indonesia and is necessary to improve the production efficiency of iPS and solve iPS clones epigenetic changes problems in the future.*

**Keywords:** *iPS, pluripotency, transduction, transfection.*

### **Abstrak**

*Induced Pluripotent Stemcell (iPS) adalah sel somatic dewasa yang informasi genetika dalam inti selnyadiprogram ulang (reprogram) dengan cara memasukkan gen-gen eksogen yang memberikan ciri pluripotensial. Transduksi gen eksogen ini menggunakan vektor, seperti lentivirus, retrovirus, atau adenovirus, yang ditekan ekspresi gen aslinya, sehingga akan mengekspresikan sel eksogen yang ditransduksikan. Virus vektor tersebut selanjutnya digunakan untuk reprogram dan membuat klon iPS yang bersifat pluripoten. Sel dewasa yang akan dijadikan iPS diambil dari penderita penyakit tertentu dan selanjutnya klon iPS dapat dimanfaatkan sebagai alat untuk mempelajari mekanisme terjadinya penyakit dan efek obat terpilih terhadap penyakit tersebut. Beberapa penelitian*

Submit : 07-02-2013 Revised : 22-04-2013 Accepted : 02-09-2013

terdahulu telah membuktikan bahwa kloni PS yang dikembangkan dari penderita penyakit genetik tertentu tetap memiliki karakter genotip dan respon terhadap obat yang sama dengan sel dewasa asalnya. Peluang pemanfaatan iPS otologus untuk terapi sel dimasa mendatang terbuka lebar karena diperkirakan iPS tidak akan mengalami proses rejeksi saat ditransplantasikan kembali kepada penderita yang bersangkutan. Dibalik segala potensinya, iPS masih memiliki beberapa kekurangan untuk diaplikasikan secara klinis. Penggunaan virus sebagai vektor dapat menimbulkan masalah karena sekuens gen virus mungkin berintegrasi dengan genom DNA sel donor, sehingga akan menyebabkan risiko terjadinya mutasi pada klon iPS yang dihasilkan. Beberapa penelitian selanjutnya berhasil mengganti penggunaan virus sebagai vektor, namun tingkat efisiensi yang didapat masih sangat rendah. Masalah lain yang timbul adalah perubahan epigenetik yang dapat terjadi pada kultur iPS. Banyak penelitian lanjutan terkait iPS yang dapat dikembangkan di Indonesia dan sangat diperlukan untuk meningkatkan efisiensi produksi iPS dan mengatasi masalah perubahan epigenetik klon iPS dimasa mendatang.

**Kata Kunci:** iPS, pluripotensi, transduksi, transfeksi.

## PENDAHULUAN

Sel yang mempunyai kemampuan untuk memperbaharui dirinya (*self renewal*) dan menghasilkan sel awal (progenitor) serta dapat berdiferensiasi menjadi berbagai jenis sel disebut sel punca. Saat ini dikenal 3 jenis sel punca, yaitu sel punca dewasa (*non-embryonic/somatic/adult stem cells*), sel punca embrional (*embryonic stem cells/ESC*) dan sel punca pluripoten hasil induksi dari sel somatik (*induced pluripotent stem cells*), selanjutnya disebut iPS. Sel punca dewasa (SPD) dapat diaplikasikan autogenik secara klinis, namun mempunyai keterbatasan antara lain bersifat oligopoten atau multipoten, sehingga jenis sel hasil diferensiasinya juga terbatas. Sel punca embrional (SPE) bersifat pluripoten, namun SPE juga memiliki lebih banyak keterbatasan dibandingkan SPD. Waktu pembuatan SPE yang harus tepat, biaya penyimpanan yang mahal, reaksi penolakan/rejeksi jika ditransplantasikan ke individu yang berbeda (alotransplantasi) dan masalah etika yang kontroversial menyebabkan SPE mengalami banyak hambatan untuk diaplikasikan secara klinis pada manusia.<sup>1</sup>

*Induced Pluripotent Stemcell* adalah sel somatik dewasa yang informasi genetika

dalam inti selnya diprogram ulang (reprogram) dengan cara memasukkan gen-gen eksogen, seperti OCT4, SOX2, NANOG dan LIN28 atau OCT3/4, SOX2, KLF4 dan c-MYC, untuk memberikan ciri pluripotensial, menyerupai SPE.<sup>2</sup> Sifat pluripoten ini memungkinkan iPS dapat diinduksi untuk berdiferensiasi menjadi segala jenis sel dewasa, sehingga bisa dimanfaatkan sebagai alternatif sumber sel punca untuk terapi sel autogenik dimasa mendatang.

