

Induksi *Pluripotent Stem Cell* dengan Menggunakan Faktor Yamanaka Oct4, Sox2, Klf4, dan c-Myc: Perkembangan dan Tantangan

Irbah Arifa¹, Rano K. Sinuraya^{1,2}

¹Departemen Farmakologi dan Farmasi Klinik, Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran, Sumedang, Indonesia, ²Pusat Unggulan Iptek (PUI) Perguruan Tinggi Inovasi Pelayanan Kefarmasian, Universitas Padjadjaran, Bandung, Indonesia

Abstrak

Sel punca embrionik memiliki kemampuan untuk membelah tanpa batas serta bersifat pluripotensi dan dapat berdiferensiasi menjadi sel dari tiga lapisan kecambah. Percobaan Takahashi dan Yamanaka pada tahun 2006 menunjukkan bahwa *induced pluripotent stem cells* (sel iPS) dapat diperoleh dengan penambahan sekumpulan faktor, yaitu Oct4, Sox2, Klf4, dan c-Myc (faktor Yamanaka). Penulisan tinjauan pustaka ini memiliki tujuan untuk meninjau perkembangan dan tantangan penggunaan faktor Yamanaka dalam pemerolehan sel iPS untuk kepentingan penggunaan klinis. Penelusuran pustaka dilakukan dengan menelusuri jurnal terpublikasi pada tahun 2006 hingga 2019 yang membahas tentang produksi sel iPS dengan faktor Yamanaka. Hasil penelusuran literatur menunjukkan bahwa faktor ini berperan sebagai faktor pionir yang dapat berikatan dengan kromatin dan menyebabkan *remodelling* wilayah kromatin serta menyebabkan aktivasi ataupun represi ekspresi dari gen. c-Myc berikatan pada gen yang terlibat dalam metabolisme seluler, regulasi siklus sel, dan jalur biosintetik. Oct4, Sox2, dan Klf4 menargetkan gen yang mengkodekan regulator perkembangan dan transkripsional. Mekanisme induksi sel somatik dengan faktor Yamanaka memerlukan penelusuran lebih lanjut. Sejauh ini, sel iPS dihasilkan dari berbagai macam tipe sel serta dapat berpotensi untuk mengobati berbagai penyakit. Uji klinis dari sel iPS telah disetujui oleh *Food and Drugs Administration* (FDA). Aplikasi dari sel iPS ini memiliki sejumlah rintangan, seperti tingkat efisiensi yang rendah, variabilitas yang tinggi, dan vektor yang digunakan dapat menyebabkan mutasi. Oleh karena itu, diperlukan penelitian lebih lanjut terkait metode yang digunakan agar diperoleh metode yang efisien, efektif, dan aman.

Kata kunci: c-Myc, *induced pluripotent stem cell*, Klf4, Oct4, Sox2

Induction of Pluripotent Stem Cell Using Yamanaka Factors Oct4, Sox2, Klf4, and c-Myc: Development and Future Challenges

Abstract

Embryonic stem cells have the ability to split indefinitely and have pluripotent properties, also can differentiate into cells from three germ layers. Experiment by Takahashi and Yamanaka 2006 showed that induced pluripotent stem cells (iPS cells) can be obtained by addition of a set of factors, namely Oct4, Sox2, Klf4, and c-Myc (Yamanaka factors). This literature review aimed to review the development and challenges of the use of Yamanaka factors in the acquisition of iPS cells for the benefit of its clinical use. We conducted a systematic review of the studies published from 2006 until 2019 that assessed the generating of iPS cell with the assistance of Yamanaka factors. From this review, it is indicated that the factors act as a pioneering factor that can bind to chromatin and cause chromatin region remodelling, and lead to activation or repression of gene expression. c-Myc binds to genes involved in cellular metabolism, cell cycle regulation, and biosynthetic pathways. Oct4, Sox2, and Klf4 target genes that encode developmental and transcriptional regulators. Somatic cell induction mechanism with Yamanaka factors requires further investigation. Recently, iPS cells are produced from different cell types. It can potentially treat various diseases, including Mendelian and complex hereditary disease. Clinical trials of iPS cells have been approved by the Food and Drugs Administration (FDA). The application of these iPS cells acquires a number of obstacles, such as low efficiency, high variability, and commonly used vectors can cause mutations. Therefore, further research is needed related to the methods used in order to obtain an efficient, effective and safe method.

Keywords: c-Myc, induced pluripotent stem cell, Klf4, Oct4, Sox2

Korespondensi: apt. Irbah Arifa, S.Farm., Departemen Farmakologi dan Farmasi Klinik, Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran, Sumedang, Jawa Barat 45363, Indonesia, *email*: irbaharifa@gmail.com

Naskah diterima: 31 Juli 2018, Diterima untuk diterbitkan: 3 Agustus 2019, Diterbitkan: 31 Maret 2020

Pendahuluan

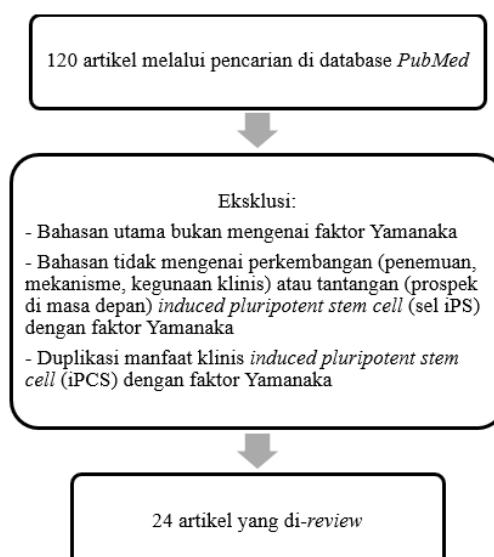
Sel punca embrionik memiliki kemampuan untuk membelah tanpa batas serta mempunyai sifat pluripotensi dan dapat berdiferensiasi menjadi sel dari tiga lapisan kecambah.¹ Adapun pluripotensi mengacu pada kemampuan diferensiasi menjadi sejumlah besar tipe sel, seperti ekstra embrionik, somatik, dan sel gamet.² Akan tetapi, penggunaan sel punca ini menuai beberapa kontroversi yang disebabkan oleh masalah etik terkait penggunaan embrio manusia sebagai donor sel serta kemungkinan terjadinya penolakan transplantasi.³ Sel punca pun mengalami permasalahan sebagaimana organ yang ditransplantasi. Tubuh manusia mengenali sel asing dan melakukan berbagai perlawanannya.⁴ Penelitian mengenai sel punca manusia memiliki berbagai dilema, seperti persetujuan donor bahan untuk kepentingan riset, percobaan klinis dari terapi sel punca serta kemungkinan terjadi kelalaian selama riset berlangsung.⁵

Salah satu solusi yang dapat dilakukan untuk menghindari masalah etik dan rejeksi adalah dengan penggunaan sel *induced pluripotent stem* (iPS). Sel ini mempunyai morfologi dan sifat pertumbuhan yang sama halnya dengan sel punca embrionik. Percobaan yang dilakukan

oleh Takahashi dan Yamanaka pada tahun 2006 menunjukkan bahwa sel pluripoten ini dapat diperoleh dengan penambahan sekumpulan faktor yaitu Oct4, Sox2, Klf4, dan c-Myc, yang dikenal sebagai faktor Yamanaka atau disingkat faktor OSKM.³ Penulisan tinjauan pustaka ini memiliki tujuan untuk meninjau perkembangan dan tantangan penggunaan faktor OSKM dalam memperoleh sel iPS untuk kepentingan penggunaan klinis.

