

# Auf verschlungenen Pfaden zur Pluripotenz (Nobel-Aufsatz)\*\*

Shinya Yamanaka\*

Klonierung · Pluripotente Stammzellen ·  
Reprogrammierung · Wirkstoffsuche · Zelltherapie

## Einleitung

Dr. John Gurdon wurde für wegweisende Ergebnisse geehrt, die er 1962 in Form der ersten experimentellen Hinweise auf die Reprogrammierung von Zellen durch Transplantation amphibischer somatischer Zellkerne in entkernte Oozyten erhalten hatte.<sup>[1]</sup> Dieser technologische Durchbruch begründete ein neues Prinzip: Jeder Kern einer differenzierten Zelle enthält einen vollständigen Satz an Bauplänen für den gesamten Körper, und Oocyten besitzen ein gewisses Potenzial zur Zellreprogrammierung.

Inspiriert durch diese Erkenntnisse und sich anschließende Forschungsergebnisse identifizierten wir vier Transkriptionsfaktoren, die in somatischen Zellen durch verstärkte Expression Pluripotenz induzieren können, und konsolidierten effektive Reprogrammierungsverfahren in Mauszellen im Jahr 2006<sup>[2]</sup> und in humanen Zellen im Jahr 2007.<sup>[3]</sup> Diese reprogrammierten Zellen wurden „induzierte pluripotente Stammzellen“ (iPS-Zellen; induced pluripotent stem cells) genannt. Im folgenden Überblick werde ich mich auf den experimentellen Hintergrund der Erzeugung von iPS-Zellen und die künftigen Perspektiven der iPS-Zellforschung, die sich seither rasant entwickelt, konzentrieren.

## Meine Anfänge als Wissenschaftler

Ich habe an der Universität Kobe in der School of Medicine promoviert und erhielt meine Approbation im Jahr 1987. Ich ging in die orthopädische Chirurgie und begann als Assistenzarzt in Osaka. Während der Schulzeit hatte ich Judo und Rugby betrieben und mich dabei oft verletzt, unter anderem hatte ich 10 Knochenbrüche überall im Körper. Daher stammte mein Interesse an Orthopädie und Chirurgie. Ich wollte vor allem übertrainierte und verletzte Patienten behandeln.

1989 nahm mein Leben jedoch eine neue Wende weg von der klinischen chirurgischen Orthopädie hin zur Grundlagenforschung. Dafür gab es zwei Gründe: Erstens war ich kein besonders talentierter Chirurg; zweitens traf ich auf viele Patienten, die an unheilbaren Krankheiten und Verletzungen litten, die sogar hochbegabte Chirurgen und Ärzte nicht heilen konnten. So hatte ich Patienten, die an Rückenmarksverletzungen, amyotropher Lateralsklerose und Osteosarkomen litten. Außerdem verstarb mein Vater während dieser Zeit an Leberzirrhose. Medizinische Grundla-

genforschung ist die einzige Möglichkeit, Hilfe für solche Patienten zu finden. Daher beschloss ich, wieder zurück an die Universität zu gehen. Im April 1989 wurde ich Doktorand an der Osaka City University Medical School.

Von den vielen Abteilungen der Universität suchte ich mir das Department of Pharmacology unter Leitung von Professor Kenjiro Yamamoto aus. Beim Bewerbungsgespräch konnte ich nicht viele Fragen zur Pharmakologie beantworten, weil ich mich als Medizinstudent nicht intensiv genug mit Pharmakologie befasst hatte. Stattdessen versuchte ich meinen Gesprächspartner, Dr. Fumio Ikemoto, zu überzeugen, dass ich trotz mangelnder Kenntnisse ernsthaft medizinische Grundlagenforschung betreiben wollte. Ich bin daher sehr dankbar, dass Dr. Ikemoto mich in seine Abteilung aufnahm. Er betonte immer wieder, dass wir keine Forschung betreiben sollten, mit der wir nur die Resultate anderer reproduzieren. Stattdessen sollten wir etwas Einzigartiges und Neues bearbeiten. Während meiner wissenschaftlichen Ausbildung hatte ich das große Glück, zwei Arten von Lehrmeistern zu haben: große Mentoren und unerwartete Ergebnisse bei meinen Experimenten.

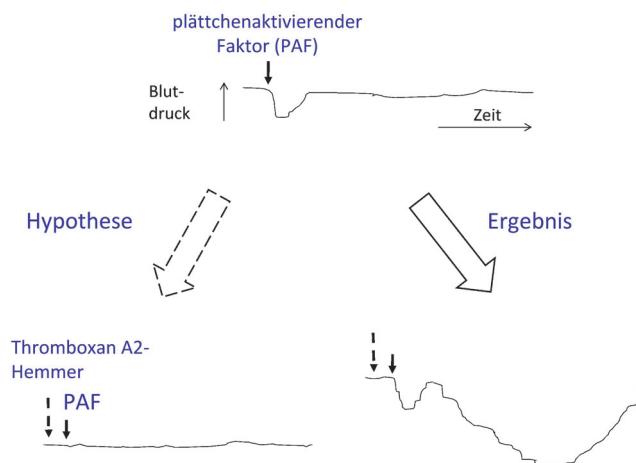
Mein direkter Betreuer war Dr. Katsuyuki Miura. Während der ersten Monate meiner Doktorandenzzeit empfahl er mir, so viele Manuskripte wie möglich zu lesen und neue Projekte vorzuschlagen. Ich hatte das Gefühl, als solle ich auf eine weiße Leinwand zeichnen, was immer ich wolle. Diese Art der Betreuung war ganz anders als das, was ich als Assistenarzt erlebt hatte. In der Klinik hatte ich nur wenig Freiraum und hatte den Anweisungen der Oberärzte und Lehrbücher zu folgen. Ich dachte „Toll, ich liebe dieses System!“ Außerdem wies mich Dr. Miura oft darauf hin, dass wir weltweit konkurrierten. Mit jedem Projekt konkurrierten wir mit Wissenschaftlern der ganzen Welt, meistens in den USA oder Europa. Auch dies war ganz anders als in der Klinik, in der ich nur mit den anderen Ärzten konkurrierte. Die Idee einer „weltweiten“ Konkurrenz war mir nie ge-

[\*] Prof. S. Yamanaka  
Center for iPS Cell Research and Application (CiRA)  
Kyoto University, Kyoto 606-8507 (Japan)  
und  
Gladstone Institute of Cardiovascular Disease  
San Francisco, CA 94158 (USA)  
E-Mail: yamanaka@frontier.kyoto-u.ac.jp

[\*\*] Copyright© The Nobel Foundation 2012. Wir danken der Nobelstiftung, Stockholm, für die Genehmigung zum Abdruck einer deutschen Fassung dieses Vortrages.

kommen, als ich im Krankenhaus arbeitete. Daher fand ich insgesamt, dass Grundlagenforschung meinen Interessen und meiner Veranlagung eher entgegenkam.

Im Sommer 1989 suchte ich noch immer nach meinem Projekt. Dr. Miura schlug für den Anfang ein einfacheres Projekt vor. Ich sollte ein vasoaktives Molekül, den Plättchenaktivierungsfaktor PAF (platelet activating factor) bei der Regulation des Blutdrucks in Hunden untersuchen (Abbildung 1). Weil bekannt war, dass die intravenöse Injektion



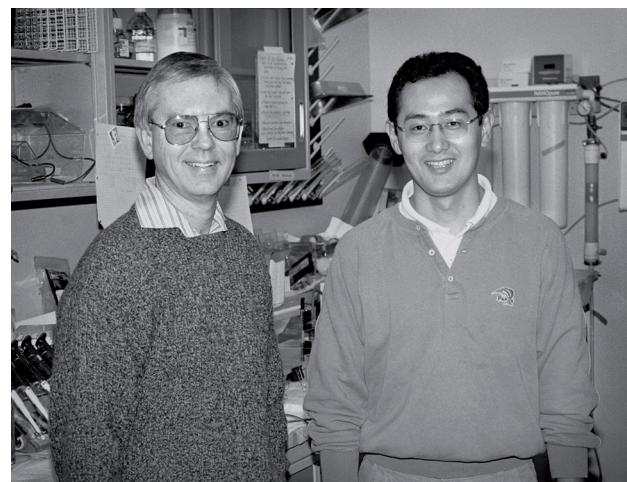
**Abbildung 1.** Mein erstes Experiment als Doktorand. Die intravenöse Injektion des vasoaktiven plättchenaktivierenden Faktors (PAF) verursachte eine vorübergehende Senkung des Blutdrucks in Hunden (oben). Wir vermuteten, dass dieser Druckabfall durch eine Vorbehandlung mit einem Thromboxan-A2-Inhibitor blockiert werden könnte (unten links). Überraschenderweise stellte sich ein nachhaltiger niedriger Blutdruck ein (unten rechts).

von PAF bei Hunden eine vorübergehende Senkung des Blutdrucks (transiente Hypotonie) verursacht, vermutete Dr. Miura, dass diese Erscheinung durch ein anderes gefäßwirk- sames Moleköl, Thromboxan A2, vermittelt wird. Wenn diese Hypothese stimmte, sollte eine Vorbehandlung mit einem Thromboxan A2-Inhibitor den PAF-induzierten Blutdruck- abfall blockieren. Mein erstes Experiment, das ich an Hunden mit einem Thromboxan-Inhibitor durchführte, beruhte auf dieser Hypothese; daher erwartete ich keinen Blutdruckab- fall bei den vorbehandelten Hunden. Es hätte ein einfaches, für einen Anfänger geeignetes Experiment sein können. Das Ergebnis war jedoch völlig unerwartet. Zunächst schien der Thromboxan-Inhibitor nicht zu wirken, denn die nachfol- gende Behandlung mit PAF löste den üblichen transienten Blutdruckabfall aus. Zu unserer Überraschung kam es jedoch ein paar Minuten nach der Behandlung zu einer starken und langanhaltenden Senkung des Blutdrucks, die wir mit PAF alleine noch nie gesehen hatten (Abbildung 1). Ich war so aufgeregt! Ich rannte zu Dr. Miuras Büro und teilte ihm das Ergebnis mit. Obwohl es seine Hypothese nicht stützte, war Dr. Miura ebenso aufgeregt und ermutigte mich, den Befund näher zu untersuchen. Ich brauchte zwei Jahre, um den Mechanismus für dieses unerwartete Resultat aufzuklären.<sup>[4,5]</sup> Es war ein großer Glücksfall, dass ich in meinem allerersten

Experiment als Doktorand auf ein solches unerwartetes Er- gebnis stieß.