Pada tahun 2006, Yamanaka melaporkan bahwa faktor transkripsi *Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*, and *Myc* berperan dalam proses pemrograman ulang sel somatik menjadi iPS yang bersifat pluripoten. Yamanaka menggunakan bantuan vektor retrovirus untuk mentransduksi keempat faktor transkripsi.<sup>3</sup> Keberhasilan Yamanaka, diikuti oleh para ilmuwan lainnya, yang tidak saja dapat menginduksi sel punca pluripoten dari mencit, tapi juga dari sel manusia. Hasil temuan ini berupa klon iPS yang terbukti secara fungsional dan molekular menyerupai sel punca embrional.<sup>4,5,6</sup>

Penelitian mengenai iPS terus berkembang, baik yang mengarah ke metoda pembuatannya, maupun ke arah potensi aplikasi iPS secara klinis. KloniPS yang

dikembangkan dari penderita penyakit genetik diketahui tetap memiliki karakter genotip dan memberikan respon yang sama terhadap obat, seperti sel asalnya.<sup>7</sup> Hal ini menjadikan iPS dapat menjadi alat yang ampuh untuk mempelajari mekanisme terjadinya penyakit, efek pengobatan, dan membuka jalan untuk ditemukannya obat atau teknik terapi baru. Selain itu iPS yang dikembangkan dari seseorang tidak akan menimbulkan reaksi penolakan bila ditransplantasikan kembali kepada orang tersebut karena kesamaan profil genetik (transplantasi autologus/autogenik).<sup>8</sup> Dibalik segala potensi yang dimilikinya, iPS masih memiliki beberapa kekurangan dalam proses pembuatannya.

Penggunaan vektor retrovirus menimbulkan masalah karena sekuens virus dapat berintegrasi dengan genom DNA sel donor dan menyebabkan risiko terjadinya mutasi.<sup>9</sup> Beberapa penelitian tanpa menggunakan retrovirus sebagai vektor memberikan hasil kloni PS yang lebih baik, namun tingkat efisiensi yang didapat masih sangat rendah. Masalah lain yang timbul adalah perubahan epigenetik yang dapat terjadi pada kultur iPS. Tulisan ini bertujuan untuk mengkaji beberapa penelitian mengenai potensi dan hambatan dalam pengembangan iPS sebagai alternatif sumber sel punca pluripoten autogenik dimasa

mendatang. Hasil kajian ini diharapkan juga akan memunculkan ide-ide baru terkait metoda eksperimen yang memungkinkan untuk dimodifikasi agar dapat mengatasi kendala yang masih dihadapi dalam pengembangan iPS.

### Modifikasi Sel Asal iPS, Jenis Vektor, dan Metoda Transduksi

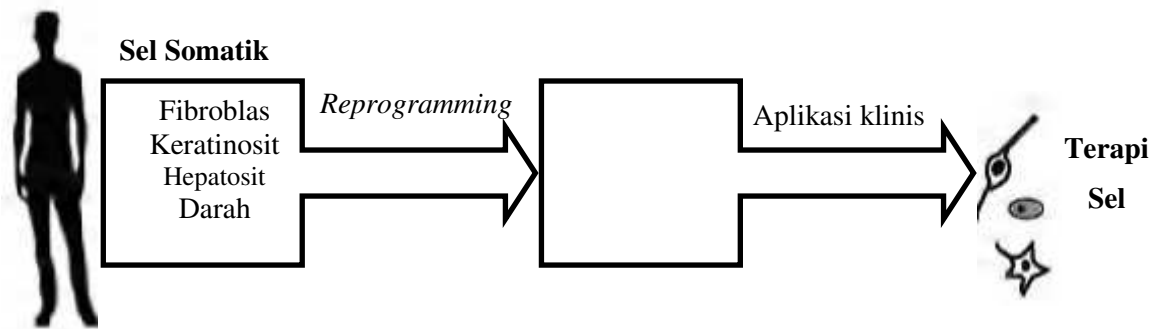
Keberhasilan Yamanaka dalam membuat iPS diikuti oleh para peneliti lainnya. Penelitian-penelitian selanjutnya melaporkan keberhasilan pembuatan iPS dengan sumber sel lain (non fibroblas), modifikasi faktor Yamanaka dan penggunaan vektor atau metoda baru untuk transduksi faktor pluripotensial. Berikut adalah delapan penelitian terkait pembuatan iPS dari beberapa jenis sel dan beberapa faktor transkripsi yang bervariasi.

