



UPPSALA
UNIVERSITET

Embryonala stamceller

Funktion och terapeutiskamöjligheter

Groom Alemayehu

Independent Project in Biology

Självständigt arbete i biologi, 15 hp, vårterminen 2009

Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

Sammandrag

Patienter med defekta organ botas idag med hjälp av transplantation, men antalet donatorer är begränsat vilket ofta innebär att väntetiden blir lång och mödosam. Rekonstruering av celler, organ eller vävnader kan vara lösningen till problemet. Idéen bygger på återbildning, ersättning eller reparation av defekta organ. Det finns olika metoder för sådana transplantationer.

Terapeutisk kloning är en mycket omtalad metod, som det forskas mycket på. Tanken är att få fram nya friska kroppsceller från den sjuka patienten, vilket ska resultera i mindre risk för avstötning från immunförsvaret. Patienten donerar kroppsceller utifrån vilka cellkärnorna extraheras. Efter det förs en cellkärna in i ett kärnlöst ägg. Ägget med cellkärnan kommer att innehålla samma arvsanlag som patientens kroppscell. Det obefruktade ägget med den diploida kroppscellkärnan stimuleras till celldelning med hjälp av en elektrisk chock, och odlas sedan i en näringslösning. Till slut kan odifferentierade embryonala stamceller isoleras, vilka kan bilda olika kroppsceller. Stamcellerna är icke-differentierade celler från embryon som kan utvecklas till olika typer av specialiserade celler.

Alla flercelliga organismer har stamceller som är olika odifferentierade och kan dela sig obegränsat. Det finns olika slags stamceller och alla har differentieringsförmågor. Stamcellerna kan vara allt ifrån totipotenta till unipotenta. De totipotenta cellerna kan bilda alla slags celler, vävnader eller organ medan de unipotenta bildar en slags celltyp. Någoting alla stamceller har gemensamt är att de genomgår en irreversibel differentiering.

De embryonala cellerna innehåller pluripotenta stamceller som kan differentiera sig till en mängd olika celler förutom placentaceller. Stamcellerna kommer ifrån ägg som blivit befruktade *in vitro* och efter 4-6 dagar befinner de sig i sitt blastulastadium och är långt ifrån övergången till foster.

Terapeutisk kloning möjliggör skapandet av embryonala stamceller vilket kan återbilda celler, vävnader eller organ. Parkinsons är en sjukdom som bryter ner dopaminerga celler i mellanhjärnan hos människan. Med hjälp av embryonala stamceller kan man tänka sig att bota sjukdomen. För att detta ska vara möjligt krävs dock mer forskning på ickehumana primater angående embryonala stamceller och olika etiska aspekter och utgångspunkter bör ses över. Idag ser det väldigt lovande ut och framtiden ser ljus ut för forskning på embryonala stamceller.

Inledning

Vårt samhälle idag har svar på många frågor och problem, men när man som patient blir diagnostiserad med en kronisk sjukdom finns det ibland inga lösningar. Läkare skriver ofta ut olika mediciner vilka endast lindrar symtomen. Embryonala stamceller kan tänkas rädda dagens obotliga och svårt skadade patienter. I princip kan alla som är i behov av cell-, vävnads- eller organtransplantation botas. De embryonala stamcellerna är så finessrika att de kan bilda vilka sorters celler som helst i kroppen. En sjukdom som Parkinsons drabbar oftast äldre människor (över ca. 65 år) där symtom som muskelstelhet, nedsatt rörelseförmåga och skakningar uppkommer. Med hjälp av embryonala stamceller kan man återbilda de celler som förloras hos Parkinsons-drabbade personer. Syftet med denna rapport är att informera om att det kan finns möjligheter att bota dagens obotliga sjukdomar, tack vare forskningen på embryonala stamceller. Rapporten informerar också om hur man går till väga och de metoder som appliceras kring denna forskning. Är det möjligt att inom snar framtid kunna använda embryonala stamceller i sjukvården? Är det etiskt acceptabelt och hur långt har man kommit idag inom forskningen? Vad säger Sveriges lagar om stamcells forskning?

Olika stamcellers funktion

Stamceller hos djur definieras som “icke-differentierad celler från t.ex. embryo som kan utvecklas till olika typer av specialiserade celler” (Björn *et al.* 2005). Människokroppen har allt ifrån totipotenta till unipotenta stamceller. **Totipotenta** stamceller kan bilda hela organismer autonomt. (Fauci *et al.* 2008).

Hos människan befruktar mannens spermie kvinnans ägg och bildar en ensam totipotent cell (zygot). Cellen delar sig till två identiska dotterceller. Efter några dagar övergår de till att bilda **pluripotenta** embryonala stamceller (ESC) och embryonala könsceller (EG). De förra skapar mesoderm (muskel, ben, blod), endoderm (tarmkanalen, lungor och magsäcken) och ektoderm (epidermal vävnad och nervsystemet). Pluripotenta celler differentieras ytterligare till **multipotenta** hematopoetiska stamceller (HS) som besitter en begränsad förmåga till differentiering. De kan t.ex. bilda olika sorters blodceller, men kan inte utvecklas till andra sorters celler. **Oligopotenta** stamceller (NS) är mer begränsade än multipotenta celler och utvecklas till myeloida och lymfoida stamceller. De myeloida cellerna bildar makrofager, granulocyter, trombocyter och erythrocyter medan de lymfoida bildar B-lymfocyter och T-lymfocyter. De myeloida och lymfoida cellerna ger människokroppen ett immunförsvar. **Unipotenta** celler kan endast differentiera sig till en typ av celler. Oftast sker differentieringen till celler i epidermis (hudceller). (Fauci *et al.* 2008)

När cellerna genomgått differentiering är deras fenotyp stabil och kan inte ändras. Vävnadsstamceller har tidigare betraktats som multipotenta celler, men studier visar att de har en större utvecklingspotential. Till exempel kan HS utvecklas till neuroner och könsceller. (Fauci *et al.* 2008)

Självförnyandeceller ersätter endotel

Tidig utveckling hos en organism karakteriseras som en snabb tillväxt av embryonala stamceller. Ju mer cellerna har differentierat sig desto långsammare blir tillväxthastigheten, och oftast befinner de sig i G0-fasen av cellcykeln. G0-fasen är den fas där cellen tillfälligt har lämnat cellcykeln och slutat dela sig. Celler förloras hela tiden pga. skador och programmerad celldöd. Djur måste hela tiden upprätthålla balansen mellan celldöd och celltillväxt.