Metode

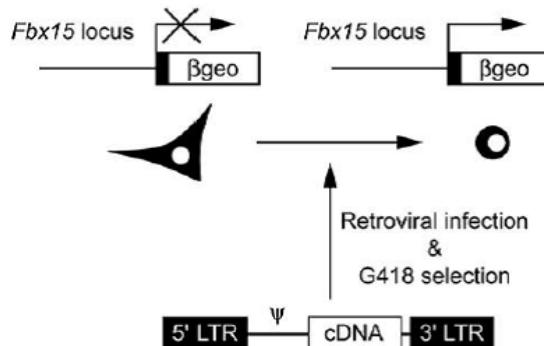
Metode yang digunakan dalam penulisan artikel *review* ini adalah penelusuran literatur dengan menggunakan mesin pencari berbasis *PubMed*. Kata kunci yang digunakan dalam penelusuran ini adalah *induced pluripotent stem cell* dan Yamanaka factors. Kriteria inklusi adalah jurnal berbahasa Inggris. Dari hasil penelusuran ini, diperoleh sebanyak 120 jurnal. Pencarian didasarkan atas judul artikel, abstrak, serta kata kunci. Selanjutnya, dilakukan pengerucutan dengan menyaring artikel yang menyelidiki tentang penemuan, perkembangan, serta rekomendasi klinis faktor Yamanaka. Oleh karena itu, jurnal yang dipakai dalam penyusunan artikel *review* ini sebanyak 24 jurnal (Gambar 1 dan Tabel 1).



Gambar 1 Alur Penelusuran dan Pemilihan Pustaka

Tabel 1 Daftar Pustaka dalam Artikel Review

No	Nama Penulis	Tahun Jurnal	Tipe Studi	Hasil Penelitian
1	Kazutoshi Takahashi dan Shinya Yamanaka	2016	Review	Mekanisme induksi <i>induced pluripotent stem cell</i> (sel iPS) dengan faktor Yamanaka belum jelas. Aplikasi sel iPS untuk klinis sangat luas.
2	Vivek Shukla, dkk.	2018	Nonklinis	Sel iPS dapat membantu identifikasi target baru dari terapi kanker paru-paru.
3	Rupa Sridharan dan Kathrin Plath	2008	Nonklinis	Mekanisme dasar dari <i>reprogramming</i> sel iPS.
4	Sumi T, dkk.	2007	Nonklinis	c-Myc memiliki peran dalam pengaturan sel embrionik manusia.
5	Tanaka T, dkk.	2009	Nonklinis	Sel iPS dapat digunakan sebagai model skrining <i>in vitro</i> .
6	Shuchen Zhang dan Wei Cui	2014	Nonklinis	Sox2 berperan dalam sifat pluripotensi.
7	Junying Y, dkk.	2007	Nonklinis	Faktor Yamanaka berperan dalam memprogram ulang sel somatis manusia.
8	Jeong BK, dkk.	2009	Nonklinis	Oct4 diperlukan dan cukup untuk pemrograman ulang sel punca saraf.
9	Jesse L Cox, dkk.	2010	Review	Perspektif masa depan dari sel iPS.
10	Takahashi K, dkk.	2007	Nonklinis	Produksi sel iPS dari fibroblas kulit manusia.
11	Kazutoshi Takahashi dan Shinya Yamanaka	2006	Nonklinis	Produksi sel iPS dari fibroblas kulit tikus.
12	Ryan Schmidt dan Kathrin Plath	2012	Nonklinis	Sel somatis dapat dikembalikan ke keadaan pluripoten melalui ekspresi yang dipaksakan oleh sejumlah faktor.
13	Gideon Grati	2013	Review	Implikasi sel iPS untuk terapi transplantasi.
14	Hayashi R, dkk.	2012	Nonklinis	Produksi sel epitel kornea dari sel iPS.
15	Hirami Y, dkk.	2009	Nonklinis	Produksi sel retina dari sel iPS manusia dan tikus.
16	Ritchie Ho, dkk.	2010	Review	Mekanisme molekular faktor Yamanaka dalam induksi pluripotensi.
17	Evans PM, dkk.	2007	Nonklinis	Klf4 berperan dalam memeroleh sifat pluripoten.
18	Lee HK, dkk.	2015	Nonklinis	Produksi sel iPS dari sel darah mononuklear pasien demensia frontotemporal.
19	Mao J, dkk.	2014	Nonklinis	Produksi sel iPS dari sel granulosa.
20	Menendez P, dkk.	2005	Review	Prospek penggunaan sel punca embrionik untuk transplantasi.
21	Jared Sternickert, dkk.	2012	Review	Oct4 berperan sebagai penentu dari jalur pemrograman ulang.
22	Ohta S, dkk.	2011	Nonklinis	Produksi sel melanosit dari sel iPS.
23	Okano H, dkk.	2013	Review	Keamanan terapi dengan menggunakan sel iPS.
24	Park IH, dkk.	2008	Nonklinis	Sel iPS spesifik penyakit.