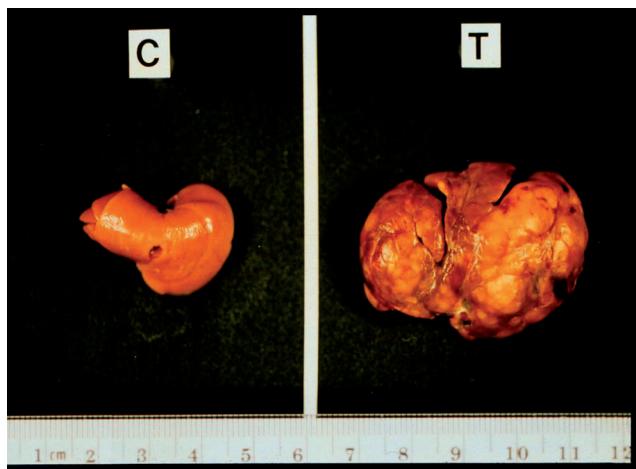
Spätestens in dieser Phase wusste ich, dass ich die richtige Laufbahn eingeschlagen hatte. Während meiner Doktorar- beit war ich allerdings oft über den wissenschaftlichen Ansatz frustriert, der auf pharmakologischen Werkzeugen wie Inhi- bitoren und Agonisten beruhte. Kein Wirkstoff kann zu 100% spezifisch oder wirksam sein, sodass man ständig mit unspezifischen Aktivitäten oder unvollständigen Blockaden der Zielstrukturen zu tun hat. Dagegen war ich fasziniert von den schnell aufkommenden gentechnischen Methoden, die in Mäusen angewendet wurden, vor allem von der Knock-out- Technologie, mit der jedes interessierende Gen vollständig und spezifisch entfernt werden kann. Es gab wenige Arbeitsgruppen in Japan, die diese Technologie aus den USA oder Europa für ihre pharmakologischen Untersuchungen mitbrachten. Diese Technologie erschien mir wie ein Wunder. Ich wollte sie unbedingt in meiner eigenen Forschung ein- setzen. Um die gentechnischen Methoden an der Maus zu lernen, bemühte ich mich um eine Postdoc-Stelle in den USA, wo die Technik in vielen Labors verwendet wurden. Ich stu- dierte die Stellenangebote in Zeitschriften wie *Nature*, *Sci- ence* und *Cell* und bewarb mich in möglichst vielen Labora- torien. Als erster antwortete Dr. Thomas (Tom) Innerarity vom Gladstone Institute of Cardiovascular Disease in San Francisco (Abbildung 2) auf meine Bewerbung. Nach einem kurzen telefonischen Vorstellungsgespräch bot Tom mir eine Stelle an. Im April 1993 überquerte ich den Pazifik mit meiner Frau und meinen zwei kleinen Töchtern.

In Toms Labor forschte ich zunächst über die Mechanis- men, die der Genexpression von ApoB (Apolipoprotein B), einem Bestandteil von LDL (low density lipoprotein), zu- grunde liegen, und die als bedeutsam für die Cholesterinre- gulation angesehen werden. Wir konzentrierten uns speziell auf den mRNA-editierenden Faktor APOBEC1 (ApoB mRNA editing catalytic subunit 1), um die Genfunktion zu analysieren. Unsere eigentliche Absicht war, die Möglichkeit einer Gentherapie bei familiärer Hypercholesterinämie zur



**Abbildung 2.** Meine Zeit am Gladstone Institute als Postdoktorand. Das Bild wurde mit Dr. Thoms Innerarity in seinem Labor aufge- nommen (1995, Gladstone Institutes).

Vermeidung von Arteriosklerose auszuloten. Tom vertrat die Hypothese, dass die Überexpression von APOBEC1 in der Leber den Cholesterinspiegel im Plasma senken würde, und er wollte dies an transgenen Mäusen, die APOBEC1 spezifisch in der Leber überexprimieren, testen. Mit viel intensiver Arbeit konnte ich die transgenen Mauslinien schnell erzeugen. Die Ergebnisse, die wir erhielten, waren aber völlig unerwartet. Der Leib der transgenen Mäuse war aufgetrieben als wären die Tiere trächtig, gleich, ob sie männlich oder weiblich waren. Die Autopsie ergab ein ungewöhnlich häufiges Vorkommen von Lebertumoren in diesen Mäusen (Abbildung 3).<sup>[6]</sup> APOBEC1 erwies sich als sehr wirksames



**Abbildung 3.** Leberzell-Karzinom in einer transgenen APOBEC1-Maus. Leber einer nicht transgenen Kontrollmaus (links) und einer transgenen Maus (rechts).<sup>[6]</sup> (Copyright 1995, the National Academy of Sciences.)

Onkogen. Daher kann man dieses Gen niemals für eine Gentherapie nutzen. Ich fand dieses unerwartete Ergebnis wieder sehr spannend, obwohl es zeigte, dass APOBEC1 nicht für die Vermeidung von Arteriosklerose geeignet war und damit mein ursprünglicher Forschungsansatz gescheitert war. Dr. Innerarity unterstützte mich weiter, als ich beschloss, über Leberkrebs zu forschen, obwohl seine Hypothese widerlegt worden war. Er war über ein überraschendes Ergebnis immer genauso erfreut wie Dr. Miura. Er schlug vor, weiter an APOBEC1 zu arbeiten, um die Mechanismen aufzuklären, die zur Tumorbildung führen. Ich war seinerzeit der einzige, der am Gladstone Institute of Cardiovascular Diseases über Leberkrebs forschte.

Dann traf ich wieder auf jemanden, der für mein Leben in Gladstone sehr wichtig werden sollte. Es war der damalige Institutspräsident Dr. Robert Mahley. Er sprach einmal zu uns, den Postdocs, wie man in der Wissenschaft erfolgreich wird. Er sagte, das Geheimnis sei „VW“. Er fährt bis heute einen Volkswagen, aber in diesem Fall meinte er mit VW nicht Volkswagen, sondern Vision und harte Arbeit (work). Dr. Mahley ermahnte uns, eine klare Vision zu entwickeln und dann hart an diesem Ziel zu arbeiten. Ich arbeitete sehr hart, Tag und Nacht. Aber mir wurde klar, dass ich keine klare Vision hatte. Warum führte ich viele meiner Experimente

durch? Warum hörte ich mit der Arbeit an der Klinik auf und wurde Postdoc in den USA? Dann wurde mir klar, dass meine Vision oder Motivation Wissenschaft zu betreiben, der Wunsch war, zu Gesundheit und langem Leben der Patienten beizutragen. Natürlich können wir nicht sofort allen Patienten mit unseren Laborexperimenten helfen. Aber die medizinische Grundlagenforschung hat das Potenzial, Tausenden von Patienten zu helfen, die an unheilbaren Erkrankungen und Verletzungen leiden.

Wie bereits erwähnt, hatte ich am Anfang meiner Wissenschaftlerlaufbahn großes Glück mit zwei Arten von Lehrmeistern: Zunächst meine Betreuer, Dr. Miura, Dr. Innerarity und Dr. Mahley, die mich ermutigten, meine Projekte weiter zu verfolgen, obwohl die Versuchsergebnisse ihren Hypothesen widersprachen. Sie waren für mich Vorbilder, denen ich folgen wollte. Der andere große Lehrmeister war die Natur selbst, die mich mit völlig überraschenden Ergebnissen zu ganz neuen Forschungsthemen führte. Ohne diese beiden Lehrmeister hätte ich nie mit der Forschung begonnen, die mich letztlich zur Generierung von iPS-Zellen führte.

### Die Forschung bis zur Herstellung von iPS-Zellen

Die Auslöser, mich mit der Reprogrammierung von Zellen zu befassen, waren eine weitere Serie völlig unerwarteter experimenteller Ergebnisse und meine Konfrontation mit embryonalen Stammzellen (ES-Zellen). Während ich an den molekularen Mechanismen der Karzinogenese durch APOBEC1 arbeitete, entdeckte ich ein interessantes Molekül, das ein neues Angriffsziel von APOBEC1 war. Ich nannte es NAT1 (novel APOBEC1 target #1).<sup>[7]</sup> Die Überexpression von APOBEC1 führte zu einer abweichenden Prozessierung an zahlreichen Stellen der NAT1-mRNA, darunter auch solchen, die verfrühte Stopcodons erzeugen. Dadurch nahm die Konzentration des NAT1-Proteins stark ab. Ich fand auch heraus, dass das NAT1-Protein dem eukaryotischen Translationsinitiationsfaktor (eIF) 4G ähnelt und wahrscheinlich als Translationsregulator wirkt. Diese Beobachtungen führten mich zu der These, dass NAT1 als Tumorsuppressoren wirken könne. Um dies zu überprüfen, entschloss ich mich, NAT1-Knock-out-Mäuse zu züchten. Dazu musste ich bei meinem Freund Dr. Robert Farese jr., der das Zentrallabor für ES-Zellen und Knock-out-Mäuse in Gladstone aufgebaut hatte, die Methode lernen, wie man Knock-out-Mäuse erzeugt (dazu gehört auch die Konstruktion und Herstellung von entsprechenden Vektoren und die Kultivierung von murinen ES-Zellen). Damals bin ich zum ersten Mal mit ES-Zellen in Berührung gekommen.

Und wieder arbeitete ich hart. Seit drei Jahren war ich nun in Gladstone, und meine Frau musste nach Japan zurückgehen, weil wir unsere älteste Tochter in Japan zur Schule schicken wollten. Nachdem meine Familie San Francisco verlassen hatte, arbeitete ich noch mehr. Ich wollte einfach die Funktion von NAT1 aufklären, von jenem Gen, das ich selbst identifiziert hatte. Ohne die Familie zu Hause hatte ich nichts anderes zu tun. Ich arbeitete buchstäblich rund um die Uhr. Ich konstruierte schnell den erforderlichen Vektor und erhielt die entsprechend veränderten ES-Zellklone. Im Zen-

trallabor bat ich, diese Klone in Mäuseblastocysten zu injizieren, um chimäre Mäuse zu erzeugen. Ich war glücklich über meine wissenschaftlichen Fortschritte.