Aasen<sup>10</sup>, Loh<sup>11</sup>, Aoi<sup>12</sup> melaporkan pembuatan iPS dari sumber sel non fibroblas, masing-masing menggunakan keratinosit, CD34<sup>+</sup> sel darah, dan hepatosit. Modifikasi faktor Yamanaka dilakukan oleh Feng<sup>13</sup>, Marson<sup>14</sup> dan Zhou<sup>15</sup>, masing-masing menggunakan faktor Essrb, Wnt3a dan asam valproat (VPA) sebagai faktor transkripsi pengganti atau tambahan. Marson, Zhou, dan Kaji<sup>16</sup> juga melaporkan vektor dengan metoda yang berbeda dari penelitian Yamanaka

**Tabel 1. Penelitian mengenai pembuatan iPS yang sudah pernah dilakukan menurut asal sel somatik, penggunaan faktor pluripotensial dan metoda transduksi yang digunakan**  
<sup>9</sup>Error! Bookmark not defined.

Sel Sumber	Faktor Transkripsi	Vektor/metoda transduksi	Peneliti (tahun)
Sel Keratinosit	Okt3/4, Sox2, Klf4, C-Myc	Retrovirus	Aasen (2008)
CD34 <sup>+</sup> sel darah	Okt3/4, Sox2, Klf4, C-Myc	Retrovirus	Loh (2009)
Hepatosit	Okt3/4, Sox2, Klf4, C-Myc	Retrovirus	Aoi T (2008)
Fibroblas	Okt3/4, Sox2, Essrb	Retrovirus	Feng (2009)
Fibroblas	Okt3/4, Sox2, Klf4, Wnt3a	Lentivirus	Marson (2008)
Fibroblas	Okt3/4, Sox2, Klf4, C-Myc, VPA	Transduksi Protein	Zhou (2009)

Fibroblas	Okt3/4, Sox2, Klf4, C-Myc	Transfeksi Plasmid	Kaji (2009)
<p>Marson menggunakan vektor lentivirus, sedangkan Zhou dan Kaji menggunakan metoda transduksi protein dan transfeksi plasmid untuk pembuatan iPS. Mengingat potensi mutasi yang dapat timbul akibat integrasi gen virus vektor dan DNA sel donor, maka penggunaan metoda transduksi protein dan transfeksi plasmid tampaknya lebih aman untuk dilakukan. Pun demikian, efisiensi dua metoda ini juga masih relatif rendah, sehingga masih memungkinkan untuk dilakukan berbagai modifikasi protokol guna meningkatkan efisiensi produksi klon iPS.</p>			
<p><b>Studi Potensi Pemanfaatan iPS</b></p>			
<p>Salah satu potensi aplikasi iPS adalah untuk terapi sel. Wernig melaporkan iPS yang dibuat dari fibroblas tikus dapat berdiferensiasi menjadi prekursor sel neural. Lebih lanjut prekursor sel neural tersebut ditransplantasikan ke otak fetus tikus dan ternyata sel tersebut dapat bermigrasi ke berbagai regio otak serta berdiferensiasi menjadi sel glia dan sel neuron. Analisis morfologi memperlihatkan bahwa tidak ada perbedaan morfologi sel neuron hasil bentukan iPS dan sel neuron pejamu. Pemeriksaan elektrofisiologi juga menunjukkan adanya fungsi sel neuron sisipan yang berintegrasi dengan sel otak pejamu. Hasil penelitian ini menyimpulkan adanya perbaikan pada sel otak model tikus Parkinson.<sup>16</sup> Penelitian lain menyebutkan keberhasilan iPS yang berasal dari</p>		<p>sel fibroblas kulit penderita <i>Amyotrophic Lateral Sclerosis</i> (ALS) berusia 82 tahun yang didiferensiasikan menjadi sel motor neuron, yaitu sel yang rusak pada pasien ALS.<sup>17</sup> Penelitian lain melaporkan mengenai pembentukan iPS-RPE (<i>retinal pigmented epithelium</i>) menggunakan faktor pluripoten Oct4, Sox2, Nanog, dan Lin28 yang dapat berdiferensiasi spontan menjadi sel RPE. Hasil analisis secara kuantitatif menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan ekspresi gen dan ekspresi protein yang bermakna antar kultur iPS-RPE, kultur fRPE (<i>fetal human RPE</i>), dan kultur hESC-RPE (<i>human embryonic stemcell-RPE</i>).<sup>18</sup> Penelitian selanjutnya mengenai potensi aplikasi iPS untuk mengobati hemofilia A. Model tikus hemofilia A diinjeksi PS yang berasal dari fibroblas ujung ekor tikus. Tikus pada kelompok kontrol (tikus hemofilia A tanpa iPS) akan mati dalam beberapa jam, sedangkan tikus pada kelompok uji (diinjeksi dengan iPS), dapat bertahan hidup lebih dari 3 bulan. Selain itu pada kelompok uji juga terjadi peningkatan faktor VIII sekitar 8-12% dibandingkan tikus normal dan terjadi perbaikan fenotip.<sup>19</sup> Penelitian yang dilakukan Zhang melaporkan pembentukan kardiomyosit fungsional dari iPS.<sup>20</sup> Nelson juga melaporkan kemampuan iPS dalam memperbaiki infark miokardium akut.<sup>21</sup> Kedua penelitian ini menunjukkan potensi penggunaan iPS dalam terapi penyakit kardiovaskular.</p>	