Gambar 2 Pendekatan Kandidat Gen³

Sel *Induced Pluripotent Stem* (sel iPS)

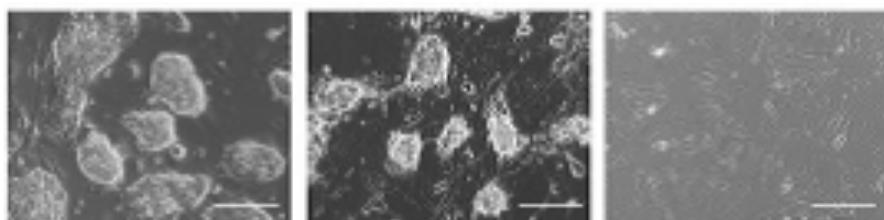
Sel punca embrionik serta sel telur memiliki faktor yang dapat menginduksi sifat totipotensi pada sel somatik.³ Akibatnya, sel somatik dapat diprogram menjadi *induced pluripotent stem cell* (sel iPS) dengan cara memberikan paparan beberapa faktor transkripsi.³ Sel iPS dapat dijadikan sebagai sumber sel untuk menghasilkan jaringan, seperti epitel pigmen retina, saraf, jaringan otot jantung, dan epitel kornea. Keuntungan dari penggunaan sel ini adalah dapat mengatasi masalah kekurangan donor, penolakan imun, dan kontroversi etik.⁶

Penemuan Awal Faktor Yamanaka

Penelitian yang dilakukan oleh Takahashi dan Yamanaka pada tahun 2006 menghasilkan sel iPS. Eksperimen ini dilakukan dengan cara memindai 24 kandidat gen yang dapat menginduksi pluripotensi dari sel somatik. Sel somatik yang dipakai dalam percobaan ini yaitu sel sel fibroblas embrionik tikus (FET). Transduksi yang digunakan oleh Takahashi

dan Yamanaka yaitu transduksi retroviral, hal ini dilakukan dengan alasan metode ini efisien untuk penghantaran gen. Sel FET ditempatkan ke dalam plat, dalam hal ini β -galaktosidase ditempatkan di bawah promotor *F-box only protein 15* (*Fbxo15*- β -geo) untuk menguji 24 gen tersebut. Kandidat gen dapat diuji dengan pendekatan resistensinya terhadap antibiotik G418. Sel embrionik homozigot resisten terhadap konsentrasi tinggi G418, sedangkan sel somatik yang diturunkan sensitif terhadap konsentrasi normal G418.³ Visualisasi penyeleksian gen digambarkan pada Gambar 2.

Tidak ada satupun faktor yang dapat mempertahankan keberadaan sel dengan adanya antibiotik G418 apabila digunakan sendiri. Namun, apabila dilakukan transduksi dengan menggunakan seluruh faktor, akan terbentuk 22 koloni yang resisten. Koloni hasil kultivasi memiliki morfologi yang sama dengan sel punca embrionik (bentuk bulat, nukleus besar, dan sitoplasma yang samar).³ Morfologi dari ketiga sel digambarkan pada Gambar 3.



Gambar 3 Morfologi Sel Punca Embrionik, Sel iPS, dan Sel Fibroblas Embrionik Tikus (dari Kiri ke Kanan)³

Selanjutnya dilakukan pengerucutan untuk mendapatkan suatu set gen minimum yang dapat menginduksi sel somatik. Pengerucutan ini dilakukan dengan cara menghilangkan salah satu dari total 24 gen dan menguji 24 kombinasi dari 23 faktor. Sebagai simpulan, dari strategi tersebut didapatkan hasil bahwa penghilangan empat gen, yaitu Oct3/4, Sox2, Klf4, dan Myc (disebut dengan faktor OSKM) dapat menghambat pembentukan koloni.³

Faktor Yamanaka: Faktor Oct3/4, Sox2, Klf4, dan c-Myc

Oct3/4, Sox2, dan Nanog memiliki fungsi sebagai faktor-faktor transkripsi inti dalam mempertahankan pluripotensi.⁷ Namun, dengan penemuan Takahashi dan Yamanaka (2006), faktor yang esensial dalam pembentuk sel stem pluripoten adalah Sox2 dan Oct3/4. Sebaliknya, faktor Nanog dapat tidak terpakai dalam induksi sel somatik. Selain itu, faktor esensial yang terkait dengan tumor, seperti c-Myc dan Klf4, penggunaannya tidak dapat digantikan oleh onkogen lain seperti E-Ras, Tcf, β-katenin, dan Stat3.³

Faktor Oct4 merupakan sebuah regulator pemrograman ulang sel. Oct4 secara spesifik diekspresikan pada sel pluripoten. Ekspresi protein ini dapat menginduksi pluripotensi dari sel somatik.³ Penelitian yang dilakukan oleh Kim *et al.* pada tahun 2009 menjelaskan bahwa penggunaan Oct4 dan Klf4 sudah cukup untuk dapat menginduksi pluripotensi sel punca saraf. Dengan dihilangkannya Klf4, ditemukan bahwa Oct4 tidak hanya merupakan faktor yang esensial tetapi juga cukup untuk menginduksi pluripotensi.⁸ Ekspresi dari Oct4 pada sel somatik dapat menginduksi sel progenitor sekaligus dapat menghasilkan sel iPS pada kondisi tertentu. Oleh sebab itu, Oct4 dapat menjadi penjaga dari jalur pemrograman ulang.⁹ Kehilangan fungsi dari Oct4 pada awal perkembangan menyebabkan sel dari embrio preimplantasi

berubah menjadi trofektodermal, akibatnya, kehilangan lini lapisan kecambah menyebabkan apoptosis sel kecambah primordial.⁸ Akan tetapi, ekspresi yang berlebih dari Oct4 akan menyebabkan diferensiasi dan kehilangan sifat pluripotensi.¹⁰

Sex determining region Y-box 2 (Sox2) adalah anggota dari famili faktor transkripsi Sox. Protein dari famili Sox memiliki domain *highly-mobility-group* (HMG) pengikat DNA yang konservatif.¹¹ Deplesi dari Sox2 akan menyebabkan perubahan pada morfologi, kehilangan penanda ekspresi pluripoten, dan diferensiasi menjadi trofektoderm.^{12,13} Selama embriogenesis tikus, zigot yang totipoten akan mengalami pembelahan dan menghasilkan sel yang banyak. Oleh karena itu, terbentuk morula yang multiseluler dan pada akhirnya membentuk blastosit. Selanjutnya, sel akan memisah menjadi massa sel dalam atau trofektoderm. Sel yang terdapat di massa sel dalam memiliki sifat pluripoten. Ekspresi dari Sox2 ditemukan pada tahap morula dan semakin spesifik ditemukan di massa sel dalam dari blastosit dan epiblas pada fase selanjutnya.¹⁴ Untuk itu, pluripotensi dari sel punca dapat dipertahankan dengan menjaga kadar ekspresi dari Sox2. Hal ini dilakukan sebab kadar yang rendah ataupun tinggi dapat menurunkan aktivitas *promoter/enhancer* dari gen target Sox2-Oct4. Sox2 akan berinteraksi dengan Oct4 untuk membentuk sebuah kompleks regulasi. Kompleks ini akan berikatan pada wilayah regulasi Sox2 untuk mengaktifkan transkripsi Sox2.^{13,15} Kompleks ini juga menjadi elemen regulator yang penting untuk gen pluripotensi, salah satunya gen yang mengkode Oct4 dan Sox2 sendiri. Hal ini mengindikasikan bahwa kedua faktor bertindak dalam autoregulasi *feedback* positif.¹⁶ Pada sel punca manusia, kompleks Sox2-Oct4 akan menempati target gen protein *decaptalegic homolog* 3 (Smad3), sebuah efektor hilir dari jalur sinyal faktor pertumbuhan yang dibutuhkan

dalam mempertahankan sel punca embrionik manusia.¹⁷ Sox2 dapat dipengaruhi dengan metilasi, asetilasi, sumoilasi, dan fosforilasi, yang berujung pada penurunan terhadap aktivitas Sox2 sebagai regulator transkripsi.¹⁸