Zur gleichen Zeit wurde ich aber immer einsamer ohne meine Familie. Die einzige Möglichkeit, mit ihr zusammenzuleben, war, nach Japan zurückzukehren. Zum Glück erhielt ich ein Stipendium der japanischen Regierung und entschloss mich, in Japan eine zweite Postdoc-Stelle anzunehmen. Durch die unschätzbare Hilfe und Großzügigkeit von Dr. Innerarity konnte ich die Arbeit an NAT1 auch nach meiner Rückkehr nach Japan an der Osaka City University Medical School fortsetzen. Im darauffolgenden Jahr wurde ich Assistant Professor und forschte weiter an NAT1.

Die Erzeugung der NAT1-Knock-out-Mäuse lief glatt. Wir erhielten gute Chimären und danach F1-heterozygote Mausmutanten. Tom schickte mir diese F1-Mäuse. Es gelang mir jedoch nicht, aus diesen durch Kreuzung homozygote Mutanten zu erhalten, was nahelegte, dass NAT1 für die Entwicklung der Maus essentiell ist. Ich kämpfte dann mit der Analyse der mutierten Embryos, denn ich hatte ebensowenig wie irgendjemand aus meiner Umgebung je über Maus-Embryogenese geforscht. Ich lernte aus den Lehrbüchern, wie man Embryos sezert. Mit viel Ermutigung von meinen Kollegen, darunter Dr. Katsuyuki Miura zeigte ich schließlich, dass in NAT1 mutierte Embryonen etwa zur Zeit der Einistung abstarben.

Um die Funktionen von NAT1 weiter zu charakterisieren, erzeugte ich in ES-Zellen homozygote Deletionsmutanten. Ich fand heraus, dass sich die NAT1-Nullmutanten normal teilten, wenn sie auf undifferenzierten Fütterzellen gehalten wurden. Ohne Fütterzellen oder Leukämie-inhibierenden Faktor beobachtete ich deutliche Unterschiede. Unter diesen Bedingungen differenzierten die Wildtyp-ES-Zellen schnell in ihrer Morphologie und Genexpression. Hingegen zeigten die mutierten ES-Zellen eine Resistenz gegen die Differenzierung. Dies bedeutete, dass NAT1 für die Erhaltung der Pluripotenz von ES-Zellen essentiell war.<sup>[8]</sup> Dies war der entscheidende Moment, in dem ES-Zellen Hauptgegenstand meiner Forschung wurden. In meiner weiteren Forschung entwickelten sie sich weg von einem reinen Werkzeug (Erzeugung von Knock-out-Mäusen) dank der unerwarteten Ergebnisse der Funktionsanalyse von NAT1. Dieses unerwartete Resultat änderte mein Projekt ein weiteres Mal – von Krebs zu ES-Zellen.

Säuger-ES-Zellen wurden erstmalig 1981 von Dr. Martin Evans und auch von Dr. Gail R. Martin aus Maus-Embryonen gewonnen. ES-Zellen haben zwei wichtige Eigenschaften.<sup>[9,10]</sup> Die eine ist ihre schnelle Proliferation, die sie quasi unsterblich macht. Die andere wichtige Eigenschaft ist die Pluripotenz, die Fähigkeit also, in praktisch alle Arten somatischer und Keimzellen, die im Organismus existieren, zu differenzieren. NAT1 ist für die Pluripotenz essentiell, nicht aber für die schnelle Proliferation der Maus-ES-Zellen. Wegen der wichtigen Rolle von NAT1 erwachte mein Interesse für die Biologie der ES-Zellen.

Obwohl ich wichtige Erkenntnisse über die molekularen Funktionen von NAT1 sammeln konnte, wurde ich allmählich unzufrieden und fragte mich, ob meine Grundlagenforschung irgendwann für die klinische Medizin bedeutsam werden

könne, denn das war mein eigentliches Ziel. Ich arbeitete an einer Medical School, an der die meisten meiner Kollegen an medizinischen Forschungsprojekten wie Wirkstoffentwicklung oder Aufklärung der Pathophysiologie von Erkrankungen beteiligt waren. Meine Vision war (und ist es noch immer), mit Grundlagenforschung zur Heilung von Patienten beizutragen, doch ich war nicht sicher, ob die Arbeiten an NAT1 und Maus-ES-Zellen für diese Vision hilfreich waren. Zu dieser Zeit sagten die Kollegen oft zu mir: „Shinya, diese Mauszellen sind ja vielleicht interessant, aber du solltest etwas tun, was enger mit humanen Erkrankungen und Humanmedizin zusammenhängt.“ Zum Glück ereigneten sich in den späten 90er Jahren jedoch zwei Dinge, die mich darin bestärkten, weiter mit den ES-Zellen zu arbeiten.

Das erste Ereignis war die Erzeugung humaner ES-Zellen durch Dr. James Thomson an der University of Wisconsin im Jahr 1998.<sup>[11]</sup> Schon unmittelbar nach Veröffentlichung des Artikels fand das Gebiet der ES-Zellforschung große öffentliche Aufmerksamkeit, wegen der möglichen Anwendung in der regenerativen Medizin. Humane ES-Zellen haben die beiden gleichen Eigenschaften wie Maus-ES-Zellen: schnelle Proliferation und Pluripotenz. Humane ES-Zellen können unbegrenzt vermehrt werden, und sie lassen sich in verschiedene Arten humaner somatischer Zellen differenzieren, wie dopaminerige Neuronen, neurale Stammzellen, Herzellen usw. Diese humanen Zellen sollten für die Behandlung von Patienten nutzbar sein, die unter Erkrankungen und Verletzungen wie Parkinsonscher Krankheit, Rückenmarkverletzungen und anderen leiden. So zeigte sich wiederum, dass ES-Zellen selbst Patienten helfen konnten – und zwar nun nicht Mäuse- sondern menschlichen Patienten. Beim ersten Lesen der Veröffentlichung von Dr. Thompson wurde ich sehr aufgeregt – ich kann mich noch gut an den Augenblick erinnern. Die Erzeugung und Verwendung von ES-Zellen ist allerdings mit dem ethischen Hindernis behaftet, dass menschliche Embryonen benutzt werden, und in Japan war der Gebrauch von humanen ES-Zellen nicht erlaubt. Die Forschung an humanen ES-Zellen wurde damit für mich zu einer fernen und verbotenen Welt.

Das andere Ereignis, das mich ermutigte, war meine Förderung. Ich erhielt die Chance, eine eigene Arbeitsgruppe aufzubauen. 1999 wechselte ich als Associate Professor zum Nara Institute of Science and Technology (NAIST). Die Stelle war 1998 in einer japanischen Wissenschaftszeitschrift angekündigt. Gesucht war ein Associate Professor, der ein eigenes Labor leiten sollte, während er eine zentrale Einrichtung für Gentechnologie an Mäusen organisieren sollte. Die Stellung schien perfekt für mich geeignet, und so entschloss ich mich zu einer Bewerbung. Ich erwartete nicht, angenommen zu werden, da ich nur wenige Publikationen auf diesem Feld vorweisen konnte. Zu meiner Überraschung wurde ich jedoch zu einem Bewerbungsvortrag an dem Institut eingeladen, und, was noch überraschender war, ich bekam die Stelle!

Im Dezember dieses Jahres durchschritt ich das Haupttor des NAIST mit Aufregung und Nervosität. Das NAIST ist eine der wenigen nationalen Universitäten in Japan, die nur Naturwissenschaftler ausbilden (die meisten besitzen auch medizinische und zahnmedizinische Ausbildungsgänge). Es hat einen schönen Campus, gute Ausstattung, talentierte Fa-

kultätsmitglieder und – am wichtigsten – hochmotivierte und brillante Diplomanden und Doktoranden. Meine Frustration verschwand wie von selbst. Dank dieser beiden Ereignisse, der Erzeugung humaner ES-Zellen und meiner Beförderung zum Associate Professor am NAIST, konnte ich meine Forschung an ES-Zellen fortsetzen.

Und dann fielen mir die Buchstaben „VW“ wieder ein. Nun, da ich mein eigenes Labor aufbaute, fand ich, dass ich eine klare Vision oder ein Fernziel brauchte, das ich mit den künftigen Mitarbeitern meines Labors teilen wollte. Viele Labors, die über ES-Zellen forschten, vor allem auch diejenigen mit einem guten Ruf, arbeiteten an einer gerichteten *In-vitro*-Differenzierung von Zellen zu verschiedenen Entwicklungslinien wie Herzmuskelzellen oder neuronale Zellen. Ich hielt es nicht für klug, mit diesen Arbeitsgruppen zu konkurrieren, weil mein Labor sehr klein und neu war. Ich entschloss mich, das Gegenteil zu versuchen: Wir würden versuchen, ES-Zell-ähnliche pluripotente Stammzellen zu entwickeln, die nicht aus Embryonen stammten, sondern aus differenzierten somatischen Zellen. Damit würden wir die Hindernisse umgehen, mit denen die Entwicklung medizinischer Verfahren auf der Basis humaner ES-Zellen konfrontiert war, vor allem den Gebrauch menschlicher Embryonen und die Immunabstoßung nach Transplantation. Ich begann also mit den Versuchen, somatische Zellen zurück in den embryonalen Zustand zu reprogrammieren.

Ich wusste, dass die Reprogrammierung möglich war, zumindest theoretisch. Verfahren zur Reprogrammierung somatischer Zellen waren von verschiedenen Arbeitsgruppen entwickelt worden. So gelang es beispielsweise Dr. Ian Wilmut, das erste Säugetier, das Schaf Dolly, zu klonieren, indem er den Kern einer voll entwickelten Zelle in ein entkerntes Ei verpflanzte.<sup>[12]</sup> Die Effizienz der Methode war allerdings extrem niedrig. Außerdem war dieses System technisch sehr schwierig auf Primaten oder gar Menschen zu übertragen. Ein anderes Beispiel war die Zellfusion zwischen ES-Zellen und somatischen Zellen, um die Pluripotenz zu erreichen.<sup>[13]</sup> Die fusionierten Zellen waren aber aufgrund ihrer Tetraploidie für einen klinischen Einsatz kaum geeignet. Die Tatsache jedoch, dass somatische Zellen durch Verpflanzung des Zellkerns oder Fusion mit ES-Zellen wieder pluripotent werden konnten, war eine große wissenschaftliche Ermutigung, denn sie führte uns zu der Hypothese, dass Oocyten oder ES-Zellen intrinsische Faktoren enthalten, die somatische Zellen in einen pluripotenten Zustand zurückversetzen können.