Gambar 1. Potensi beberapa jenis sumber sel dewasa untuk membuat iPS<sup>22</sup>

Kultur iPS juga dapat dijadikan model untuk mempelajari bagaimana mekanisme terjadinya penyakit tertentu dan penemuan obat baru yang efektif untuk penyakit tersebut

### Masalah dalam produksi iPS

Dibalik potensi yang dimiliki, iPS juga masih menghadapi sejumlah masalah untuk diaplikasikan secara klinis. Masalah efisiensi merupakan masalah utama dalam pembuatan iPS. Pada waktu pertama kali Yamanaka menemukan iPS dengan menggunakan sel fibroblas mencit, tingkat efisiensi yang didapat kurang dari 1% dan selanjutnya para peneliti memusatkan perhatian untuk meningkatkan efisiensi. Peningkatan efisiensi bisa didapatkan dengan cara mencari sumber sel lain, mempengaruhi modifikasi epigenetik, dan pemilihan faktor pluripotensi lainnya. Hasil yang didapat menunjukkan efisiensi produksi klon iPS dari keratinosit meningkat 100 kali lipat lebih tinggi dan 2 kali lebih cepat dibandingkan iPS dari fibroblas. Aasen menduga lebih tingginya efisiensi tersebut disebabkan oleh terdapatnya *keratinocyte adult stemcell* pada *juvenile human primary keratinocytes* dalam jumlah cukup banyak. Hasil analisis menunjukkan ekspresi gen-gen yang terkait dengan pluripotensi iPS pada *juvenile human primary keratinocytes* lebih menyerupai SPE, jika dibandingkan iPS dari fibroblas, misalnya ekspresi CD24 (*stemcell marker*) dapat diekspresikan oleh iPS yang berasal dari *juvenile human primary keratinocytes*

dan SPE, tetapi tidak dapat diekspresikan oleh iPS dari fibroblas. Selain itu *juvenile human primary keratinocytes* juga memiliki Klf4 dan c-Myc yang lebih tinggi dibandingkan dengan fibroblas. Klon iPS dari sel keratinosit dewasa (*Keratinocyte-derived iPS/KiPS*) memperlihatkan kemiripan morfologi koloni, ekspresi pluripotensi yang terkait dengan faktor transkripsi dan *surface markers*, profil ekspresi gen secara global dan potensi diferensiasi dengan SPE, baik secara *in vitro* maupun *in vivo*. Penelitian lain menggunakan *Purified Mesenchymal Stem Cells* dan mukosa mulut<sup>23</sup> sebagai sumber iPS untuk mendapatkan tingkat efisiensi yang lebih tinggi dari iPS fibroblas. Penelitian yang dilakukan Tat membuktikan bahwa tingkat efisiensi iPS dari sel adiposa (iPS-ADC) dan *neuralstemcell* (iPS-NSCs) lebih tinggi dibandingkan iPS dari sel fibroblas). Pemeriksaan *green fluorescence protein* (GFP) untuk marker pluripotensi, menunjukkan koloni positif GFP ditemukan pada  $118,20 \pm 38,28$  koloni PS-ADC, sedangkan pada iPS-NSCs didapatkan pada  $13,50 \pm 4,10$  koloni. Koloni PS-ADC memiliki tingkat efisiensi 8 kalilebih tinggi dibandingkan iPS-NSCs dan 38 kalilebih tinggi dibandingkan iPS dari fibroblas.<sup>24</sup>