Kruppel-like factor 4 (Klf4/Gklf/EZF) adalah faktor transkripsi yang melibatkan regulasi dari proliferasi dan diferensiasi pada beberapa jaringan.¹⁹ Klf4 akan berikatan dengan DNA melalui gabungan *zinc fingers* C₂H₂ yang akan mengelilingi lengkungan utama DNA.²⁰ Sebuah studi mendemonstrasikan adanya interaksi fisik antara Klf4 dan CREB-binding protein (CBP).²¹ CBP dan homolog terdekatnya, p300, adalah protein yang mengandung domain histon asetyltransferase katalitik.²² p300/CBP akan berinteraksi dengan DNA melalui faktor transkripsi yang spesifik pada sekuen dan interaksi ini kemudian meningkatkan asetilasi histon.^{23,24}

c-Myc mempunyai peran kritis dalam regulasi dari proses biologis, seperti kontrol proliferasi sel, apoptosis, onkogenesis, dan diferensiasi.²⁵ c-Myc berperan utama dalam perkembangan awal pemrograman ulang sel untuk menyediakan lingkungan kromatin yang aktif, meningkatkan proliferasi sel dan memainkan peran dalam meningkatkan transisi dari insiasi ke elongasi pada proses transkripsi.²⁶ Target dari c-Myc dan gen kolaboratifnya berkaitan terhadap fungsi dari sel punca. Sebagai contoh, supresor tumor p53 yang dirangsang dengan c-Myc dan *polycomb* protein Bmi-1 mengontrol proliferasi sel dan mempertahankan pembaruan diri pada beberapa tipe sel punca.²⁷ Aktivasi c-Myc juga menginduksi regulasi dari subunit integrin α6, dalam hal ini persinyalan integrin diduga dapat mempertahankan sel punca embrionik manusia dalam kondisi tidak terdiferensiasi.²⁸ Dengan kolaborasi faktor lain, yakni Oct4, Sox2, dan Klf4, c-Myc dapat meningkatkan pembentukan sel yang terprogram ulang,²⁹ sedangkan deregulasi ekspresi dari c-Myc menyebabkan proliferasi dan menginhibisi

fenotip yang berdiferensiasi pada berbagai macam tipe sel, seperti myeloid dan epitel usus.³⁰

Mekanisme Pemrograman Ulang Sel dengan Faktor OSKM

Mekanisme dari ekspresi ektopik faktor OSKM sehingga dapat menginduksi transisi menuju kondisi pluripoten masih memerlukan penelusuran yang intensif. Hal ini disebabkan kinetika reaksi yang lambat dan efisiensinya yang rendah. Selain itu, hal tersebut dapat pula terjadi karena sel yang telah terprogram ulang dengan sempurna tidak dapat dilakukan seleksi.³¹ Hasil sebuah studi mengindikasikan bahwa faktor OSKM berperan sebagai faktor pionir yang dapat berikatan dengan kromatin serta menyebabkan *remodelling* wilayah kromatin dan aktivasi/represi ekspresi gen.³²

Pada fase awal proses ini, OSKM akan menempati banyak lokus genom, termasuk lokus yang faktornya tidak akan berikatan pada sel punca embrionik.³² c-Myc berikatan pada gen yang terlibat dalam metabolisme seluler, regulasi pada siklus sel, serta jalur biosintetik.³³ Secara spesifik, Myc berikatan dengan lokus genom yang dimetilasi H3K4, yang merupakan tanda bahwa kromatin dalam keadaan terbuka. Bagian dari lokus ini, yaitu *enhancer* dan *promoter* gen yang menentukan identitas somatik dari sel dan berujung pada pembungkaman gen somatik tersebut.³² Oct4, Sox2, dan Klf4 menargetkan gen yang memuat regulator perkembangan dan transkripsional.³³ Secara bersamaan, OSKM berikatan pada *enhancer*, kemudian pada *promoter* gen yang berasosiasi dengan awal tahap pluripotensi, dan akhirnya menginduksi ekspresinya.³² Kadar dari Oct3/4 dan Sox2 penting untuk diatur agar tercapai proses yang efisien, dengan ekspresi Oct3/4 yang tinggi dan Sox2 yang rendah.³⁴ Hal ini disebabkan proses ini bersifat stokastik dan tidak efisien karena adanya penanda histon menutupi banyak gen yang berperan

dalam induksi pluripotensi dan bertanggung jawab pada konformasi kromatin yang tertutup.³² Rintangan ini dapat diatasi dengan cara menggunakan *inhibitor* deasetilasi histon yang dapat membuka kromatin.³⁵ Transisi mesenkim menjadi epitel (MET) penting dalam tahap awal dari proses ini.³⁶

Pada tahap awal, akan dihasilkan sel terprogram ulang, kemudian sel tersebut akan masuk ke dalam tahap kedua ketika OSKM dapat digantikan dengan target hilirnya, yaitu LIN28, SALL4, ESRR β dan Nanog.³⁷ Marker embrionik seperti alkalin fosfatase dan *stage specific embryonic antigen- I* (SSEA-I) telah terangsang pada saat tahap awal dari proses pemrograman ulang ini.³⁸

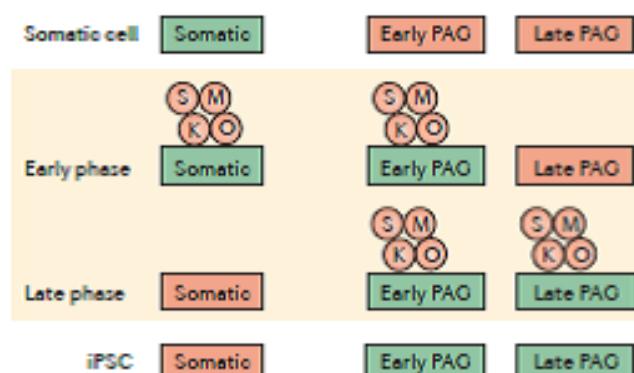
Ekspresi dari gen pluripotensi akhir terjadi di tahap berikutnya.³⁹ OSKM dapat mengakses lokus gen pluripotensi pada fase akhir ini.⁴⁰ Ketika terprogram secara sempurna, sel dapat mempertahankan kondisi pluripotensinya secara independen. Deplesi dari faktor eksogen pada tahap awal akan menyebabkan sel kembali ke keadaan semula (Gambar 4).³⁸