Zusätzlich zu dieser allgemeinen Einschätzung gab es auch andere Entdeckungen von zentralen Transkriptionsfaktoren, die an der Entwicklung von Wirbeltieren beteiligt sind, wie Antennapedia in der Fliege<sup>[14]</sup> oder MyoD in der Maus.<sup>[15]</sup> Von da aus war es ein einfacher logischer Schritt abzuleiten, dass eine Kombination solcher Faktoren in der Lage sein sollte, Pluripotenz in somatischen Zellen zu induzieren. Ich wusste nur nicht, welche oder wieviele Faktoren benötigt würden. Als wir mit unseren Forschungen begannen, hätten es einer, mehrere oder hundert oder gar mehr sein können, und wir glaubten damals, dass das Projekt 10, 20, 30 oder auch mehr Jahre bis zu seinem Abschluss brauchen würde.

Ich vermutete, dass viele der Reprogrammierungsfaktoren vorwiegend in Eiern und ES-Zellen exprimiert würden. Für die Suche nach Faktoren, die spezifisch in ES-Zellen gebildet würden, wollten wir eine EST(expressed sequence tag)-Datenbank verwenden, die eine Art Katalog von Genen ist, die in jedem Gewebe oder Organ exprimiert werden, und der durch zufällige Sequenzierung von cDNA-Bibliotheken aus Geweben oder Organen verschiedener Arten erhalten wird. Gerade rechtzeitig wurden in großem Umfang EST-Daten aus der Maus von RIKEN zur Verfügung gestellt.<sup>[16]</sup> Außerdem konnte man nun auf ein Programm des National Center for Biotechnology Information (NCBI) zurückgreifen, das EST-Datenbanken analysierte und das Expressionsmuster jedes Gens vorhersagte.<sup>[17]</sup> Mit diesem Programm entwickelte ich am Computer eine differenzielle Darstellung zum Vergleich von EST-Bibliotheken aus Maus-ES-Zellen mit solchen aus unterschiedlichen somatischen Geweben. Ich konnte sofort eine Reihe von Genen identifizieren, die in undifferenzierten Maus-ES-Zellen und frühen Embryonen hoch und spezifisch exprimiert wurden. Wir konzentrierten uns besonders auf die Gene mit der höchsten Anreicherung. Dazu gehörten gut bekannte Gene wie Oct3/4,<sup>[18,19]</sup> Utf1<sup>[20]</sup> und Rex1,<sup>[21]</sup> die bereits experimentell als ES-Zell-spezifische Marker identifiziert worden waren. Dies bestätigte den Nutzen unseres Ansatzes. Wir bestimmten noch weitere in ES-Zellen angereicherte Gentranskripte (ES cell-associated transcripts; ECATs) und bestätigten die ES-Zell-spezifische Expression dieser ECATs mit Northern Blots.<sup>[22–24]</sup>

Ich charakterisierte die Funktionen der ECATs in ES-Zellen und Mäusen mit den neuen Mitarbeitern in meinem Labor, darunter drei Doktoranden, Eiko Kaiho, Yoshimi Tokuzawa und Kazuthoshi Takahashi. Ich hatte das Glück, dass diese begabten und fleißigen Studenten von Anfang an dabei waren. Dazu kam Tomoko Ichisaka als Techniker der Zentraleinheit für Molekulargenetik an Mäusen. Ich glaube, dass Tomoko einer besten Techniker in Japan, vielleicht sogar auf der ganzen Welt ist, wenn es um die Manipulation von Mäuseembryonen geht. Dank Tomoko und der Zentraleinheit konnten wir viele Knock-out-Mäuse züchten, um ECATs zu untersuchen.

Das erste Gen, das wir am NAIST in der Maus ausschalteten, war ECAT3, auch Fbox15 genannt. Diese Mäuse waren Teil von Yoshimi Tokuzawa's Projekt. Yoshimi, Tomoko und ich waren begeistert, als wir die erste gezielt veränderte ES-Zelllinie, die ersten chimären Mäuse und die Übertragung der Mutation über die Keimbahn erhielten. Als wir jedoch homozygote Mausmutanten ohne ein funktionelles ECAT3-Gen erzeugten, konnten wir keinen offensichtlichen Phänotyp finden.<sup>[22]</sup> Wegen der spezifischen Expression in Maus-ES-Zellen und Embryonen erwarteten wir ein frühes Absterben der Embryonen. Außerdem zeigten wir, dass Fbox15 ein direktes Ziel von Oct3/4 und Sox2 ist, einem anderen Transkriptionsfaktor, der für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz essentiell ist.<sup>[25]</sup> Entgegen unseren Vermutungen erhielten wir homozygote Mausmutanten aus heterozygoten Kreuzungen nach den Mendelschen Gesetzen. Yoshimi erzeugte daraufhin homozygote mutierte ES-Zelllinien in der Hoffnung auf drastische Phänotypen. Aber wieder beobachteten wir keine nennenswerten Veränderungen. ECAT3-

Nullmutanten von ES-Zellen proliferierten normal und zeigten normales Differenzierungspotenzial. Die ECAT3-Knock-out-Mäuse und die ES-Zellen waren anscheinend normal. Dies fanden wir auch oft bei anderen ECATs. Diese Erfahrung erinnerte uns daran, dass Wissenschaft manchmal zäh ist.

Eine Ausnahme war ECAT4, ein Transkriptionsfaktor, der später Nanog genannt wurde. Wir fanden mit anderen heraus, dass Nanog eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Pluripotenz in Maus-ES-Zellen spielt.<sup>[24,26]</sup> Nanog war auch essentiell für die Embryonalentwicklung in Mäusen vor der Einnistung. Neben Nanog identifizierte Yoshimi Tokuzawa einen anderen Transkriptionsfaktor, Klf4, der eine wichtige Rolle in Maus-ES-Zellen spielt. Eine andere Arbeitsgruppe berichtete von der Bedeutung des gut bekannten Onkogens c-Myc für die Pluripotenz. Bis 2004 hatten wir insgesamt 24 Faktoren als mögliche Reprogrammierungsfaktoren identifiziert, darunter Oct3/4, Sox2, c-Myc, Nanog, weitere ECATs und Klf4.

Wir benötigten ein empfindliches und schnelles Testsystem, um diese Kandidaten zu durchmustern. Die Fbox15-Knock-out-Mäuse erwiesen sich als ein solches Testsystem. Als wir die Knock-out-Mäuse von Fbox15 und anderen ECATs erzeugten, verwendeten wir eine Genfallen-Strategie, in der wir das Neomycin-Resistenzgen in das gewünschte Gen einfügten. Daher wird in den ECAT3-Knock-out-Zellen die Neomycin-Resistenz vom Enhancer und Promotor von ECAT3 aus abgelesen, der nur in ES-Zellen und frühen Embryonen aktiv ist, nicht aber in somatischen Zellen. Somatiche Zellen wie embryonale Mäusefibroblasten (MEFs), die sich von ECAT3-Knock-out-Mäusen ableiten, sind sensiv gegen G418, während ECAT3-Knock-out-ES-Zellen gegen hohe Konzentrationen von G418 resistent waren. Davon ausgehend erwarteten wir, dass, falls einer der 24 Kandidaten tatsächlich Pluripotenz in ECAT3-Knock-out-MEFs erzeugen könnte, die reprogrammierten Zellen tatsächlich resistent gegen G418 werden würden. Wir bestätigten diese Strategie durch die Verwendung eines Fusions-Reprogrammierungssystems. Die ECAT3-Knock-out-Mäuse, die wenige Phänotypen zeigten und Yoshimi und mich daher enttäuscht hatten, lieferten nun ein sehr nützliches System, um die möglichen Reprogrammierungsfaktoren zu überprüfen.

Im Jahr 2005 wechselte ich mit den 24 Kandidatengenen, dem ECAT3-basierten Testsystem und den Mitarbeitern Tomoko Ichisaka und Kazutoshi Takahashi zur Kyoto University. In Kyoto übergab ich Kazutoshi Takahashi die 24 Faktoren, um sie mit dem Assaysystem zu testen.<sup>[2]</sup> Im Grunde erwarteten wir nicht, mit diesen 24 Faktoren eine Antwort zu erhalten. Wir gingen davon aus, dass viel mehr Faktoren getestet werden müssten und hatten bereits mit der Herstellung von cDNA-Bibliotheken aus Maus-ES-Zellen und Keimdrüsen begonnen. Dennoch führte Kazutoshi jedes der 24 Kandidatengene einzeln durch retrovirale Transduktion in die ECAT3-Knock-out-MEFs ein. Beinahe wie erwartet, erhielten wir keine antibiotikaresistenten Kolonien mit den einzelnen Faktoren, ein Hinweis darauf, dass kein einzelnes Kandidatengen ausreichte, um die Reprogrammierung durchzusetzen und Pluripotenz zu induzieren. Zusätzlich

zur Transduktion der einzelnen Faktoren führte Kazutoshi dann eine Transduktion aller 24 Faktoren gemeinsam in die ECAT3-Knock-out-MEFs durch, auch um damit die Durchführung des cDNA-Bibliotheksscreenings zu üben. Er hatte quasi eine Minibibliothek aus 24 cDNAs zur Verfügung. Zu unserer Überraschung erhielten wir vier Wochen nach der Transduktion mehrere G418-resistente Kolonien. Ich hielt dieses Ergebnis für falsch, vermutete etwa eine Kontamination mit ES-Zellen. So bat ich Kazutoshi, das Experiment immer wieder zu wiederholen. Es funktionierte immer. Kazutoshi pickte die G418-resistenten Kolonien und vermehrte sie. Die Zellen ließen sich unbegrenzt expandieren und hatten eine Morphologie ähnlich der von Maus-ES-Zellen. Mit RT-PCR ließ sich zeigen, dass die iPS-MEF24-Klone ES-Zellmarker exprimierten, darunter Oct3/4, Nanog, E-Ras, Cripto, Dax1, Zfp296<sup>[24]</sup> und Fgf4.<sup>[27]</sup>