De flesta typer av celler hos ett vuxet däggdjur kan inte längre föröka sig. En sådan typ är endotelceller som täcker blodkärlens insida. Endotelcellerna ersätts istället av celler som är mindre differentierade, som kallas för självförnyandeceller (self renewing cells) (Kazunori & Takashi 1994). Dessa ersättningsceller befinner sig i G0-fasen, men börjar differentieras för att ersätta skadad vävnad. En sådan celltyp heter fibroblaster, som ersätter bindväv genom att utsöndra kollagen. När celler skadas hos djur transporteras blodplättar från blodet till den utsatta platsen. Blodplättarna initierar lagningen av vävnader genom att utsöndra blodplättstillväxtfaktor (PDGF), som aktiverar tyrosinkinasreceptorn. Receptorn sitter på den skadade vävnadens cellyta. Receptorn medierar sedan proliferering av fibroblaster som migrerar till den skadade platsen och utsöndrar kollagen, vilket bidrar till sårsläkning. Kollagen är ett fiberprotein som bildar en stark fiberstruktur vid den skadade platsen. Denna procedur är ett typiskt exempel på hur endotelvävnad ersätts eller återbildas med hjälp av stamceller. Därför anses stamceller vara en essentiell källa för underhåll av celler, vävnader och organ. (Kazunori & Takashi 1994)

Murina embryonala stamceller

Embryonala stamceller har förmågan att föröka sig odifferentierat *in vitro*. Resultat från studier på murina embryonala stamceller (mESC) tyder på att de kan utvecklas till ett flertal olika vävnader samt könsceller (Geijsen *et al.* 2003, Rohwedel *et al.* 1996). Med utökad kunskap om deras differentiering kan man använda specifika genetiska mutationer för att kontrollera deras utveckling. De första pluripotenta mESC forskare lyckades isolera och odla i en kultur var från embryonalt karcinom, vilket bildar den maligna tumören teratocarcinom. Dessa celler har förmågan att differentiera sig till neuroektoderm, mesoderm och endoderm precis som embryonala stamceller, men de tillväxer i en malign kultur och är därför inte fenotypiskt normala (Martin 1981). För att stamcellerna ska behålla sin odifferentierade förmåga odlas de på ett lager av fibroblaster.

1981 isolerades de första mESC som förökade sig odifferentierat på murina embryonala fibroblaster (Evens & Kaufman 1981). Effektiviteten för stamcelldifferentieringen hos de olika cellerna skiljde sig dock åt och cellutvecklingen visade sig vara stamberoende (Schoonjans *et al.* 2003). Efter *in vitro* isoleringen observerades en obegränsad tillväxtkapacitet hos pluripotenta ESC (Smith 2001). En faktor som har tendens att urskilja sig från sitt ursprungliga utseende är karyotypen, men enligt observerade data var en stabil karyotyp uppnådd. Karyotypen är kromosomernas utseende och antal. Dessa pluripotenta celler har en väldigt kort generationstid 12-15, timmar. Pga. generationen av mESC odlades cellerna *in vitro* med ett monolager av inaktiva embryonala murina fibroblaster (MEF) (Rohwedel *et al.* 1996). Det var känt att fibroblasterna hade någon form av regleringsförmåga, genom att antingen initiera återbildning av nya celler eller förhindra differentieringen (Robertson *et al.* 1987).

Två forskningsgrupper har helt oberoende av varandra upptäckt en pluripotent regulator som möjligen skulle kunna ersätta MEF, leukemi-inhiberande faktor (LIF). Denna fungerar som ett differentieringsinhiberande cytokin (Williams *et al.* 1988). LIF tillhör IL-6 familjens cytokiner, vilka reglerar olika cellfunktioner samt aktiverar transkription (STAT) genom ett membranbundet signaleringskomplex (gp130) (Boeuf 1997). Eliminering av IL-6 familjen och MEF initierar en spontan okontrollerad differentiering av mESC *in vitro* (Burdon *et al.* 1999).

Ett viktigt steg för att identifiera celler är molekyler som sitter på cellytan. Murina ESC uttrycker specifika embryoantigen (SSEA-1) och gp130 på cellytan (Solter *et al.* 1978). På plasmamembranet i cellerna finns det aktiviteter av alkaliskt fosfatas, ett enzym som tar bort fosfat från proteiner och nukleotider. Telomerasaktivitet kan också observeras. Telomeras är ett enzym som lägger till deoxyribonukleotider vid replikering av kromosomändarna. Deras funktion är viktig för att upprätthålla en god replikeringsduglighet (Harley 1991, Harley *et al.* 1992). mESC innehåller också Oct-3 är en essentiell epiblast-transkriptionsfaktor. Epiblast är en vävnadstyp som differentierat sig från den inre cellmassan (ICM) hos zygoter. Hos zygoter *in vivo* är denna transkriptionsfaktor essentiell för den pluripotenta utvecklingen av ICM (Nichols *et al.* 1998). Oct-3 i lämpliga mängder är nödvändig för att bevara pluripotensen. Om Oct-3-koncentrationen ökar till det dubbla av den ursprungliga koncentrationen fås en differentiering av mesoderm eller endoderm, medan förlust av Oct-3 resulterar i ektodermutveckling. Nanong är även den en mycket viktig pluripotent regulator hos inplanterade embryon och behövs i epiblastceller för differentiering av ESC. Dessa celler är också oberoende av cytokiner och kan därför kontinuerligt återbilda ESC utan stimulans från gp 130. Nanong agerar genom att minska den potentiellt inducerande

differentieringseffekten hos Oct-3/4.

Många forskningsfält har haft stor nytta av upptäckten av dessa murina ESC. Speciellt kunde vissa forskningsgrupper skapa genetiskt modifierade möss. Martin Evens och hans forskningsgrupp stod för den nya teknologin och fick nobelpriset i medicin 2007 tillsammans med Oliver Smithies och Mario Capecchi (Rippon *et al.* 2008).