Perkembangan Klinis

Sel punca manusia memiliki perbedaan dalam berbagai aspek jika dibandingkan dengan sel punca tikus.⁴² Sel punca manusia cenderung datar dan tidak saling tumpang tindih satu sama lain. Sel punca manusia juga bergantung pada

bFGF dalam pembaruan selnya,⁴³ sedangkan sel punca tikus bergantung pada jalur LIF/*Stat3*.⁴⁴ Diferensiasi pada sel punca manusia diinduksi oleh BMP,⁴⁵ akan tetapi BMP sendiri dibutuhkan pada pembaruan sel punca tikus.⁴⁶ Terlepas dari perbedaan tersebut, faktor yang berperan dalam proses induksi kedua spesies adalah sama. Akan tetapi, jika dikondisikan di dalam kondisi kultur yang sama dengan sel fibroblas tikus, sel fibroblas manusia tidak akan terinduksi. Hal ini menunjukkan jaringan pengaturan pluripotensi pada kedua spesies sama, namun spesies yang berbeda membutuhkan faktor ekstrinsik dan sinyal yang berbeda.⁴⁷ Keberhasilan Yamanaka dan Takahashi (2006) membuka peluang dalam pengembangan penelitian sel iPS. Untuk itu, teknologi ini dapat dikembangkan untuk berbagai kepentingan klinis. Satu tahun setelahnya, Takahashi dan Yamanaka berhasil menginduksi sel fibroblast manusia dengan menggunakan faktor OSKM. Sel iPS yang terbentuk memiliki kesamaan dengan sel punca manusia, seperti morfologi, proliferasi, penanda permukaan, ekspresi gen, aktivitas *promoter*, aktivitas telomerase, diferensiasi *in vitro*, dan formasi teratoma.⁴⁷

Sejauh ini sel iPS yang dapat dihasilkan dari berbagai macam tipe sel, seperti fibroblas fetus dan dewasa,^{3,47} sel beta pankreas,⁴⁸ hepatosit,⁴⁹ retina,³² darah perifer,⁵⁰ keratinosit,⁵¹ oligodendrosit,⁵² sel lambung,⁴⁹ sel pulpa



Gambar 4 Dua Fase Pemrograman Ulang Sel⁴¹

gigi,⁵³ limfosit T dan B,⁵³ kardiomiosit,⁵⁴ sel darah mononuklear pasien demensia,⁵⁵ sel granulosa,⁵⁶ serta sumsum darah.⁵⁰ Pembentukan sel yang *immortal*, contohnya seperti sel pluripoten, dapat membantu dalam pengamatan perkembangan penyakit melalui diferensiasi *in vitro* yang merekapitulasi aspek gastrulasi normal dan pembentukan jaringan. Hal ini disebabkan embrio sejak dini membawa penyakit turunan.⁵⁷ Sel punca juga membuka peluang dalam penelitian pada individu yang mengalami penyakit turunan, seperti *adenosine deaminase deficiency-related severe combined immunodeficiency* (ADA-SCID),⁵⁸ Schachman-Bodian-Diamond (SBDS),⁵⁸ Gaucher disease (GD) tipe III,⁵⁸ Duchenne (DMD) dan distrofi otot Becker,⁵⁸ penyakit Parkinson,⁵⁸ sindrom Huntington,⁵⁸ diabetes melitus tipe I,⁵⁸ *down syndrome*,⁵⁸ sindrom Lesch-Nyhan.⁵⁸ Selain itu, sel punca juga dapat membantu dalam rekonstruksi tulang,⁵⁹ pembentukan kornea,⁶⁰ pembentukan retina,⁶¹ pembentukan melanosit,⁶² dan penyakit kanker paru.⁶³

Uji klinis dari sel iPS telah disetujui oleh *Food and Drugs Administration* (FDA).⁶⁴ Uji klinis sudah pernah dilakukan pada pasien degenerasi makular dan bertujuan untuk menguji keselamatan dan efektivitas dari sel iPS.⁴¹ Uji klinis selanjutnya dilakukan dengan menggunakan turunan sel punca embrionik yang memproduksi insulin untuk pengobatan diabetes melitus tipe I.⁴¹

Sel iPS: Rintangan dan Tantangan

Terdapat beberapa rintangan yang ditemukan di dalam pengembangan teknologi sel iPS. Pertama, efisiensi yang sangat rendah untuk set faktor Oct4, Sox2, c-Myc Klf4 (OSKM) dan faktor Thompson (Oct4, Sapo2, Nanog, dan LIN28),^{3,65} sehingga apabila diterapkan dalam skala industri, metode yang telah ada dinilai masih kurang efektif dan efisien.⁶⁶ Kejadian *reprogramming* ini pun sangat

jarang terjadi. Di samping itu, kejadian pemrograman ulang ini bersifat stokastik sehingga dapat mengalami keberhasilan yang parsial.³² Efisiensi dari proses ini dipengaruhi oleh faktor stoikiometri, penambahan faktor pemrograman ulang, dan komponen kimia.⁶⁶

Agar dapat mengatasi masalah ini, terdapat beberapa faktor yang perlu untuk diperhatikan. Pertama, metode yang dipakai perlu mengontrol dosis plasmid dan menyortir sel yang berhasil di-transfeksi. Faktor OSKM perlu dipisahkan sehingga berada pada plasmid yang berbeda. Selanjutnya, ditambahkan protein reporter yang berfluoresensi untuk mengevaluasi efisiensi dan heterogenitas dari sel.⁶⁴ Kedua, jumlah salinan dari gen yang mengkodekan faktor OSKM juga dapat memengaruhi proses pemrograman ulang. Konsentrasi dari faktor OSKM dapat berpengaruh terhadap kemampuan sel untuk mengatasi halangan epigenetik.⁶⁵ Ketiga, kontak inhibisi dari sel yang berproliferasi juga dapat menyebabkan kegagalan proses pemrograman ulang, sehingga kerapatan dari sel perlu dipertimbangkan untuk memperoleh sel iPS.⁶⁵ Keempat, kebanyakan derivat dan kultur sel iPS mengandung media dan sel *feeder*. Hal ini dapat memengaruhi efisiensi dan kualitas dari sel iPS.⁶⁷ Oleh karena itu, penginduksian memerlukan protokol yang jelas serta reproduksibel.⁶⁸