Um danach zu bestimmen, welche der 24 Kandidatengene notwendig waren, untersuchte Kazutoshi die Effekte, wenn er einzelne Faktoren aus dem Pool der transduzierten Kandidatengene entfernte. ES-Zell-ähnliche Kolonien entstanden nicht, wenn Oct3/4 oder Klf4 fehlte. Beim Weglassen von Sox2 entwickelten sich nur wenige ES-Zell-ähnliche Kolonien. Fehlte c-Myc, entstanden zwar Kolonien, doch hatten diese eine flachere und andere Morphologie als ES-Zellen. Die übrigen Faktoren beeinflussten Zahl oder Charakteristik der Kolonien nicht spürbar. Schließlich zeigten wir noch, dass die Kombination aus den vier Genen Oct3/4, Klf4, Sox2 und c-Myc ausreichte, um ES-Zell-ähnliche Kolonien zu produzieren. Aus den Daten wurde klar, dass Pluripotenz aus MEF-Kulturen durch Einführen der vier Transkriptionsfaktoren Oct3/4, Sox2, c-Myc und Klf4 induziert werden konnte. Ich nannte die neuen pluripotenten Stammzellen „iPS-Zellen“ als Abkürzung für „induzierte pluripotente Stammzellen“.

Wir untersuchten die Pluripotenz der iPS-Zellen mit dem Teratombildungstest in Tieren. Wir erhielten Tumoren aus iPS-Zellen nach subkutaner Injektion in Nacktmäuse. Eine histologische Untersuchung ergab, dass die iPS-Zellen in die drei Keimblätter differenzierten, nämlich neurale Gewebe, Bindegewebe und Säulenepithel. Wir untersuchten die iPS-Zellen auch auf ihre Fähigkeit, adulte Chimären zu bilden. Wir injizierten iPS-Zellen in Mausblastocysten, die wir dann in den Uterus scheinträchtiger Mäuse implantierten. Ergebnis waren adulte Chimären aus diesen injizierten iPS-Zellen, was sich in der Fellfärbung der Jungen niederschlug. Von diesen Chimären konnten wir F1-Mäuse durch Keimbahnübertragung erhalten. Aufgrund dieser Ergebnisse schlossen wir, dass iPS-Zellen in Bezug auf ihre Pluripotenz mit ES-Zellen vergleichbar sind.<sup>[28]</sup>

Im Jahr darauf veröffentlichten wir die Erzeugung von iPS-Zellen aus humanen Fibroblasten mit denselben Faktoren.<sup>[3]</sup> Im Falle der ES-Zellen benötigte der Übergang von murinen zu humanen Zellen 17 Jahre. Dies lag zum Teil daran, dass Maus-ES-Zellen und humane ES-Zellen, obwohl sie viele Eigenschaften gemeinsam haben, in mancher Hinsicht sehr verschieden sind, einschließlich ihrer Kulturbedingungen und Morphologie. Im Falle der iPS-Zellen verging viel weniger Zeit, denn wir wussten bereits, wie humano pluriptote Stammzellen zu kultivieren waren und wie sie aussehen sollten. Anders ausgedrückt hätten wir ohne die vor-

herigen Publikationen über humane ES-Zellen nie humane iPS-Zellen erzeugen können.

Die Erzeugung der iPS-Zellen war eine außergewöhnliche Erfahrung in meiner wissenschaftlichen Laufbahn, denn dabei lief alles glatt. In allen anderen Fällen war mein Weg voller Misserfolge. Das Glück beruhte auf der entschlossenen Arbeit junger Forscher, vor allem Kazuhashi Takahashi, Yoshimi Tokuzawa und Tomoko Ichisaka. Diese drei waren es, die die iPS-Zellen erzeugten. Ohne diese drei jungen Leute in meinem Labor hätten wir in meiner Arbeitsgruppe die iPS-Zellen nie erhalten. Daher bin ich diesen dreien und den anderen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe äußerst dankbar für ihre unermüdlichen Anstrengungen.

Als ich mich vor 25 Jahren der Grundlagenforschung zuwandte, habe ich nie daran gedacht, in Zukunft mit Stammzellen zu arbeiten. Es waren die unerwarteten Ergebnisse von PAF, APOBEC1-transgenen Mäusen und den NAT1-Knockout-Mäusen, die mich auf dieses neue Feld lenkten. Die Ermutigung durch meine Mentoren, darunter Drs. Yamamoto, Miura, Innerarity und Mahley war für die Fortsetzung meiner Tätigkeit als Wissenschaftler essentiell.

### Mögliche Anwendungen von iPS-Zellen

Einer der Vorteile der iPS-Zelltechnologie ist ihre Einfachheit und Reproduzierbarkeit. Wir können humane iPS-Zellen inzwischen nicht nur aus Haut-Fibroblasten gewinnen, sondern auch aus anderen somatischen Zellen, einschließlich peripheren Blutzellen. Hunderte von Labors auf der ganzen Welt arbeiten inzwischen an iPS-Zellen und versuchen, die Technik in der Medizin und für die pharmazeutische Industrie zu nutzen (Abbildung 4). Ohne die iPS-Zelltechnologie wäre es schwierig, somatische Zellen wie Herz- oder Gehirnzellen in ausreichender Zahl von Patienten zu erhalten, die an Herz- oder Hirnerkrankungen leiden. Mit der iPS-Zelltechnologie braucht man nur eine winzige Zahl von Blutzellen von den Patienten. Wir können daraus iPS-Zellen erzeugen, sie im gewünschten Umfang expandieren und dann daraus Herz- oder Gehirnzellen züchten, um die beeinträchtigten Gewebe zu untersuchen. Diese Zellen haben die gleiche genetische Ausstattung wie die Patienten und eröffnen beispiellose

Möglichkeiten, um die Toxizität von Wirkstoffen vorherzusagen, Krankheitsmodelle in der Petrischale zu entwickeln, Wirkstoffsuchen durchzuführen und Zellen für Transplantationstherapien zu gewinnen.

Viele wirksame Substanzen wurden wegen Nebenwirkungen wie Herzrhythmusstörungen und Lebertoxizität vom Markt genommen. Die am besten bekannte Nebenwirkung am Herzen ist das QT-Syndrom, das durch verlängerte Intervalle zwischen den Q- und T-Wellen im Elektrokardiogramm charakterisiert ist; es verursacht oft tödliche Arrhythmien. Weil menschliche Herzzellen schwer zu bekommen sind, haben pharmazeutische Unternehmen nicht vom Herzen stammende Tumorzelllinien mit nur einem Herzgen transfiziert, um die Entwicklung eines QT-Syndroms und anderer Arten von Herztoxizität vorherzusagen. Die Zuverlässigkeit dieses künstlichen Systems wird allerdings sowohl durch falsch-positive als auch durch falsch-negative Ergebnisse beeinträchtigt. Inzwischen kann man humane Herzmuskelzellen aus iPS-Zellen bei verschiedenen Unternehmen kaufen. Pharmaunternehmen steigen auf diese Zellen um, um die Herztoxizität vorherzusagen. Mit ähnlichen Ansätzen kann man versuchen, die Nebenwirkungen in Leber und Gehirn zu prognostizieren. Diese neuen medizinischen Anwendungsfelder der iPS-Zelltechnologie stehen nach allgemeiner Einschätzung fast unmittelbar bevor.

Ich glaube, das größte Potenzial dieser Technologie liegt in der Modellierung von Krankheiten und dem Screening nach Wirkstoffen. Hunderte von Erkrankungen können so untersucht werden. Es hat Fortschritte bei der Modellierung unbehandelbarer Krankheiten gegeben, während gleichzeitig weltweit viele Gruppen nach neuen Wirkstoffen mit patientenspezifischen iPS-Zellen suchen. Zu meiner Überraschung können mit iPS-Zellen nicht nur die Phänotypen von monogenen Krankheiten, sondern auch diejenigen von einigen spät ausbrechenden polygenen Krankheiten wie ALS (amyotrophe Lateralsklerose) und Alzheimer-Demenz nachgebildet werden.<sup>[29,30]</sup>

ALS ist eine spät ausbrechende Erkrankung der Motoneuronen. Die meisten Fälle treten sporadisch auf und werden nicht von einer Mutation in einem einzelnen Gen verursacht. Bereits vor über 100 Jahren wurde die Krankheit erstmals beschrieben. Doch trotz zahlreicher wissenschaftlicher Anläufe gibt es bis heute keine effektive Behandlung. Für viele Krankheiten waren Tiermodelle hilfreich, um die Mechanismen aufzuklären und geeignete Wirkstoffe zu finden. Im Falle von ALS gibt es Tiermodelle, und viele Substanzen wurden entwickelt, die in diesen Tiermodellen wirksam sind. Dieselben Substanzen sind bei menschlichen ALS-Patienten aber wirkungslos. Die Suche nach Medikamenten für ALS muss also an humanen Zellen durchgeführt werden. Es ist jedoch schwierig, ausreichende Mengen an Motoneuronen und anderen betroffenen Zellen von Patienten zu gewinnen.