Tabel 2 memperlihatkan bahwa keratinosit dan sel adiposa merupakan sel asal yang lebih efisien menghasilkan klon iPS dalam jumlah lebih banyak, dibandingkan sel fibroblas.

Huangfu mencoba melakukan modifikasi epigenetik untuk meningkatkan efisiensi. Huangfu melaporkan bahwa penggunaan asam valproat, suatu inhibitor *histone deacetylase* (HDAC), dapat meningkatkan efisiensi lebih dari 100-kali lipat.<sup>26</sup> Penelitian Marson melaporkan Wnt 3a yang dicampurkan dalam medium dapat menghasilkan peningkatan efisiensi pembentukan iPS walaupun hanya dengan 3 faktor pluripotensi, Oct4, Sox2, dan Klf4. Selain masalah efi-

siensi, tantangan berikutnya dalam pembuatan iPS adalah penggunaan vektor retrovirus.

Penggunaan vektor retrovirus dalam transduksi faktor-faktor pluripotensi dapat menyebabkan terintegrasinya gen virus kedalam genom sel pejamu. Hal ini dapat menyebabkan masalah dikemudian hari, seperti kemungkinan terjadinya mutasi dan keganasan. Okita melaporkan bahwa sekitar 20% iPS yang dibuat menggunakan vektor

**Tabel 2. Efisiensi iPS dipengaruhi jenis sel asal**<sup>25</sup>

Sel asal	Sumber sel	Ekspan si in vitro	Efisiensi reprogramming	Laju re-programming	Faktor re-programming
Fibroblas kulit	Biopsi kulit	Ya	-0,01% (sel dewasa)	>21 hari	OSKM, OSK, OSN
Fetal neural stem cell	NA	Ya	0,004% (1 faktor, sel fetal)	>7-8 minggu (1 faktor)	OK, O
Keratinosit	Biopsi kulit	Ya	-1% (sel neo-natal dan juve-nil)	>10 hari	OSKM, OSK
Sel darah CD34	Darah perifer pada stimulasi G-CSF	Tidak	-0,01-0,02% (sel dewasa)	>14 hari	OSKM
Sel punca adiposa	Lipoaspirasi	Tidak	-0,2% (sel dewasa)	>13-14 hari	OSKM
Melanosit	Biopsi kulit	Ya	-0,05% (tidak diketahui)	>10 hari	OSKM,OKM
Sel darah tali pusat	Proses persalinan	Tidak	-0,01% (sel neonatal)	>12-15 hari	OSKM,OSNL, OSK, OS

O:Oct4; S:Sox2; K:Klf4; M: c-MYC; N:Nanog; L:Lin28; NA:Not Applicable

retrovirus, akan disertai terjadinya tumor.<sup>27</sup> Peneliti selanjutnya mencari cara atau vektor lain untuk mentransduksi faktor pluripotensi ke sel pejamu. Beberapa cara yang ditempuh antara lain dengan menggunakan vektor plasmid sirkular<sup>28</sup>, episomal plasmid<sup>29</sup>, dan adenovirus<sup>30</sup>, ketiga vektor tersebut tidak terintegrasi kedalam genom penjamu, namun tingkat efisiensinya sangat rendah, lebih rendah dari penggunaan vektor retrovirus. Selain integrasi vektor retrovirus yang ditakutkan menimbulkan keganasan adalah faktor pluripotensi c-Myc yang dapat berkontribusi dalam tumorogenesis. c-Myc dapat menyebabkan stimulasi yang berlebihan terhadap metabolisme dan pertumbuhan sel

serta mengakibatkan ketidakstabilan genomic.<sup>31</sup> Penelitian yang dilakukan oleh Nakagawa melaporkan keberhasilan membentuk sel iPS dari sel fibroblas tikus dan manusia tanpa menggunakan c-Myc, dimana selama masa penelitian tidak terjadi tumorogenesis.<sup>32</sup> Yang Li juga melaporkan keberhasilan pembuatan sel iPS tanpa menggunakan c-Myc. sel iPS tersebut dapat diferensiasikan menjadi *hepatocyte like cells*. Transplantasi intravena sel iPS tersebut dapat mengurangi area nekrosis pada hati tikus coba dan menyebabkan perbaikan fungsi hati, dan 6 bulan pasca transplantasi tidak terjadi pembentukan tumor.<sup>33</sup>