Metode awal yang menggunakan vektor retrovirus atau lentivirus dapat menyebabkan mutasi insersi yang bersifat tumorigenik.⁴⁷ Pengaktifan ulang ekspresi transgen ketika terjadi diferensiasi sel iPS dapat memengaruhi derivat sel iPS.⁴⁷ Sebagai tambahan, sebuah laporan menyatakan bahwa terdapat variasi epigenetik di antara sel iPS walaupun telah menggunakan metode yang identik.⁶⁸ Untuk mengatasi masalah tersebut, perlu dicari metode yang memungkinkan derivat sel iPS yang bebas terhadap DNA eksogen.⁶⁹ Oleh karena itu, terjadi peningkatan ketertarikan untuk mengembangkan senyawa kimia,⁷⁰ vektor transposon,⁷¹ adenovirus,⁷² plasmid,⁷³

vektor episom,⁷⁴ protein rekombinan,⁷⁵ vektor virus Sandai,⁷⁶ dan RNA yang dimodifikasi.⁷⁷ Terlepas dari permasalahan yang dihadapi, sel iPS mempunyai potensi yang besar untuk tujuan klinik dan *modelling* penyakit.^{78,79} Sel iPS juga dapat digunakan sebagai media riset untuk pengembangan pengobatan klinis. Berdasarkan hasil penelitian oleh Tanaka *et al.* (2009), sel iPS dapat digunakan sebagai model pengujian elektrofisiologis jantung dan skrining obat.⁵⁴ Shukla *et al.* (2017) melakukan penelitian untuk mengidentifikasi target pada sel kanker. Sel epitel saluran napas diinduksi terlebih dahulu agar didapatkan sel iPS. Selanjutnya, perkembangan menuju sel kanker dilakukan dengan induksi rokok.⁶³

Simpulan

Induced pluripotent stem cell (sel iPS) dapat diperoleh dengan induksi sel somatik dengan menggunakan Oct4, Sox2, Klf4, dan c-Myc yang dikenal sebagai faktor OSKM (faktor Yamanaka). Dalam aplikasinya, induksi sel iPS mengalami beberapa hambatan seperti efisiensinya yang rendah serta vektor lentivirus atau retrovirus yang digunakan bersifat tumorigenik. Akan tetapi, sel iPS memiliki potensi yang besar terhadap perkembangan klinis dan *modelling* penyakit. Pengembangan teknologi ini masih memerlukan riset lebih lanjut agar dapat dihasilkan suatu metode yang efisien, efektif serta aman digunakan untuk kepentingan klinis.

Pendanaan

Penulisan artikel *review* ini tidak didanai oleh sumber hibah manapun.

Konflik Kepentingan

Seluruh penulis menyatakan tidak terdapat potensi konflik kepentingan dengan penelitian, kepenulisan (*authorship*), dan atau publikasi

artikel ini.

Daftar Pustaka

- Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981;292:154–6.
- Vallier L, Pedersen RA. Human embryonic stem cells: An in vitro model to study mechanisms controlling pluripotency in early mammalian development. *Stem Cell Rev*. 2005;1(2):119–30. doi: 10.1385/SCR:1:2:119
- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663–76. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024
- Conger K. New method allows human embryonic stem cells to avoid immune system rejection, study finds. 2011 [Accessed on: 21 March 2018]. Available from: <https://med.stanford.edu/news/all-news/2011/03/new-method-allows-human-embryonic-stem-cells-to-avoid-immune-system-rejection-study-finds.html>.
- Lo B, Parham L. Ethical issues in stem cell research. *Endocr Rev*. 2009;30(3):204–13. doi: 10.1210/er.2008-0031
- Hayashi R, Ishikawa Y, Ito M, Kageyama T, Takashiba K, Fujioka T. Generation of corneal epithelial cells from induced pluripotent stem cells derived from human dermal fibroblast and corneal limbal epithelium. *PLoS One*. 2012;7(9):e45435. doi: 10.1371/journal.pone.0045435
- Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*. 2005;122(6):947–56. doi: 10.1016/j.cell.2005.08.020
- Kim JB, Sebastian V, Wu G, Marcos J, Aurazo-Bravo MJ, Sasse P, et al. Oct4-induced pluripotency in adult neural stem

- cells. *Cell.* 2009;136(3):411–9. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.023.
9. Sterneckert J, Hoing S, Scholer HR. Concise review: Oct4 and more: The reprogramming expressway. *Stem Cells.* 2012;30(1):15–21. doi: 10.1002/stem.765.
 10. Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet.* 2000;24: 372–6.
 11. Schepers GE, Teasdale RD, Koopman P. Twenty pairs of sox: Extent, homology, and nomenclature of the mouse and human sox transcription factor gene families. *Dev Cell.* 2002;3(2):167–70. doi: 10.1016/S1534-5807(02)00223-X
 12. Masui S, Nakatake Y, Toyooka Y, Shimosato D, Yagi R, Takahashi K, et al. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol.* 2007; 9(6): 625–35. doi: 10.1038/ncb1589
 13. Boer B, Kopp J, Malianna S, Desler M, Chakravarthy H, Wilder PJ, et al. Elevating the levels of Sox2 in embryonal carcinoma cells and embryonic stem cells inhibits the expression of Sox2: Oct-3/4 target genes. *Nucleic Acids Res.* 2007;35 (6):1773–86. doi: 10.1093/nar/gkm059
 14. Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev.* 2003;17(1):126–40. doi: 10.1101/gad.224503
 15. Kopp JL, Ormsbee BD, Desler M, Rizzino A. Small increases in the level of Sox2 trigger the differentiation of mouse embryonic stem cells. *Stem Cells.* 2008;26(4):903–11. doi: 10.1634/stemcel ls.2007-0951.
 16. Chew JL, Loh YH, Zhang WY, Chen X, Tam WL, Yeap LS, et al. Reciprocal transcriptional regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 complex in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol.* 2005; 25(14): 6031–46. doi: 10.1128/MCB.25.14.6031-6046.2005
 17. Mullen AC, Orlando DA, Newman JJ, Loven J, Kumar RMBS, Bilodeau S. Master transcription factors determine cell-type-specific responses to TGF-β signaling. *Cell.* 2011;147(3):565–76. doi: 10.1016/j.cell.2011.08.050
 18. Tsurozoe S, Ishihara K, Uchimura Y, Watanabe S, Skita Y, Aoto T, et al. Inhibition of DNA binding of Sox2 by the SUMO conjugation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;351(4):920–6. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.10.130
 19. Shields JM, Christy RJ, Yang VW. Identification and characterization of a gene encoding a gut-enriched Kruppel-like factor expressed during growth arrest. *J Biol Chem.* 1996;271(33):20009–17.
 20. Schietz A, Nana D, Rose C, Zocher G, Milanovic M, Koenigsmann J, et al. The structure of the Klf4 DNA-binding domain links to self-renewal and macrophage differentiation. *Cell Mol Life Sci.* 2011; 68(18):3121–31. doi: 10.1007/s00018-010-0618-x.
 21. Geiman DE, Ton-That H, Johnson JM, Yang VW. Transactivation and growth suppression by the gut-enriched Kruppel-like factor (Kruppel-like factor 4) are dependent on acidic amino acid residues and protein-protein interaction. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(5):1106–13. doi: 10.1093/nar/28.5.1106
 22. Ogryzko VV, Schiltz RL, Russanova V, Howard BH, Nakatani Y. The transcription coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferase. *Cell.* 1996;87(5):953–9. doi: 10.1016/S0092-8674(00)82001-2
 23. Barlev NA, Liu L, Chehb NH, Mansfield K, Harris KG, Halazonetis TD, et al. Acetylation of p53 activates transcription through recruitment of coactivators/histone