Da inzwischen die notwendigen Zellen aus iPS-Zellen gezüchtet werden können, haben viele Wissenschaftler iPS-Zellen von ALS-Patienten erzeugt und züchten große Mengen an Motoneuronen, die dieselben genetischen Informationen tragen wie die Patienten. Zu ihnen gehört Dr. Haruhisa Inoue von unserem Institut (CiRA, the Center for

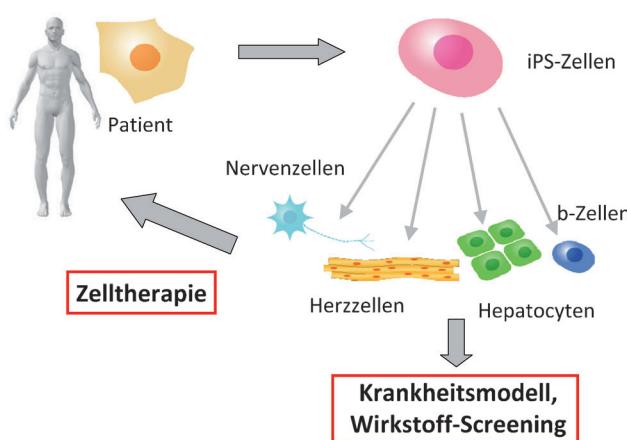
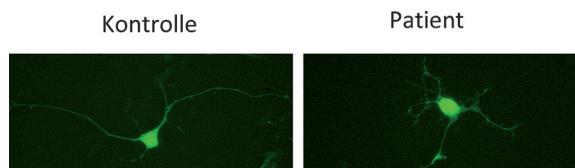


Abbildung 4. Mögliche Anwendungen für iPS-Zellen.

iPS Cell Research and Application).<sup>[29]</sup> Dr. Inoue konnte nachweisen, dass Motoneuronen von Patienten signifikant kürzere Ausläufer für die Signalübertragung vom Gehirn zu den Muskeln haben als solche von gesunden Kontrollpersonen (Abbildung 5). Er fand auch heraus, dass ein Histonace-



**Abbildung 5.** Motoneuron aus iPS-Zellen aus einem ALS-Patienten als Krankheitsmodell. Mikroskopaufnahmen von Motoneuronen, die aus iPS-Zellen differenziert wurden. Donoren waren eine Kontrollperson (links) und ein ALS-Patient (rechts).<sup>[29]</sup> (Copyright 2012, American Association for the Advancement of Science.)

tyltransferase-Inhibitor, Anacardinsäure, den anormalen ALS-Motoneuron-Phänotyp umkehrt. Daneben arbeiten die Wissenschaftler des CiRA auch an anderen unheilbaren Krankheiten wie FOP und CINCA-Syndrom.<sup>[31]</sup> Die Ergebnisse ihrer Untersuchungen haben erwiesen, dass patientenspezifische iPS-Zellen ein nützliches Werkzeug für die Aufklärung der Krankheitsentstehung und die Suche nach Wirkstoffkandidaten sein können.

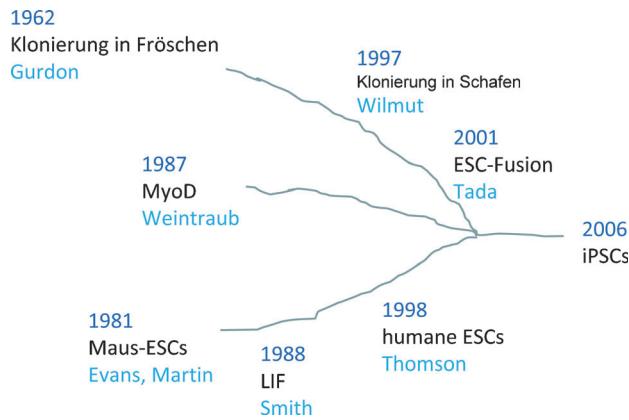
Die Stammzelltherapie ist eine weitere vielversprechende medizinische Anwendung für iPS-Zellen. In Japan und anderen Ländern führen Forscher präklinische Studien durch, um die Wirksamkeit und Sicherheit von iPS-Zellen für die Behandlung verschiedener Krankheiten und Verletzungen wie Parkinson-Krankheit, Makuladegeneration, Herzversagen, Rückenmarkverletzungen und Thrombozytopenie nachzuweisen.<sup>[32]</sup> Die iPS-Zelltechnologie hat sich in den vergangenen fünf Jahren schnell weiterentwickelt. Wir und andere haben eine Methode zur Herstellung humarer iPS-Zellen mit episomalen Vektoren publiziert, deren Integration ins Genom vermieden wird.<sup>[33]</sup> Außerdem haben wir gezeigt, dass eine starke Expression von p53 shRNA,<sup>[34]</sup> L-Myc<sup>[35]</sup> und Glis1<sup>[36]</sup> das Onkogen c-Myc ersetzen kann, wenn effizient humane iPS-Zellen erzeugt werden sollen. Wir haben auch ein System zur Evaluierung von iPS-Zellen entwickelt. Wir glauben, dass die Technologie einer klinischen Erprobung näherkommt. Dr. Masayo Takahashi am Riken Center for Developmental Biology (CDB) hat bereits einen Antrag beim japanischen Ministerium für Gesundheit und Arbeit gestellt, um eine iPS-Zell-basierte klinische Studie zur Therapie von Makuladegeneration durchzuführen.

Einige dieser klinischen Studien werden zunächst mit autologen iPS-Zellen aus patienteneigenen somatischen Zellen beginnen. Für größere Studien und standardisierte Therapien ist die Gewinnung autologer iPS-Zellen von jedem Patienten wahrscheinlich nicht mehr praktikabel, denn sie ist zeit-, arbeits- und kostenintensiv. Die Herstellung, Expansion und Differenzierung von iPS-Zellen unter GMP-Bedingungen ist teuer; außerdem dauert die Prozedur mehrere Monate. Im Fall von Rückenmarkverletzungen weiß man, dass die besten Ergebnisse erwartet werden können, wenn die Zellen innerhalb eines Monats nach Eintritt der Verletzung

transplantiert werden. Wenn also mit der Herstellung, Expansion und Differenzierung der iPS-Zellen begonnen wird, nachdem der Patient verletzt wurde, werden die Zellen niemals rechtzeitig fertig. Um dieses praktische Problem zu lösen, versuchen wir nun, iPS-Zellvorräte für die Zwecke der regenerativen Medizin zu etablieren. Um die immunologische Abstoßung zu minimieren, sollen die iPS-Zellen von Donoren mit homozygoten HLA-Allelen stammen. Für Japan schätzen wir, dass iPS-Zelllinien aus 140 HLA-Homozygoten ausreichen, um bis zu 90 % der japanischen Bevölkerung abzudecken.

### Trends für die Zukunft

Ich bekomme diesen Preis stellvertretend für viele Forscher und Wissenschaftler, die zur Entwicklung und zum rasanten Fortschritt der iPS-Zelltechnologie beigetragen haben. Wie bereits beschrieben, hat sich die Entwicklung der iPS-Zellen aus drei bereits existierenden wissenschaftlichen Quellen gespeist (Abbildung 6).



**Abbildung 6.** Drei wissenschaftliche Quellen, die zur Entwicklung der iPS-Zellen führten. Gezeigt sind die herausragenden Ereignisse mit den Namen der Korrespondenzautoren und dem Publikationsjahr.

Die erste Quelle war die Reprogrammierung der Zellkerne, initiiert von Dr. John Gurdon vor mehr als 50 Jahren. Ein Kern einer voll ausdifferenzierten Darmzelle einer Kaulquappe wurde in ein unbefruchtetes Ei transplantiert, dessen Kern durch UV-Licht zerstört worden war. Das Ei mit dem transplantierten Kern entwickelte sich zu einem ausgewachsenen Frosch; damit war die Klonierung gelungen.<sup>[1]</sup> Ein paar Jahrzehnte später gelang Dr. Ian Wilmut 1997 erstmals die somatische Klonierung eines Säugertiers, eines Schafs.<sup>[12]</sup> Obwohl der Kerentransfer in Säugern wegen der kleineren Zellen und der physiologischen Anpassung an den Zellzyklus des Eies technisch aufwändiger ist, demonstrierte das Team die Machbarkeit mit der Geburt eines Lamms durch Kerentransfer aus einer adulten Brustdrüse oder aus differenzierten fötalen Zellen in ein entkerntes Schafsei. Ihre Erfolge bei der somatischen Klonierung machten klar, dass sogar differenzierte Zellen alle genetischen Informationen für die Entwicklung des gesamten Organismus enthalten und dass die

Oocyten Faktoren enthalten, die die somatischen Zellkerne reprogrammieren können. Im Jahr 2001 wies Dr. Takashi Tada nach, dass Maus-ES-Zellen ebenfalls Reprogrammierungsfaktoren enthalten, indem er zeigte, dass die Fusion von somatischen Zellen und ES-Zellen die Reprogrammierung in somatischen Kernen induzieren kann.<sup>[13]</sup> Diese Entdeckung war der Auslöser für mich, unser Projekt zu initiieren, das zur Entwicklung der iPS-Zellen führte.

Die zweite bedeutende Quelle war die faktorvermittelte Umsteuerung des Zellentwicklungszyklus, zuerst gezeigt von Dr. Weintraub.<sup>[15]</sup> Die Arbeitsgruppe wandelte Mausfibroblasten durch die erzwungene Expression eines der myoblastenspezifischen Transkriptionsfaktoren, MyoD, in Myoblasten um. So kamen wir zu dem Konzept eines „Haupt-Transkriptionsfaktors“, der die Entwicklungsrichtung der Zelllinie bestimmt.

Die dritte entscheidende Quelle war die ES-Zellforschung, die von Dr. Martin Evans und Dr. Gail Martin 1981 begonnen wurde.<sup>[9,10]</sup> Bis dahin hatte man pluripotente Zellen nur aus Teratokarzinomzellen erhalten. Evans und Martin etablierten pluripotente Zelllinien mit einem normalen Karyotyp, die direkt aus frühen Mausembryos in vitro isoliert worden waren. Dr. Austin Smith und andere identifizierten (und sind noch dabei) viele Faktoren, die für die Pluripotenz essentiell sind, darunter Oct3/4 und Sox2.<sup>[19,37,38]</sup> 1998 gelang Dr. James Thomson die Herstellung humaner ES-Zellen mit optimalen Kulturbedingungen, die sich deutlich von denen für Maus-ES-Zellen unterschieden.<sup>[11]</sup> All diese Befunde waren unverzichtbar, um Ideen über die Existenz von Reprogrammierungsfaktoren, die Faktorkombinationen und die Kulturbedingungen für pluripotente Zellen zu erhalten, die letztlich zur Herstellung von iPS-Zellen führten.