Tantangan berikutnya adalah mengenai kestabilan sel iPS. Didalam kultur *invitro*, sejalan dengan bertambahnya waktu sel iPS akan mengalami perubahan epigenetik. Perubahan epigenetik yang terjadi mulai dari mikro delesi, *point mutation*, sampai dengan perubahan kariotip. Perubahan epigenetik dapat disebabkan faktor internal dan eksternal. Faktor internal antara lain latar belakang genetik dan kondisi mitokondria, sedangkan faktor eksternal antara lain keadaan status redoks, matriks ekstraselular, kondisi medium dan teknik pasasi.<sup>34</sup>

## PEMBAHASAN

Sampai saat ini di Indonesia masih sulit ditemukan publikasi terkait produksi iPS, sehingga penulis berasumsi bahwa masih sedikit peneliti Indonesia yang sudah mencoba mengeksplorasi potensi pemanfaatan iPS. Menimbang bahwa sudah terjadi pergeseran tren penyakit dalam masyarakat dari penyakit menular menuju penyakit degeneratif dan keganasan, maka sudah saatnya para peneliti Indonesia mulai mengembangkan keterampilan dalam menyiapkan terapi alternatif berbasis sel punca untuk menanggulangi penyakit degeneratif dimasa mendatang.

Kultur berkhitan di masyarakat Indonesia memberikan peluang besar kepada peneliti untuk mendapatkan sel somatik dewasa yang dapat direprogram menjadi iPS autogenik, maupun allogenik. Kulit preputium yang umumnya dibuang saat prosedur khitan (sirkumsisi), dan juga lipoaspirasi yang sudah banyak dilakukan di kota-kota besar maupun perdesaan, dapat menjadi sumber iPS yang murah, berkesinambungan, serta bermanfaat, setidaknya bagi individu yang bersangkutan, sehingga layak dicoba untuk mulai dikembangkan produksi klon iPS lokal.

Teknologi transduksi dan transfeksi juga merupakan teknik yang sudah dikuasai oleh sebagian besar peneliti yang berkecimpung di bidang bioteknologi dan rekayasa genetik di Indonesia. Kemampuan ini memungkinkan peneliti lokal dapat melakukan modifikasi metoda insersi gen eksogen pembawa sifat pluripotensi dengan memanfaatkan gen alternatif yang belum dilakukan oleh peneliti terdahulu.

## DAFTAR RUJUKAN

1. Choumerianou DM, Dimitriou H, Kalmanti M. Stem cells: promises versus limitations. *Tissue Eng Part B Rev.* 2008;14(1):53-60.
2. Alberio R, Campbell KH, Johnson AD. Reprogramming somatic cells into stem cells. *Society for Reproduction and Fertility.* 2006; 132: 709-720.
3. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006; 126: 663-676.
4. Takahashi K et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell.* 2007; 131: 1-12.
5. Viczian AS, Solessio EC, Lyou Y, Zuber ME. Generation of Functional Eyes from Pluripotent Cells. *Plos Biology.* 2009;7(8)
6. Jin Zb, Okamoto S, Mandai M, Takahashi M. Induced pluripotent stem cells for retinal degenerative diseases: a new perspective on the challenges. *J. Genet.* 2009; 88: 417-424.
7. Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, Sun CW, Meissner A, Cassady JP, Beard C, Brambrink T, Wu LC, Townes TM, Jaenisch R: Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science* 318:1920-1923, 2007.
8. Y S. Induced pluripotent stem cells, new tools for drug discovery and new hope for stem cell therapies. *Curr Mol Pharmacol.* 2009;2(1):15-8
9. Chen L, Liu L. Current progress and prospects of induced pluripotent stem cells. *Science in China Series C : Life Sciences.* 2009;52(7):622-36.
10. Aasen T, Raya A, Barrero MJ, Garreta E, Consiglio A, Gonzalez F, et al. Efficient and

- rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nature Biotechnology*. 2008;26(11):1276-84
11. Loh YH, Agarwal S, Park IH, Urbach A, Huo H, Heffner GC, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from human blood. *Blood*. 2009;113(22):5476-9.
  12. Aoi T, Yae K, Nakagawa M, Ichisaka T, Okita K, Takahashi K, et al. Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science*. 2008;321(5889):699-702.
  13. Feng B, Jiang J, Kraus P, Ng JH, Heng JC, Chan YS, et al. Reprogramming of fibroblasts into induced pluripotent stem cells with orphan nuclear receptor Esrrb. *Nat Cell Biol*. 2009;11(2):197-203..
  14. Marson A, Foreman R, Chevalier B, Bilodeau S, Kahn M, Young RA, et al. Wnt signaling promotes reprogramming of somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell*. 2008 Aug 7;3(2):132-5. doi: 10.1016/j.stem.2008.06.019.
  15. Zhou H, Wu S, Joo JY, Zhu S, Han DW, Lin T, et al. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell*. 2009;4(5):381-4.
  16. Wernig et al. Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats. *Cell*. 2008;135(2):221-31. doi: 10.1016/j.cell.2008.06.019.
  17. Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, Weisenthal LM, Mitsumoto H, Chung W, et al. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science*. 2008;321(5893):1218-21.
  18. Buchholz D.E, et al. Derivation of Functional Retinal Pigmented Epithelium from Induced Pluripotent Stem Cells. *STEM CELLS*. 2009;27:2427-34.
  19. Xu D, Alipio Z, Fink LM, et al. Phenotypic correction of murine hemophilia A usingan iPSCs cell-based therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:808-13.
  20. Zhang ea. Functional Cardiomyocytes Derived From Human Induced Pluripotent Stem Cells. *American Heart Association*. 2009.
  21. Nelson TJ, Martinez-Fernandez A, Yamada S, Perez-Terzic C, Ikeda Y, Terzic A. Repair of acute myocardial infarction by human stemness factors induced pluripotent stem cells. *Circulation*. 2009;120(5):408-16.
  22. Vitale AM, Wolvetang E, Mackay-Sim A. Induced pluripotent stem cells: A new technology to study human diseases. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2011;43(6):843-6.
  23. Miyoshi K, Tsuji D, Kudoh K, Satomura K, Muto T, Itoh K, et al. Generation of human induced pluripotent stem cells from oral mucosa. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2010;110(3):345-50.
  24. Tat PA, Sumer H, Jones KL, Upton K, Verma PJ. The Efficient Generation of Induced Pluripotent Stem (iPS) Cells From Adult Mouse Adipose Tissue-Derived and Neural Stem Cells. *Cell Transplantation*. 2010;19(5):525-36
  25. Ning Sun MTL, Joseph C. Wu. Human iPS cell-based therapy. *Cell Cycle* 2010;9(5):880-5.
  26. Huangfu D, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, Snitow M, Chen AE, et al. Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat Biotechnol*. 2008;26(7):795-7.
  27. Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S (2007) Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448, 313-317.
  28. Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, et al. Generation of mouse induced pluripotent stem cells withoutviral vectors. *Science* 2008;322(5903):949-53.
  29. Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, et al. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgenesequences. *Science* 2009;324(5928):797-801.
  30. Zhou W, Freed CR. Adenoviral gene delivery can reprogram human fibroblasts to induced pluripotentstem cells. *Stem Cells* 2009;27(11):2667-74.
  31. Ruggero, D. The role of Myc-induced protein synthesis in cancer. *Cancer Res*. 69, 8839-8843 (2009).
  32. Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse andhuman fibroblasts. *Nat Biotechnol* 2008;26(1):101e6.
  33. Li H-Y, Chien Y, Chen Y-J, Chen S-F, Chang Y-L, Chiang C-H, et al. Reprogramming induced



pluripotent stem cells in the absence of c-Myc for differentiation into hepatocyte-like cells. *Biomaterials*. 2011.

Pluripotent Stem Cells. *The Open Stem Cell Journal*. 2011;3:52-61.

34. Tung-Liang Chung NYT, Ernst J Wolvetang. Genetic and Epigenetic Instability of Human