Humana embryonala stamceller

1998 isolerades de första humana embryonala stamceller (hESC), som fortfarande kunde utvecklas till alla tre embryonala celltyper (mesoderm, ektoderm och endoderm) (Thomson *et al.* 1998). Liknande metod som vid isoleringen av mESC användes för att erhålla hESC. Först gjordes en donation av ägg med godkännande från patienten och den institutionella styrelsen. Sedan producerades human embryon med hjälp av ett ägg som fertiliserats *in vitro*. De fertiliserade äggen var antingen färska eller nedfrusna och befann sig i sitt klyvningsstadium (Thomson *et al.* 1998). Embryona fick växa i en näringslösning och i deras blastocyststadium isolerades de embryonala stamcellerna ifrån ICM *in vitro* (Stojkovic *et al.* 2004). ESC isolerades från 14 ICM och 5 olika embryonala stamcellslinjer. De isolerade cellerna hade en stor cellkärna i förhållande till cytoplasman och en kolonimorfologi som liknade rhesusapans ESC. Cellinjerna H1, H13, H14 hade en normal XY karyotyp, medan cellinjerna H7 och H9 hade en normal XX karyotyp. Fyra cellinjer blev nedkylda, efter 5-6 månader tinades de upp och fortfarande hade cellerna en odifferentierad prolifering. H9 cellinjen hade en normal XX karyotyp och en fortsatt odifferentierad prolifering, efter mer än 8 månader.(Thomson *et al.* 1998)

De humana och de murina embryonala stamcellerna besitter vissa olikheter. Till exempel har hESC dubbelt så lång generationstid än mESC. Vid mESC odling är det möjligt att byta ut matarlagret av fibroblaster med rekombinant LIF, medan odling av hESC kräver ett matarlager av fibroblaster för att upprätthålla pluripotensen. För att arbeta med de olika embryonala stamcellerna krävs olika behörighetskrav. hESC har även de telomerasaktivitet. Genom att öka telomerasaktiviteten hos vissa diploida kroppsceller kommer replikationsprocessen att förlängas (Bodnar *et al.* 1998). Under normala betingelser utan några experimentella influenser finns det höga halter av telomerasaktivitet i könsceller och embryonalvävnad (Wright *et al.* 1996).

De humana ESC uttrycker precis som mESC specifika embryonala antigener (SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81) på cellytan och alkaliskt fosfatas i cytoplasma (Thomson *et al.* 1995, Thomson *et al.* 1998). Med immunologiska metoder har forskare påvisat att förekomsten av antigenerna SSEA-3 och SSEA-4. Det finns antikroppar som binder olika starkt till antigenerna. SSEA-4 var antigenen med starkast affinitet till en antikropp. SSEA-3 har inte en lika stark affinitet vilket kan bero på att antigenens epitop (den del som antikroppen binder till) har en begränsad tillgänglighet. De humana ESC kolonierna som användes var morfologiskt identiska, härstammade inte från samma koloni. De odifferentierade hESC kolonierna identifierades och selekterades med specifika cellytemarkörer. Trots deras homogena utseende kan förmågan till odifferentierad cellutveckling variera, för att de inte isolerades från samma koloni (Thomson m fl. 1998).

Alla 5 cellinjer gav tumörutveckling efter att forskare injicerade patienterna som lider av allvarlig immunbrist med de humana embryonala stamcellerna (severe combined immunodeficiency). Varje patient utvecklade en godartad groddcellstumör vilket innehöll

endoderm, mesoderm och ektoderm celltyp. (Thomson *et al.* 1998)

Embryonala stamceller hos andra djur

Pluripotenta ESC har isolerats från djur som kanin, hamster och råtta, men endast hos möss och kyckling kan de pluripotenta cellerna utvecklas till alla tre celltyper i en miljö som är relativt lik människans hESC-differentiering (Chang *et al.* 1997, Doetschman *et al.* 1998, Schoonjans *et al.* 1996, Do & Schöler 2004). Något som kan vara fördelaktigt och intressant för fortsatt forskning på hESC är studier på ESC från andra primater. Till exempel har forskare karakteriserat ESC från apor (*Macaca mulatta*) med typiska cellytemarkörer, vilka verkar ha hög profileringsaktivitet och normal karyotyp *in vitro* (Thomson *et al.* 1995). Många gemensamma egenskaper för apors och människors ESC uttrycks från apcellinjen Cyno-1. Cellinjen har egenskaper som telomerasaktivitet och alkaliskt fosfat, uttrycker Oct-4, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, och cellerna besitter förmågan till differentiering. Äggen som används för att få fram stamcellerna från apan är partenogenes aktiverade. Partenogenes är en process där ägget kan utvecklas till en individ, utan mannens DNA. Därför kommer avkomman alltid ha samma genuppsättning som modern och blir därför alltid en hona. Detta ger oss hopp om att stamceller från partenogenes aktiverade ägg kan möjligen ge terapi åt kvinnor. Men som i all ny forskning har metoden begränsningar. I detta fall visar cellerna en försämrad genomisk prägling (Hernandez *et al.* 2003). Den försämrade präglingen innebär att gener som inte vanligtvis uttrycks nu kommer att uttryckas. Detta är en av orsakerna till att kloningen inte fungerar.

Reproduktiv kloning och terapeutisk kloning

Kärnöverföring kan appliceras vid olika slags studier med olika syften. Reproduktiv kloning och terapeutisk kloning är två sådana metoder. Stamceller används inte bara för att ersätta eller återbilda celler, vävnader eller organ utan används också för att skapa kloner av djur. Reproduktiv kloning (Fig.1A) syftar till att skapa en klonad individ från ett implanterat embryo. Reproduktiv kloning är då ett kärnlöst ägg förs ihop med en kroppscell och bildar en zygot. Zygoten får sedan växa i en näringslösning *in vitro*. När zygoten bildat en blastula överförs den till livmodern (Hochedlinger *et al.* 2003). Fåret Dolly var pionjären och sedan dess har flera däggdjur blivit klonade. Denna metod har i sin tur gett upphov till terapeutisk kloning. Det enda som skiljer de olika metoderna åt är att vid terapeutisk kloning (Fig.1B) får de embryonala stamcellerna fortsätta tillväxa i en lämpad miljö för att bilda önskad cell, vävnad eller organ. (Axelrod 1984)