Die Studien über iPS-Zellen haben bereits neue wissenschaftliche Trends angestoßen (Abbildung 7). 2007 lieferte Dr. Rudolf Jaenisch den ersten Beweis für das Konzept einer iPS-Zell-basierten Zelltherapie in Mausmodellen.<sup>[39]</sup> Er zeigte, dass Mausmodelle der Sichelzellanämie durch Transplantation mit hämatopoietischen Vorläuferzellen, die in vitro aus gentherapierten autologen iPS-Zellen erhalten worden waren, behandelt werden können.

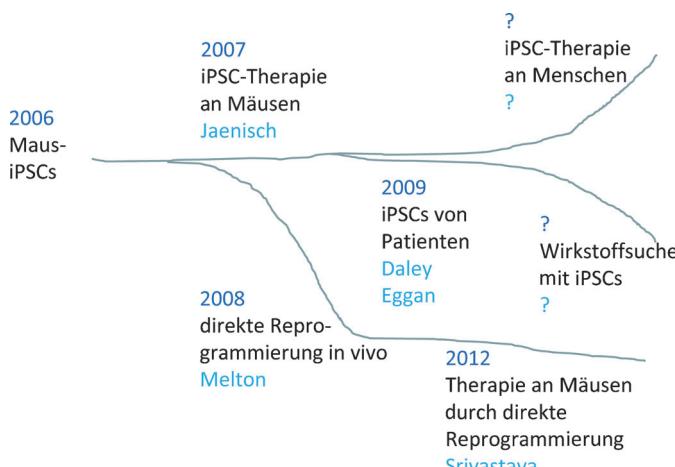


Abbildung 7. Neue wissenschaftliche Entwicklungsrichtungen, die von iPS-Zellen ausgehen.

2008 erzeugten Dr. George Daley<sup>[40]</sup> und Dr. Kevin Eggan<sup>[41]</sup> die ersten iPS-Zellen von Patienten. Dr. Daley etablierte sie von Patienten mit verschiedenen unbehandelbaren Krankheiten wie ADA-Mangel-SCID (schwerer kombinierter Immundefekt durch Adenosin-Desaminase-Mangel), Shwachman-Bodian-Diamond-Syndrom (SBDS), Morbus Gaucher Typ 3, Duchenne (DMD)- und Becker-Kiener-Muskeldystrophie (BMD), Parkinson-Krankheit, Corea Huntington, juveniler Diabetes mellitus (Typ 1), Down-Syndrom, Lesch-Nyhan-Syndrom, X-chromosomal Adrenoleukodystrophie, Dyskeratosis congenita, Hurler-Syndrom, Fragile-X-Syndrom und NEMO-Defizienz.<sup>[40,42-45]</sup> Dr. Eggan stellte patientenspezifische iPS-Zellen direkt von einem 82 Jahre alten Patienten mit erblicher ALS her und differenzierte sie erfolgreich zu Motoneuronen.<sup>[41]</sup>

Eine weitere wichtige wissenschaftliche Strömung, die sich aus der iPS-Zelltechnologie entwickelte, ist die „direkte Reprogrammierung“, die erstmals 2008 in der Arbeitsgruppe von Dr. Douglas Melton gelang.<sup>[46]</sup> Die Wissenschaftler berichteten, dass die Entwicklungsrichtung einer Zelle direkt in vivo in lebenden Mäusen transdifferenziert werden kann, indem man nur eine kleine Anzahl von Transkriptionsfaktoren einführt. Sie identifizierten eine Kombination von Transkriptionsfaktoren, mit der man differenzierte exokrine Pankreaszellen in endokrine, Insulin sezernierende Zellen überführen kann. Viele Untersuchungen folgten, und im Jahr 2012 legte Dr. Deepak Srivastava den ersten Beweis für das Konzept einer Therapie vor, die auf einer direkten Reprogrammierung in Mäusen beruht.<sup>[47]</sup> Es gelang ihm, auf direktem Wege *in situ* nach einer Ligation von Herzkranzgefäßen Herzfibroblasten in Herzmyozyten umzuwandeln. Ergebnis war eine verringerte Infarktgröße und die teilweise Wiederherstellung der Herzfunktion.

Die Geschichte der iPS-Zellforschung hat gerade erst begonnen, und die Technologie hat ein bemerkenswertes Potenzial für den Einsatz in der Zelltherapie, bei der Wirkstoffsuche und bei der personalisierten Medizin. Unerwartete Ergebnisse haben ein völlig neues Forschungsfeld eröffnet. Ich hoffe, dass iPS-Zellen von vielen Wissenschaftlern in unterschiedlichsten Forschungsfeldern der Medizin oder Biologie eingesetzt werden, und dass einiger dieser Forscher ebenfalls einen Nobelpreis für ihre exzellente Arbeit erhalten.

*Allen Mitgliedern am Center for iPS Cell Research and Application der Kyoto University und am Gladstone Institute in San Francisco will ich für ihre stetige Unterstützung meiner Forschung und aller Bereiche meines Lebens meinen ausdrücklichen Dank aussprechen. Ich danke allen ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern meiner Arbeitsgruppe für ihren entschlossenen und unermüdlichen Einsatz. Mein tiefster Dank gilt aber meiner Familie für ihre unerschütterliche Unterstützung. Ohne sie wäre ich heute nicht hier. Mein Vater, der mir zur Medizin riet, und mein Schwiegervater, der mir zeigte, was ein guter Arzt ist, sind nicht mehr unter uns – aber ich glaube, dass sie alle unser Glück und unsere Freude im Himmel mit uns teilen. Ich wünsche mir sehr, dass aus der iPS-Zelltechnologie klinische Realität wird, bevor ich meinen beiden Vätern gegenübertrete.*

Eingegangen am 1. August 2013  
 Online veröffentlicht am 19. November 2013  
 Übersetzt von Dr. Burkard Neuß, Jülich

- [1] „The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles“: J. B. Gurdon, *J. Embryol. Exp. Morphol.* **1962**, *10*, 622–640.
- [2] „Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors“: K. Takahashi, S. Yamanaka, *Cell* **2006**, *126*, 663–676.
- [3] „Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors“: K. Takahashi, K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda, S. Yamanaka, *Cell* **2007**, *131*, 861–872.
- [4] „Putative mechanism of hypotensive action of platelet-activating factor in dogs“: S. Yamanaka, K. Miura, T. Yukimura, M. Okumura, K. Yamamoto, *Circ. Res.* **1992**, *70*, 893–901.
- [5] „Effect of the platelet-activating factor antagonist, TCV-309, and the cyclo-oxygenase inhibitor, ibuprofen, on the haemodynamic changes in canine experimental endotoxic shock“: S. Yamanaka, H. Iwao, T. Yukimura, S. Kim, K. Miura, *Br. J. Pharmacol.* **1993**, *110*, 1501–1507.
- [6] „Apolipoprotein B mRNA-editing protein induces hepatocellular carcinoma and dysplasia in transgenic animals“: S. Yamanaka, M. E. Balestra, L. D. Ferrell, J. Fan, K. S. Arnold, S. Taylor, J. M. Taylor, T. L. Innerarity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 8483–8487.
- [7] „A novel translational repressor mRNA is edited extensively in livers containing tumors caused by the transgene expression of the apoB mRNA-editing enzyme“: S. Yamanaka, K. S. Poksay, K. S. Arnold, T. L. Innerarity, *Genes Dev.* **1997**, *11*, 321–333.
- [8] „Essential role of NAT1/p97/DAP5 in embryonic differentiation and the retinoic acid pathway“: S. Yamanaka, X. Y. Zhang, M. Maeda, K. Miura, S. Wang, R. V. Farese, Jr., H. Iwao, T. L. Innerarity, *EMBO J.* **2000**, *19*, 5533–5541.
- [9] „Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos“: M. J. Evans, M. H. Kaufman, *Nature* **1981**, *292*, 154–156.
- [10] „Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells“: G. R. Martin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, *78*, 7634–7638.
- [11] „Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts“: J. A. Thomson, J. Itskovitz-Eldor, S. S. Shapiro, M. A. Waknitz, J. J. Swiergiel, V. S. Marshall, J. M. Jones, *Science* **1998**, *282*, 1145–1147.
- [12] „Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells“: I. Wilmut, A. E. Schnieke, J. McWhir, A. J. Kind, K. H. Campbell, *Nature* **1997**, *385*, 810–813.
- [13] „Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells“: M. Tada, Y. Takahama, K. Abe, N. Nakatsuji, T. Tada, *Curr. Biol.* **2001**, *11*, 1553–1558.
- [14] „Redesigning the body plan of *Drosophila* by ectopic expression of the homoeotic gene *Antennapedia*“: S. Schneuwly, R. Kleemann, W. J. Gehring, *Nature* **1987**, *325*, 816–818.
- [15] „Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts“: R. L. Davis, H. Weintraub, A. B. Lassar, *Cell* **1987**, *51*, 987–1000.
- [16] „RIKEN Genome Exploration Research Group Phase II Team, and the FANTOM Consortium. Functional annotation of a full-length mouse cDNA collection“: J. Kawai, A. Shinagawa, K. Shibata, M. Yoshino, M. Itoh, Y. Ishii, T. Arakawa, A. Hara, Y. Fukunishi, H. Konno, J. Adachi, S. Fukuda, K. Aizawa, M. Izawa, K. Nishi, H. Kiyosawa, S. Kondo, I. Yamanaka, T. Saito, Y. Okazaki, T. Gojobori, H. Bono, T. Kasukawa, R. Saito, K. Kadota, H. Matsuda, M. Ashburner, S. Batalov, T. Casavant, W. Fleischmann, T. Gaasterland, C. Gissi, B. King, H. Kochiwa, P. Kuehl, S. Lewis, Y. Matsuo, I. Nikaido, G. Pesole, J. Quackenbush, L. M. Schriml, F. Staubli, R. Suzuki, M. Tomita, L. Wagner, T. Washio, K. Sakai, T. Okido, M. Furuno, H. Aono, R. Baldarelli, G. Barsh, J. Blake, D. Boffelli, N. Bojunga, P. Carninci, M. F. de Bonaldo, M. J. Brownstein, C. Bult, C. Fletcher, M. Fujita, M. Garibaldi, S. Gustincich, D. Hill, M. Hofmann, D. A. Hume, M. Kamiya, N. H. Lee, P. Lyons, L. Marchionni, J. Mashima, J. Mazzarelli, P. Mombaerts, P. Nordone, B. Ring, M. Ringwald, I. Rodriguez, N. Sakamoto, H. Sasaki, K. Sato, C. Schönbach, T. Seya, Y. Shibata, K. F. Storch, H. Suzuki, K. Toyo-oka, K. H. Wang, C. Weitz, C. Whittaker, L. Wilming, A. Wynshaw-Boris, K. Yoshida, Y. Hasegawa, H. Kawaji, S. Kohtsuki, Y. Hayashizaki, *Nature* **2001**, *409*, 685–690.
- [17] „Digital Differential Display“: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/ddd.cgi>.
- [18] „Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4“: J. Nichols, B. Zevnik, K. Anastassiadis, H. Niwa, D. Klewe-Nebenius, I. Chambers, H. Schöler, A. Smith, *Cell* **1998**, *95*, 379–391.
- [19] „Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells“: H. Niwa, J. Miyazaki, A. G. Smith, *Nat. Genet.* **2000**, *24*, 372–376.
- [20] „UTF1, a novel transcriptional coactivator expressed in pluripotent embryonic stem cells and extra-embryonic cells“: A. Okuda, A. Fukushima, M. Nishimoto, A. Orimo, T. Yamagishi, Y. Nabeshima, M. Kuro-o, Y. Nabeshima, K. Boon, M. Keaveney, H. G. Stunnenberg, M. Muramatsu, *EMBO J.* **1998**, *17*, 2019–2032.
- [21] „Specific expression of a retinoic acid-regulated, zinc-finger gene, Rex-1, in preimplantation embryos, trophoblast and spermatocytes“: M. B. Rogers, B. A. Hosler, L. J. Gudas, *Development* **1991**, *113*, 815–824.
- [22] „Fbx15 is a novel target of Oct3/4 but is dispensable for embryonic stem cell self-renewal and mouse development“: Y. Tokuzawa, E. Kaiho, M. Maruyama, K. Takahashi, K. Mitsui, M. Maeda, H. Niwa, S. Yamanaka, *Mol. Cell. Biol.* **2003**, *23*, 2699–2708.
- [23] „Role of ERas in promoting tumour-like properties in mouse embryonic stem cells“: K. Takahashi, K. Mitsui, S. Yamanaka, *Nature* **2003**, *423*, 541–545.
- [24] „The Homeoprotein Nanog Is Required for Maintenance of Pluripotency in Mouse Epiblast and ES Cells“: K. Mitsui, Y. Tokuzawa, H. Itoh, K. Segawa, M. Murakami, K. Takahashi, M. Maruyama, M. Maeda, S. Yamanaka, *Cell* **2003**, *113*, 631–642.
- [25] „Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells“: S. Masui, Y. Nakatake, Y. Toyooka, D. Shimosato, R. Yagi, K. Takahashi, H. Okochi, A. Okuda, R. Matoba, A. A. Sharov, M. S. Ko, H. Niwa, *Nat. Cell Biol.* **2007**, *9*, 625–635.
- [26] „Functional expression cloning of nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells“: I. Chambers, D. Colby, M. Robertson, J. Nichols, S. Lee, S. Tweedie, A. Smith, *Cell* **2003**, *113*, 643–655.
- [27] „Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3“: H. Yuan, N. Corbi, C. Basilico, L. Dailey, *Genes Dev.* **1995**, *9*, 2635–2645.
- [28] „Generation of germ-line competent induced pluripotent stem cells“: K. Okita, T. Ichisaka, S. Yamanaka, *Nature* **2007**, *448*, 313–317.
- [29] „Drug screening for ALS using patient-specific induced pluripotent stem cells“: N. Egawa, S. Kitaoka, K. Tsukita, M. Naitoh, K. Takahashi, T. Yamamoto, F. Adachi, T. Kondo, K. Okita, I. Asaka, T. Aoi, A. Watanabe, Y. Yamada, A. Morizane, J. Takahashi, T. Ayaki, H. Ito, K. Yoshikawa, S. Yamawaki, S. Suzuki, D. Watanabe, H. Hioki, T. Kaneko, K. Makioka, K. Okamoto, K. Okamoto, H. Takuma, A. Tamaoka, K. Hasegawa, T. Konaka, M. Hasegawa, A. Kawata, M. Yoshida, T. Nakahata, R. Tak-