- acetyltransferases. *Mol Cell.* 2001;8(6):1243–54.
24. Li D, Yea S, Dolios G, Martignetti JA, Narla G, Wang R, et al. Regulation of Krüppel-like factor 6 tumor suppressor activity by acetylatio. *Cancer Res.* 2005;65(20):9216–25. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1040
25. Adhikary S, Eilers M. Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6(8):635–45. doi: 10.1038/nrm1703
26. Sridharan R, Tchieu J, Mason MJ, Yachechko R, Kuoy E, Horvath S, et al. Role of the murine reprogramming factors in the induction of pluripotency. *Cell.* 2008;136(2):364–77. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.001.
27. Molofsky AV, Pardal R, Iwashita T, Park IK, Clarke MF, Morrison SJ. Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation. *Nature.* 2003;425(6961):962–7. doi: 10.1038/nature02060
28. Hynes RO. Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell.* 2002;110(6):673–87. doi: 10.1016/s0092-8674(02)00971-6
29. Nakagawa M, Koyanagi-Aoi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka K, Aoi T. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol.* 2008;26(1):101–6. doi: 10.1038/nbt1374
30. Selvakumaran M, Liebermann D, Hoffman B. The proto-oncogene c-myc blocks myeloid differentiation independently of its target gene ornithine decarboxylase. *Blood.* 1996;88(4):1248–55.
31. Stadfeld M, Maherli N, Breault DT, Hochedlinger K. Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mous. *Cell Stem Cell.* 2008;2(3):230–40. doi: 10.1016/j.stem.2008.02.001.
32. Soufl A, Donahue C, Zaret KS. Facilitators and impediments of the pluripotency reprogramming factors' initial engagement with the genome. *Cell.* 2012;151(5):994–1004. doi: 10.1016/j.cell.2012.09.045.
33. Sridharan R, Plath K. Illuminating the black box of reprogramming. *Cell Stem Cell.* 2008;2(4):295–7. doi: 10.1016/j.stem.2008.03.015.
34. Papapetrou EP, Tomishima MJ, Chambers SM, Mica Y, Reed E, Menon J, et al. Stoichiometric and temporal requirements of Oct4, Sox2, Klf4, and c-Myc expression for efficient human iPSC induction and differentiation. *Prec Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(31):12759–64. doi: 10.1073/pnas.0904825106.
35. 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 smallmolecule. *Nat Biotechnol.* 2008;26(7):795–7. doi: 10.1038/nbt1418.
36. Li R, Liang J, Ni S, Zhou T, Qing X, Li H, et al. A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell.* 2012;7(1):51–63. doi: 10.1016/j.stem.2010.04.014.
37. Buganim Y, Faddah DA, Cheng AW, Istkovich E, Markoulaki S, Ganz K, et al. Single-cell expression analyses during cellular reprogramming reveal an early stochastic and a late hierachic phas. *Cell.* 2012;150(6):1209–22. doi: 10.1016/j.cell.2012.08.023.
38. Brambink T, Foreman R, Welsted GG, Lengner CG, Wernig , Suh H. Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. *Cell Stem Cell.* 2008;2(2):151–9. doi: 10.1016/j.stem.2008.01.004.
39. Polo JM, Anderssen A, Walsh RM, Shwarrz BA, Nefzger CM, Lim SM, et al. A molecular roadmap of reprogramming

- somatic cells into iPS cells. *Cell.* 2012; 151(7):1617–32. doi: 10.1016/j.cell.2012.11.039.
40. Soufl A, Donahue G, Zaret KS. Facilitators and impediments of the pluripotency reprogramming factors' initial engagement with the genome. *Cell.* 2012;151(5):994–1004. doi: 10.1016/j.cell .2012.09.045.
 41. Takahashi K, Yamanaka S. A decade of transcription factor-mediated reprogramming to pluripotency. *Nat Rev Mol Cel Biol.* 2016;17(3):183–93. doi: 10.1038/nrm.2016.8.
 42. Rao M. Conserved and divergent paths that regulate self-renewal in mouse and human embryonic stem cells. *Dev Biol.* 2004;275(2):269–86. doi: 10.1016/j.ydbio.2004.08.013
 43. Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS, Chiu CP, Harris CP, Waknitz MA, et al. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol.* 2000;227(2): 271–8. doi: 10.1006/dbio.2000.9912
 44. Matsuda T, Nakamura T, Nako K, Arai T, Katsuki M, Heike T. STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *EMBO J.* 1999;18(15):4261–9. doi: 10.1093/emboj/18.15.4261
 45. Xu RH, Peck RM, Li DS, Feng X, Ludwig T, Thomson JA. Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells. *Nat Methods.* 2005;2(3):185–90. doi: 10.1038/nmeth744
 46. Ying QL, Nichols J, Chambers I, Smith A. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell.* 2003;115(3):281–92. doi: 10.1016/s0092-8674(03)00847-x
 47. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 2007;131(5):861–72. doi: 10.1016/j.cell.2007.11.019
 48. Zhou Q, Brown J, Kanarek A, Rajagopal J, Melton DA. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to β cells. *Nature.* 2008;455(7213):627–32. doi: 10.1038/nature07314.
 49. 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. doi: 10.1126/science.1154884.
 50. 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. doi: 10.1182/blood-2009-02-204800.
 51. Aasem T, Raya A, Barrero MJ, Garreta E, Consiglio A, Gonzales F, et al. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. 2008; 26(11):1276–84. doi: 10.1038/nbt.1503.
 52. Verbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP, Kokubu Y, Sudhof TC, Wernig M. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature.* 2010; 463:1035–41
 53. Tamaoki N, Takahashi K, Tanaka T, Ichisaka T, Aoki HTKT, et al. Dental pulp cells for induced pluripotent stem cell banking. *J Dent Res.* 2010;89(8):773–8. doi: 10.1177/0022034510366846
 54. Tanaka T, Shugo T, Mitsushige M, Fumimasa N, Tomoyuki K, Hao C, et al. In vitro pharmacologic testing using human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;385(4):497–502. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.05.073.
 55. Lee HK, Peter M, John W, Eugene BH, Weiming X. Induced pluripotent stem cells (iPCSSs) derived from frontotemporal