Första steget vid terapeutisk kloning är att isolera valfri kroppscell som behöver ersättas eller återbildas från den sjuka patienten, oftast en epitelcell, för att bli av med genetisk prägling. Cellkärnorna med intakt DNA från celltypen extraheras. Samtidigt konstrueras kärnlösa ägg från donatorn som sedan fuseras ihop med de extraherade cellkärnorna från patienten. En elektrochock hjälper till med fusionen. Efter 4-6 dagars tillväxt i en näringslösning når sammanslaget av cellkärnorna och äggen sitt blastocyststadium och är redo för att användas. Blastulan är uppbyggd av en inre cellmassa (ICM), trofoektoderm och cytoplasma (Axelrod 1984). ICM hos blastulan kan utvecklas till någon av de alla tre celltyper (mesoderm, ektoderm och endoderm) (Fauci *et al.* 2008). ESC som utvinns från ICM får därefter antingen växa till i en lämplig miljö för att bilda cellprekursorer och injiceras i patienten eller så

injiceras ESC in i vävnad eller organ och differentieras till önskad cell. Kroppsegna celler används för att minimera avstötning från immunförsvaret, men vid kärnöverföringen bör histokompatibiliteten för mottagaren och donatorn stämma överens för att ingen immunavstötning ska uppkomma efter transplantation. Histokompatibilitet förklarar kroppens förmåga att acceptera cell, vävnad eller organ efter transplantation (Hochedlinger *et al.* 2003).

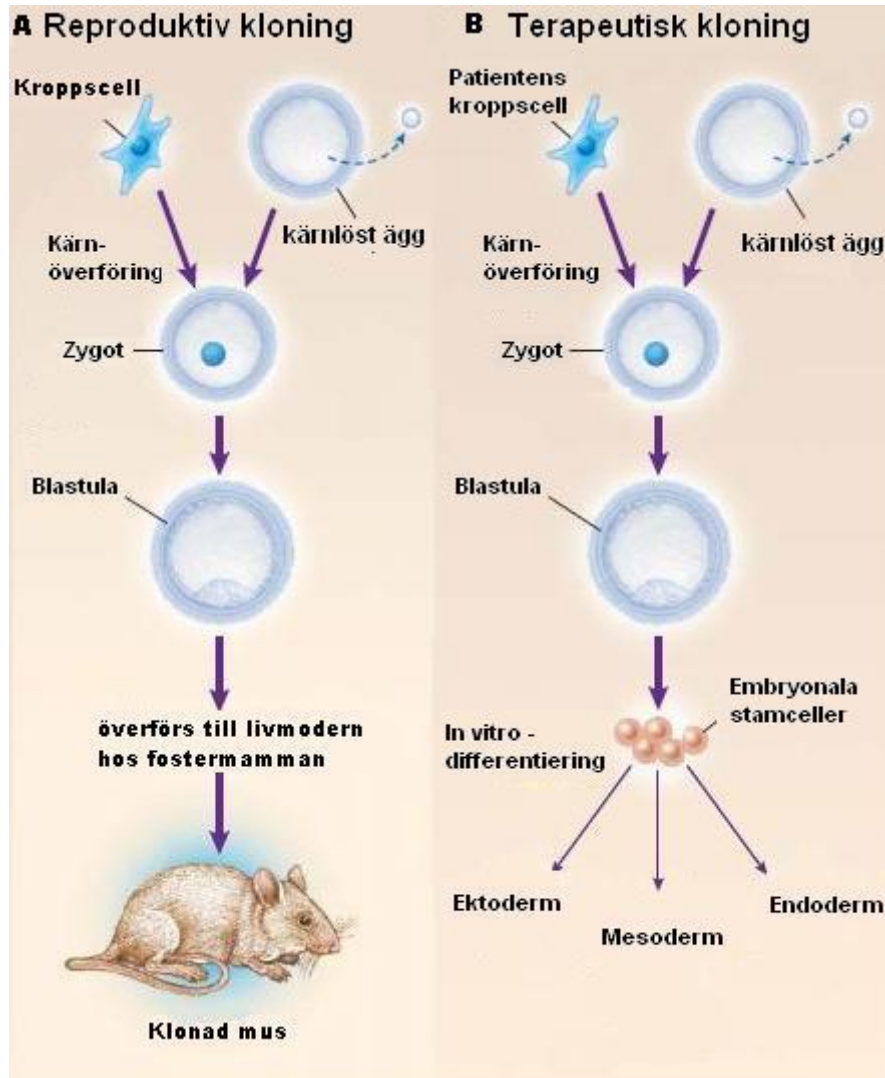


Figure 1. A) Kärnan från en kroppscell överförs till ett kärnlöst ägg och bildar en zygot. Zygoten får växa 4-6 dagar i en näringslösning *in vitro*. När zygoten bildat en blastula överförs den till livmodern där vidareutveckling sker. B) Vid terapeutisk kloning använder man patientens kroppscell vilket fuseras ihop med det kärnlösa ägget. Vid blastulastadiet isoleras ICM som odlas och kan bilda alla tre celltyper *in vitro*. (Omarbetad bild från Hochedlinger *et al.* 2003, med tillstånd från Copyright © 2003 Massachusetts Medical Society. Alla rättigheter hävdas.)

Tillväxtfaktorer som påverkar humana embryonala stamcellers differentiering

Det finns flera tillväxtfaktorer som påverkar riktningen av hESC-differentiering. Dessa olika tillväxt- samt differentieringsfaktorer påverkar hESC i ett tidigt utvecklingskede. Genmanipulation är en annan faktor som inducerar hESC-differentieringar. När utveckling av cellerna sker i transplantationssyfte finns det vissa riktlinjer som måste följas. Miljön måste

favorisera en stor kvantitet av odifferentierade ESC. Det är också nödvändigt att erhålla ett maximalt antal differentierade celler av en speciell typ. Idealet är att en homolog population kan erhållas, som är lämplig för transplantation. Det tredje kravet är att den laborativa miljön för ESC är standardiserad och differentieringen likaså, vilket är viktigt för att kunna erhålla resultat som kan upprepas i ett annat experiment. ESC märkta med fluorescerande protein (FP) kan transplanteras in i organ hos vuxna djur (hjärna, lever, hjärta etc) och detekteras med fluorescensmikroskopi. (Grivennikov 2008)

Kemiska ämnen som A-vitaminsyra var bland de första ämnen som användes i differentieringssyfte. Olika koncentrationer av A-vitaminsyra fick de humana embryonala stamcellerna att differentieras antingen till neuroner eller myocyter (muskelcell). (Grivennikov 2008)