- ahashi, M. C. N. Marchetto, F. H. Gage, S. Yamanaka, H. Inoue, *Sci. Transl. Med.* **2012**, *4*, 145ra104.
- [30] „Anti-Abeta Drug Screening Platform Using Human iPS Cell-Derived Neurons for the Treatment of Alzheimer’s Disease“: N. Yahata, M. Asai, S. Kitaoka, K. Takahashi, I. Asaka, H. Hioki, T. Kaneko, K. Maruyama, T. C. Saido, T. Nakahata, T. Asada, S. Yamanaka, N. Iwata, H. Inoue, *PLoS One* **2011**, *6*, e25788.
- [31] „Induced pluripotent stem cells from CINCA syndrome patients as a model for dissecting somatic mosaicism and drug discovery“: T. Tanaka, K. Takahashi, M. Yamane, S. Tomida, S. Nakamura, K. Oshima, A. Niwa, R. Nishikomori, N. Kambe, H. Hara, M. Mitsuyama, N. Morone, J. E. Heuser, T. Yamamoto, A. Watanabe, A. Sato-Otsubo, S. Ogawa, I. Asaka, T. Heike, S. Yamanaka, T. Nakahata, M. K. Saito, *Blood* **2012**, *120*, 1299–1308.
- [32] „Transient activation of c-MYC expression is critical for efficient platelet generation from human induced pluripotent stem cells“: N. Takayama, S. Nishimura, S. Nakamura, T. Shimizu, R. Ohnishi, H. Endo, T. Yamaguchi, M. Otsu, K. Nishimura, M. Nakanishi, A. Sawaguchi, R. Nagai, K. Takahashi, S. Yamanaka, H. Nakauchi, K. Eto, *J. Exp. Med.* **2010**, *207*, 2817–2830.
- [33] „A more efficient method to generate integration-free human iPS cells“: K. Okita, Y. Matsumura, Y. Sato, A. Okada, A. Morizane, S. Okamoto, H. Hong, M. Nakagawa, K. Tanabe, K. Tezuka, T. Shibata, T. Kunisada, M. Takahashi, J. Takahashi, H. Saji, S. Yamanaka, *Nat. Methods* **2011**, *8*, 409–412.
- [34] „Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway“: H. Hong, K. Takahashi, T. Ichisaka, T. Aoi, O. Kanagawa, M. Nakagawa, K. Okita, S. Yamanaka, *Nature* **2009**, *460*, 1132–1135.
- [35] „Promotion of direct reprogramming by transformation-deficient Myc“: M. Nakagawa, N. Takizawa, M. Narita, T. Ichisaka, S. Yamanaka, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 14152–14157.
- [36] „Direct reprogramming of somatic cells is promoted by maternal transcription factor Glis1“: M. Maekawa, K. Yamaguchi, T. Nakamura, R. Shibukawa, I. Kodanaka, T. Ichisaka, Y. Kawamura, H. Mochizuki, N. Goshima, S. Yamanaka, *Nature* **2011**, *474*, 225–229.
- [37] „Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides“: A. G. Smith, J. K. Heath, D. D. Donaldson, G. G. Wong, J. Moreau, M. Stahl, D. Rogers, *Nature* **1988**, *336*, 688–690.
- [38] „Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function“: A. A. Avilion, S. K. Nicolis, L. H. Pevny, L. Perez, N. Vivian, R. Lovell-Badge, *Genes Dev.* **2003**, *17*, 126–140.
- [39] „Treatment of Sickle Cell Anemia Mouse Model with iPS Cells Generated from Autologous Skin“: J. Hanna, M. Wernig, S. Markoulaki, C. W. Sun, A. Meissner, J. P. Cassady, C. Beard, T. Brambrink, L. C. Wu, T. M. Townes, R. Jaenisch, *Science* **2007**, *318*, 1920–1923.
- [40] „Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells“: I. H. Park, N. Arora, H. Huo, N. Maherali, T. Ahfeldt, A. Shimamura, M. W. Lensch, C. Cowan, K. Hochedlinger, G. Q. Daley, *Cell* **2008**, *134*, 877–886.
- [41] „Induced Pluripotent Stem Cells Generated from Patients with ALS Can Be Differentiated into Motor Neurons“: J. T. Dimos, K. T. Rodolfa, K. K. Niakan, L. M. Weisenthal, H. Mitsumoto, W. Chung, G. F. Croft, G. Saphier, R. Leibel, R. Goland, H. Wichterle, C. E. Henderson, K. Eggan, *Science* **2008**, *321*, 1218–1221.
- [42] „Induced pluripotent stem cell models from X-linked adrenoleukodystrophy patients“: J. Jang, H. C. Kang, H. S. Kim, J. Y. Kim, Y. J. Huh, D. S. Kim, J. E. Yoo, J. A. Lee, B. Lim, J. Lee, T. M. Yoon, I. H. Park, D. Y. Hwang, G. Q. Daley, D. W. Kim, *Ann. Neurol.* **2011**, *70*, 402–409.
- [43] „Telomere dynamics in dyskeratosis congenita: the long and the short of iPS“: S. Agarwal, G. Q. Daley, *Cell Res.* **2011**, *21*, 1157–1160.
- [44] „Differential modeling of fragile X syndrome by human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells“: A. Urbach, O. Bar-Nur, G. Q. Daley, N. Benvenisty, *Cell Stem Cell* **2010**, *6*, 407–411.
- [45] „Derivation of human embryonic stem cells with NEMO deficiency“: X. Guan, A. Yabuuchi, H. Huo, E. Ginsberg, C. Racoosky, G. Q. Daley, P. H. Lerou, *Stem Cell Res.* **2012**, *8*, 410–415.
- [46] „In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells“: Q. Zhou, J. Brown, A. Kanarek, J. Rajagopal, D. A. Melton, *Nature* **2008**, *455*, 627–632.
- [47] „In vivo reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes“: L. Qian, Y. Huang, C. I. Spencer, A. Foley, V. Vedantham, L. Liu, S. J. Conway, J. D. Fu, D. Srivastava, *Nature* **2012**, *485*, 593–598.