- dementia patient's peripheral blood mononuclear cells. *Stem Cell Res.* 2015; 15(2):325–7. doi: 10.1016/j.scr.2015.07.004.
56. Mao J, Zhang Q, Ye X, Liu K, Liu L. Efficient induction of pluripotent stem cells from granulosa cells by Oct4 and Sox2. *Stem Cells Dev.* 2014;23(7):779–89. doi: 10.1089/scd.2013.0325.
57. Verlinsky Y, Strechenko N, Kukarenko V, Rechitsky S, Verlinsky O, Galat V. Human embryonic stem cell lines with genetic disorders. *Reprod Biomed Online.* 2005; 10(1):105–10.
58. Park IH, Arora N, Huo H, Maherali N, Ahfeldt T, Shimamura. Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell.* 2008; 134(5):877–86. doi: 10.1016/j.cell.2008.07.041.
59. Fliefel R, Ehrenfeld M, Otto S. Induced pluripotent stem cells (iPSCs) as a new source of bone in reconstructive surgery: A systematic review and meta-analysis of preclinical studies. *J Tissue Eng Regen Med.* 2018; 12(7):1780–97. doi: 10.1002/term.2697.
60. Hayashi R, Yuki I, Miyuki I, Tomofumi K, Kuniko T, Tsuyoshi F, et al. Generation of corneal epithelial cells from induced pluripotent stem cells derived from human dermal fibroblast and corneal limbal epithelium. *PLoS One.* 2012;7(9): e45435. doi: 10.1371/journal.pone.0045435.
61. Hirami Y, Fumitaka O, Kazutoshi T, Keisuke O, Shinya Y, Hanako I, et al. Generation of retinal cells from mouse and human induced pluripotent stem cells. *Neurosci Lett.* 2009;458(3):126–31. doi: 10.1016/j.neulet.2009.04.035.
62. Ohta S, Imaizumi Y, Okada Y, Akamatsu W, Kuwahara R, Ohyama M, et al. Generation of human melanocytes from induced pluripotent stem cells. *PLoS One.* 2011;6(1): e16182. doi: 10.1371/journal.pone.0016182
63. Shukla V, Rao M, Zhang H, Beers J, Wangsa D, Buishand FO, et al. Identification of novel targets for lung cancer therapy using an induced pluripotent stem cell model. *Ann Am Thorac Soc.* 2018;15(2):S127–8. doi: 10.1513/AnnalsATS.201707-610MG
64. Schmitt CE, Morales BM, Schmitz EMH, Hawkins JS, Lizama CO, Zape JP. Fluorescent tagged episomals for stoichiometric induced pluripotent stem cell reprogramming. *Stem Cell Res Ther.* 2017;8(1):132. doi: 10.1186/s13287-017-0581-7
65. Lin PY, Hsu SC, Chen HC, Len WB, Hsiao FC, Liu MC, et al. Optimization of reprogramming culture conditions for the generation of induced pluripotent stem cells from Collal 4F2A-Oct4-GFP mice with high efficiency. *FEBS J.* 2018;285(9):1667–83. doi: 10.1111/febs.14436.
66. Yu J, Thomson JA. Induced pluripotent stem cells in principles of tissue engineering. London: Elsevier Inc; 2014. doi: 10.1016/C2011-0-07193-4
67. Martin MJ, Muotri A, Gage F, Varki A. Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid. *Nat Med.* 2005;11(2):228–32. doi: 10.1038/nm1181
68. Wilson KD, Wu JC. Induced Pluripotent Stem Cells. *J Am Med Assoc.* 2015; 313(16):1613–4. doi: 10.1001/jama.2015.1846.
69. Cox JL, Angie R. Induced pluripotent stem cells: What lies beyond the paradigm shift. *Exp Biol Med (Maywood).* 2010; 235(2):148–58. doi: 10.1258/ebm.2009.09267.
70. Zhu S, Li W, Zhou H, Wei W, Ambasudhan R, Lin T, et al. Reprogramming of human primary somatic cells by OCT4 and chemical compounds. *Cell Stem Cell.* 2010;7(6):651–5. doi: 10.1016/j.stem.2010.05.010

- 10.11.015.
71. Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, Desai R, Mileikovsky M, Hämäläinen R, et al. piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent. *Nature*. 2009;458(7239):766–70. doi: 10.1038/nature07863.
72. Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, Weir G, Hochedlinger K. Induced pluripotent stem cells generated without vireal integration. *Science*. 2008;322(5903):945–9. doi: 10.1126/science.1162494.
73. Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science*. 2008;322 (5903):949–53. doi: 10.1126/science.1164270.
74. Okita K, Hong H, Takahashi K, Yamanaka S. Generation of mouse induced pluripotent stem cells with plasmid vectors. *Nat Protoc*. 2010;5(3):418–28. doi: 10.1038/nprot.2009.231.
75. Zhou HY, Wu SL, Joo JY, Zhu SY, Han DW, Lin TX, et al. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell*. 2009;4(5):381–4. doi: 10.1016/j.stem.2009.04.005.
76. Ban H, Nishishita N, Fusaki N, Tabata T, Sseki K, Shikamura M, et al. Efficient generation of transgene-free human induced pluripotent stem cells (iPSCs) by temperature-sensitive Sendai virus vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108(34):14234–9. doi: 10.1073/pnas.1103509108.
77. Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, Loh YH, Li H, Lau F, et al. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell*. 2010;7(5):618–30. doi: 10.1016/j.stem.2010.08.012.
78. Aviñor Y, Sagi I, Benvenisty N. Pluripotent stem cells in disease modelling and drug testing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016;17 (3):170–82. doi: 10.1038/nrm.2015.27
79. Trounson A, DeWitt ND. Pluripotent stem cells progressing to the clinic. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016;17(3):194–200. doi: 10.1038/nrm.2016.10.