Riktad differentiering av embryonala stamceller med hjälp av genmanipulation

Genmanipulation är en ny differentieringsteknik där främmande genetiskt material införs på olika ställen i ESC-genomet med hjälp av elektroporering (Lavon & Benvenisty 2003). Elektroporering öppnar upp tillfälliga håligheter i cellens membran, genom vilka det genetiska materialet kan passera. Materialet som förts in presenteras för stamcellernas DNA och genomgår homolog rekombination vid ett specifikt kromosomlocus. Rekombinationen ger stamcellerna olika differentieringsegenskaper (Thomson & Zwaka 2003). Metoden används för att reglera ESC-funktionen och dess differentiering till en speciell cellfenotyp lämpad för cellterapi. Genmanipulation har underlättat forskningen på ESC-differentiering. Forskare har nu kapaciteten att introducera vilken mutation som helst i ESC-genom från möss, vilket ger möjligheten att kartlägga deras differentiering både *in vitro* och *in vivo*. (Lavon & Benvenisty 2003)

Differentiering till det centrala nervsystemet med hjälp av olika tillväxt- och differentieringsfaktorer

Differentieringen av ESC till celler i nervsystemet är identifierad som ektodermutveckling. De flesta studierna som gjorts på ektoderm har koncentrerats på neuronutvecklingen, men också annan slags ektodermdifferentiering har studerats, celllytemarkörer för till exempel keratinocyter (Bagutti *et al.* 2006). Keratinocyter är celler i epidermis (hud) som bildar barriärer mot vatten. ESC-differentiering till celler med keratinocytmarkörer har lett till erhållandet av liknande embryonala epidermisceller, vilket antyder att de kanske besitter en normal funktion i vävnaden (Coraux *et al.* 2003). Benmorfogenetiskt protein (BMP4) är en tillväxtfaktor som reglerar bildandet av epidermis hos embryot (Kawasaki *et al.* 2000). När tillväxtfaktorn tillsätts till en kultur av celler som differentieras i riktning mot neuroektoderm samt keratinocyter, inhiberas istället differentieringen.

Det är svårt att göra studier på neuroektodermdifferentiering av ESC, eftersom att däggdjur har ett väldigt komplext nervsystem, speciellt med hänsyn till att det är omöjligt att studera de första differentieringstegen till neuroektoderm hos människor. Vid reparation av neuroglia-celler är *in vitro*-ESC-modellen essentiell, eftersom den täcker alla *in vivo* steg (Gottlieb & Huettner 1999, Ying & Smith 2003).

Differentiering av cellerna i denna riktning ger i slutfasen olika celltyper: neuroner och glia-celler. Gliaprekursorer ger upphov till olika differentierade glia-celler, som astrocyter

(också indelade i undergrupper), oligodendrocyter och Schwannceller. Det finns också olika differentierade neuroner, som dopaminerga, acetylkolinerga, gammaaminosmörtsyra (i GABA-erga neuron) och glutaminerga celler som utsöndrar olika excitatoriska substanser. I ett exempel användes en tredimensionell miljö bestående av polymjölksyra. ESC fäster sig vid mjölksyran och bildar en tredimensionell struktur, som karakteriserar neuronutveckling (Lavenberg *et al.* 2005). I detta system behandlades ESC ytterligare med NGF som är en nervtillväxtfaktor och neurotrophin-3 (NT-3) som upprätthåller propageringen av pluripotenta ESC. Resultatet blev en signifikant ökning av nestinpositiva celler (neuronal prekursorer) och β -III-tubulinpositiva celler (neuroner). Gerrard och hans forskningsgrupp utvecklade denna effektiva metod som baseras på blockeringen av BMP-signalering. Nogginhämmande substans blockerar BMP-signalering genom att binda till TGF-beta-ligander (BMP) och förhindrar därmed deras bindning till sin receptor (Gerrard *et al.* 2005). Åtgärden resulterade i att 90 % av de långtidsodlade cellerna uttryckte nestin (neuron prekursorer) och polysialinsyra-neuronvidhäftandemolekyl (PSA-NCAM). PSA-NCAM är en vidhäftningsmolekyl som stabiliserar uppkomst av cell-cell interaktioner vid neuronernas granulautveckling i en mogen hjärna. I följande odling användes inget noggin, vilket resulterade i ett uttryck av mikrotubuliassocierade protein (MAP2) samt β -III-tubulin. Systemet gav aldrig något uttryck av gliaceller under långtidsodlingen. Endast efter 80 dagars odling kunde GFAP-positiva (gliafibrillära sura protein) celler observeras. Denna metod resulterade i en partiell differentiering av cellerna till GABA-neuroner. De var också ett litet antal tyrosinhydroxylaspositiva celler (TH), förmodligen dopaminerga neuroner och inga glutamatneuroner.

När cellerna behandlades tidigt under differentieringen gav olika kombinationer av tillväxtfaktorer en berikad neuroncellpopulation. Odling i 40 dagar med tillväxtfaktorer FGF8 (en fibroblast-tillväxtfaktor), GDNF (gliapräglad neutrofil faktor), BDNF och askorbinsyra gav alla ett signifikant ökat antal av TH-positiva celler. Lektin-modifierade BDNF resulterade också i ökad differentiering av neuroner både *in vivo* och *in vitro* (Kitagawa *et al.* 2005). Lektin är sockerbindande molekyler som endast binder till specifika funktionella grupper på cellytan. Differentieringen till neuronal celler sker med hjälp av den intracellulära aktiveringen av ERK-1/2 (extracellulärt signaleringsreglerande proteinkinase) (Li *et al.* 2006). När kinaset inhiberas av specifika inhibitorer, som UO126, minskar antalet differentierade neuronceller. Därtill gav inhiberingen en aktivering av kaspas 3, som är ett proteas och spelar en central roll vid apoptos (programmerad celledöd). Resultatet tyder på att ERK inte endast är involverat i celldifferentiering utan även i upprätthållandet av cellernas livsduglighet.

Peptidregulatorer för differentieringen av neuroglia

Tillväxt- och differentieringsfaktorer är väldigt stora och dyra jämfört med peptidregulatorer. Eftersom peptidmolekyler är lättare att hantera och billigare att framställa vill forskare göra fler studier med dessa molekyler på ESC-differentiering. Neuropeptider används för differentieringen av mESC till neuronceller. Peptiderna förekommer som signalsubstanser i det perifera nervsystemet (PNS) av sensorisk, sympatiska och parasympatisk typ. Det parasympatiska och det sympatiska systemet arbetar mot varandra dvs. det sympatiska styr energikrävande handlingar (kamp och flykt) medan det parasympatiska styr energisparande handlingar (vila och matsmältning). Det sensoriska förmedlar känselimpulser från huden och musklernas känselkroppar till hjärnan. Hypofysadenylatcyklasaktiveringspeptid (PACAP) är en neuropeptid som förekommer i sensoriska parasympatiska och sympatiska nervsystem med likartad verkningsmekanism dvs. PACAP spelar en viktig roll för reparation av skadade

neurogliaceller. Vasoaktiv tarmpeptid (VIP) är en neuropeptid som förekommer vid normala förhållanden i den parasympatiska delen av nervsystemet (Cazillis *et al.* 2004). Neuropeptiderna agerar båda vid VPAC1 och VPAC2 receptorer som är kopplade till GTP-bundna protein. I 8 dagar inkuberades mESC med varje peptid, vilket resulterade i neuronbildning. I en kontrollkultur bestående av celler med neuronfenotyp fann de en positiv färgning av enolase, som är ett glykolytiskt neuronspecifikt enzym och finns i cytoplasma hos neurogliaceller. 10-25% av neurogliacellerna uttryckte enolaset. Efter att neurogliacellerna behandlats med respektive PACAP och VIP observerades en ökning upp till 80 och 91 %. Däremot gav neuropeptiderna ingen effekt på antalet O-4 positiva celler (oligodendrocytmarkör) eller GFAP-positiva celler (astrocytmarkör). Av den differentierade ökningen av neurogliaceller med PACAP och VIP bestod 47 och 52 % av TH-positiva celler medan 54 och 42 % bestod av GABA-positiva celler (Kim *et al.* 2006). Båda peptiderna stimulerar alltså proliferation av neuroner samt ökar deras livslängd. Att peptider kan fungera som neurogliareglerare är inget undantag, utan flera liknande studier på andra slags peptider har gett liknande resultat. (Grivennikov 2008)

Användning av humana embryonala stamceller mot Parkinsons sjukdom

Parkinsons sjukdom (PD) är en kronisk neurondegraderande sjukdom vilken oftast drabbar personer över 65 år. Patienter med PD har symtom som nedsatt rörlighet, muskelstelhet och skakningar. De har även svårt att påbörja rörelser. PD-drabbade personer har svårt att sköta vissa vardagliga sysslor, som att klä på sig, cykla och skriva. Många av patienterna blir deprimerade och dementa (talsvårigheter). Mediciner mot PD minskar endast symtomen vid ett tidigt sjukdomsförlopp, men eftersom sjukdomen är progressiv och kronisk återkommer symtomen efter några år som mer allvarlig (Cho *et al.* 2008). Därför kanske hESC kan vara lösningen till problemet.

Parkinsonsymtomen uppkommer vid förlust av dopaminerga celler. De dopaminerga cellerna producerar dopamin som är ett signalsubstansämne i hjärnan. Genom att skapa nya dopaminerga celler kan forskare kanske bota sjukdomen. Hjärnan är komplex och det är inte bara de dopaminerga cellerna som påverkas utan celler i den nedre delen av hjärnstammen också (Lindvall & Kokaia 2009). I stycket tidigare nämns flera olika tillväxtfaktorer som påverkar differentieringen av ESC till neuron- samt gliaceller. Efter differentieringen måste man kunna använda dessa celler i det syfte de framställdes till. I detta fall skulle det vara om de kunde ersätta neuroner.

Det finns olika sätt att odla dessa dopaminerga celler på. Cho (2008) och hans forskningsgrupp har gjort ett försök då de producerade hESC *in vitro* och differentierade dem till dopaminprekursorer, som TH-positiva celler. Resultatet tyder på att det flesta prekursorerna uttryckte nestin och musashi som är markörer för neuronprekursorer (Zhang *et al.* 2001). Efter dessa 10 dagar observerades en sfärisk neuronmassa (SNMs) vilken liknade neurosfärer (en ansamling av stamceller från hjärnan) (Reynolds *et al.* 1992). SNM kulturen kan växa under en lång period utan att förlora sin differentieringsförmåga. Denna kultur kan sedan inom kort tid (ca. 2 veckor) lockas att bilda dopaminerga celler (Cho *et al.* 2008). För att inducera dessa neuroner till att uttrycka en TH-positiv fenotyp från SNM tillsätts SHH (sonic hedgehog) och FGF8. Efter differentiering till TH-positiva celler gjordes immunofärgning genom att använda antikroppar mot TH-positiva samt B-III-tubulin. Resultatet gav ett positivt svar då totalt 77 % av de differentierade cellerna var B-III-tubulin positiva neuroner. Detta resultat

säger att forskare har isolerat de TH-positiva celler. Det angivna procentantalet av differentierade celler är inte specifikt för en cellinje, utan för flera. (Zeng *et al.* 2008)

Karakterisering av tyrosinhydroxylaspositiva celler

Efter att TH-positiva celler isolerats karakteriserades subtyperna. De flesta TH-positiva cellerna uttryckte aromatisk aminosyradekarboxylas (AADC: markör för både katekolaminer och serotonerga neuron) och vissa uttryckte även En1 (dopaminmarkör från mellanjärna); endast några få celler uttryckte dopamin B-hydroxylas (DBH; norepinefrinmarkör) (Cho *et al.* 2008). Majoriteten av de TH-positiva cellerna var alltså dopaminerga celler. Dessa celler uttryckte dock inte GABA dvs. inga luktsinnesdopaminmarkörer uttrycktes. GFAP och O4, som är astrocyt- och oligodendrocytmarkörer, observeras heller inte (Cho *et al.* 2008).

Under differentieringen av TH-positiva celler finns det olika molekyler som uttrycks olika mycket beroende på vilket utvecklingssteg cellerna befinner sig i. Oct4 som är en markör för odifferentierade hESC observerades endast i blastocyststadiet och inte vid initieringen av differentieringen. I SNM stadiet fanns en kraftig uppreglering av neuronmarkörer som Pax6 och Sox1. I slutet uttrycktes Nurr1, En1 och Pxt 3 markörer, vilket vanligtvis finns i mellanjärnan. Dessa resultat och resultaten i stycket ovan stämmer överens med varandra, vilket tyder på att de genererade TH-positiva cellerna är dopaminneuron som vanligtvis finns i mellanjärnan. Efter att forskare erhållit dessa celler injicerades cellerna hos den PD-sjuka patienten. Symtomen minskade gradvis och efter 12 veckor hade de försvunnit. Liknande modeller används för att skapa dopaminerga celler hos ickehumana primater med PD. 14 veckor efter transplantationen togs PET bilder (positronsemissionstomografi) som ger en bild på hur ansamlingen ser ut av olika kemiska substanser i kroppen. I detta fall fann forskarna att den kemiska substansen fluorodop hade ökat och symtomerna nedsatt rörlighet och muskelstelhet etc. minskade (Takagi *et al.* 2005). Dessa modeller har alla visat en funktionell återhämtning, men under återhämtningen finns det risk för tumörbildningar (Bjorklund *et al.* 2002). Det är möjligt att reducera dessa tumörbildningar eller i vissa fall ta bort dem med hjälp av GFP-beroende sortering, antibiotikaselektion (selektarar för en viss antibiotikaresistans i odlingsmediet) och immunisoleringsprocedurer. Dessa metoder appliceras efter isoleringen av neuronprekursorer (Jungling *et al.* 2003, Singh *et al.* 2005, Li *et al.* 1998).

Etiska aspekter och lagar angående stamcells forskning

Etiska utgångspunkter och olika aspekter

Vid stamcells forskning uppkommer olika etiska frågeställningar som man försöker besvara för att kunna handla utifrån vad som är ”etiskt rätt”. Kring denna fråga finns det olika avvägningar mellan intresse och princip. Är det etiskt godtagbart att utföra forskning på stamceller? Det man måste avväga är att man försöker göra någonting gott, men med ett ”mänskligt liv” som befinner sig i sitt utvecklingsskede. Samtidigt så berör detta även forskning på ägg och då måste man fråga sig om forskning på ägg är acceptabelt; i sådana fall anses forskning på embryonala stamceller som mer kontroversiell. Nästa fråga vore i sådana fall om det vore acceptabelt att producera ägg enbart för forskningsändamål (Persson & Engqvist. Prop. 2003/04:148 s.26-28).

I Sverige finns det speciella rådgivare åt riksdagen och regeringen som upplyser riksdagen och regeringen om de olika etiska frågorna från ett samhällsperspektiv. Rådet heter statens medicinsk-etiska råd (SMER). I detta fall blir regeringen eller riksdagen ombedd att kontakta

Vetenskapsrådets styrelse som representerar forskning inom tre ämnesområden humaniora/samhällsvetenskap, naturvetenskap/teknikvetenskap och medicin. Rådet utgår sedan ifrån flera grundläggande utgångspunkter.

En utgångspunkt skulle kunna vara att kunskapen är värdefull för samhällsutveckling; då kan man fråga sig till vilket pris kunskapen värdefull. En annan utgångspunkt som måste ses i balans med föregående utgångspunkt är att individer måste skyddas mot fysisk och psykisk skada och obehag. Denna fråga leder i sin tur till en annan fråga: Vid vilket skede anses det ha bildats en individ? Är det redan från det allra första utvecklingskedet efter befruktningen eller från när ett embryo har bildats (Persson & Engqvist. Prop. 2003/04:148 s.26-28). De grundläggande etiska punkterna är många likaså är samhällets olika aspekter och innan någonting anses vara etiskt acceptabelt är det många frågor som ska ställas och besvaras.

Lagar

I Sverige säger lagen (Johansson & Reuterstrand. Lag 1991:115) att försök på embryonala stamceller är tillåtet. Efter att ägget blivit befruktat har forskare dock maximalt 14 dagar på sig för att utföra experimentella försök. Under den tid embryona är nedfrysta gäller inte 14-dagarsregeln, eftersom att ingen utveckling sker. När forskare har utvecklat embryonala stamceller kan de fortsätta odlingen. Eftersom det inte längre anses vara ett embryo upphör lagen att gälla. De ägg som används är oftast ägg som blivit över ifrån provrörsbefruktning. Innan äggen omhändertas måste man få både mannens och kvinnans formella samtycke. För att en terapeutisk kloning ska ske måste samtycke ges från både donatorn och mottagare innan terapin kan börja. För att sedan gå vidare i forskningen måste man få tillstånd från regionala etikprövningsnämnder. Deras uppgift är att se över de olika etiska aspekterna och bestämma om man bör gå vidare med forskning med tanke på risker och obehag. Båda dessa lagar lyder på liknande sätt i Finland och Storbritannien. I en del länder som har starka katolska traditioner är det helt förbjudet att producera embryonala stamceller. Under George Bush presidentskap fick inga federala anslag användas för produktion av nya embryonala stamcellslinjer. USA:s nuvarande president Barack Obama har beslutat att statliga medel i USA återigen får ges till forskning på embryonala stamceller (Karlsson 2009)

Diskussion

Olika forskningsgrupper över hela världen har delat intresse för dess goda potentiella löfte. Tack vare forskning på andra primater har det gett oss bättre förståelse för hur människan fungerar och därmed kunna återgå de problem som uppkommer i människokroppen, men kunskap kommer också med stort ansvar. Därför bör tekniken och dess konsekvenser som skada och obehag etc. tas i åtanke innan beslut fattas, om det vore acceptabelt att utföra den här typen av forskning.

Större delen av forskningen har skett på mESC. De murina embryonal stamcellerna har gett oss en god förståelse för hur differentieringen sker hos de pluripotenta stamcellerna. Redan på denna nivå kan en rad olika faktorerens betydande roll ses för utvecklingen av cell, vävnad eller organ. Att studera hur differentiering sker hos de humana ESC kommer att ge forskare essentiell kunskap om utveckling och funktion av vävnad som skiljer sig mellan mus och människa. Om tillstånd skulle ges världen över för att vidareutveckla forskning på hESC- differentiering *in vitro* till specifika celltyper skulle vi kunna identifiera biologiska komponenter som reglerar hESC- differentieringen. De biologiska komponenterna skulle i sin tur kunna användas för återbildning av vävnad eller i mediciner. Att klargöra mekanismerna bakom differentieringen gör det möjligt för oss att bestämma riktningen på utvecklingen av specifika celltyper. Den standardiserade utvecklingen av euploida humana celler, t.ex. neuroner, kommer att tillföra en obegränsad källa av celler för medicinska upptäckter och transplantationsterapier.

Parkinson är en neurondegraderande sjukdom som i största del bryter ner dopaminerga celler i mellan hjärnan hos människan. Ersättningen av dessa celler skulle erbjuda livslång terapi då dagens mediciner endast bromsar sjukdomsförloppet. Transplantation av dessa celler måste ses över då nya strategier måste uppfinnas för att förhindra immunavstötning. Det vi skulle kunna göra är att producera ett bibliotek av ESC histokompatibla komplex eller genetiskt modifierade celler för att reducera immunavstötning. För vid kärnöverföringen måste mottagaren och donatorn ha samma slags histokompatibilitet för att ingen immunavstötning ska uppkomma vid transplantation.

De etiska aspekterna och utgångspunkterna är många och det är alltid svårt att veta var man ska börja. Alltså vi vill skapa hESC från zygoter. Visst kan det tyckas vara oetiskt att ta en individs liv i forskningssyfte. Jag ser dock inte blastulan vilken man isolerar ICM ifrån som en individ. För mig blir blastulan en individ när den har nått sitt fosterskede. För vid dess skede När cellerna isoleras befinner sig ansamlingen av cellerna långt ifrån en fulländad individ. Däremot kan tekniker för hur man bör gå tillväga för att nå sitt resultat klargöras. I alla fall bör mer forskning på embryonala stamceller utföras, innan vi kan applicera den i sjukvården. Däremot anser jag att metoden inom snar framtid kan bota dagens obotliga sjukdomar.

Tack

Det är flera personer som har hjälpt till med denna rapport. Först å främst skulle jag vilja tacka opponentgruppen Jonas Jilmefors, Bejan Aresh, Elin Carlsson och Linda Andersson för deras kreativa kritik. Sedan vilja tacka kursansvariga Karin Carlson och Anna Brunberg för en väldigt bra kurs.

Referenslista

- Axelrod HR. 1984. Embryonic stem cell lines derived from blastocysts by a simplified technique. *Developmental Biology* 101: 225–228.
- Bagutti, C., Wobus, A.M., Fassler, R., and Watt, F.M. 1996. Differentiation of embryonal stem cells into keratinocytes: comparison of wild-type and beta 1 integrin-deficient cells. *Developmental Biology* 179: 184-196.
- Bodnar, A.G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S.E., Chiu, C., Morin, G.B., Harley, C.B., Shay, J.W., Lichtsteiner, S. & Wright W.E. 1998. Extension of Life-Span by Introduction of Telomerase into Normal Human Cells. *Science* 279: 349-52.
- Boeuf, H., Hauss, C., Graeve, F.D., Baran, N. & Kedinger, C. 1997. Leukemia inhibitory factor-dependent transcriptional activation in embryonic stem cells. *The Journal of Cell Biology* 138: 1207–1217.
- Burdon, T., Stracey, C., Chambers, I., Nichols, J. & Smith, A. 1999. Suppression of SHP-2 and ERK signalling promotes self-renewal of mouse embryonic stem cells. *Dev Biol* 210: 30-43.
- Björn, L.O., Enckell, P.H., Meurling, P., Pelger, S. & Ståhl, S. 2005. Biologisk ordlista. Studentlitteratur, Lund.
- Cazillis, M., Gonzalez, B.J., Billardon, C., Lombet, A., Fraichard, A., Samarut, J., Gressens, P., Vaudry, H. & Rostène, W. 2004. VIP and PACAP induce selective neuronal differentiation of mouse embryonic stem cells. *European Journal of Neuroscience* 19: 798-808.
- Chang, I.K., Jeong, D.K., Hong, Y.H., Park, T.S., Moon, Y.K., Ohno, T. & Han, J.Y. 1997. Production of germline chimeric chickens by transfer of cultured primordial germ cells. *Cell Biology International* 21: 495-499.
- Cho, M. S., Lee, Y.E., Kim, J.Y., Chung, S., Cho, Y.H., Kim, D.S., Kang, S.M., Lee, H., Kim, M.H., Kim, J.H., Leem, J.W., Oh, S.K., Choi, Y. M., Hwang, D.Y., Chang, J.W. & Kim, D.W. 2008. Highly efficient and large-scale generation of functional dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proceedings of National Academy of Science* 105: 3392-3397.
- Coraux, C., Hilmi, C., Rouleau, M., Spadafora, A., Hinnrasky, J., Ortonne, J.P., Dani, C. & Aberdam, D. 2003. Reconstituted skin from murine embryonic stem cells. *Current Biology* 13: 849-853.
- Do, J.T. & Schöler H.R. 2004. Nuclei of embryonic stem cells reprogram somatic cells. *Stem Cells* 22: 941–949.
- Doetschman, T., Williams, P. & Maeda, N. 1988. Establishment of hamster blastocyst-derived embryonic stem (ES) cells. *Developmental Biology* 127: 224–227.
- Fauci, A.S., Braunwald, E., Kasper, D.L., Hauser, S.L., Longo, D.L., Jameson J.L. & Loscalzo, J. 2008. Harrison's principles of internal medicine. I: Ko, S.H. stem cell biology, kap. 66. McGraw-Hill Medical Publishing Division, New York.
- Fischer, M., Goldschmitt, J., Peschel, C., Brakenhoff, J.P., Kallen, K.J., Wollmer, A., Grotzinger, J. & Rose-John S.I. 1997. A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion. *Nature Biotechnology* 15: 142–145.
- Geijsen, N., Horoschak, M., Kim, K., Gribnau, J., Eggan, K. & Daley, G.Q. 2003. Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells. *Nature* 427: 148-154.
- Gerrard, L., Rodgers, L. & Cui, W. 2005. Differentiation of Human Embryonic Stem Cells to Neural Lineages in Adherent Culture by Blocking Bone Morphogenetic Protein Signaling. *Stem Cells* 23: 1234-1241.
- Gottlieb, D.I. & Huettner, J.E. 1999. An in vitro pathway from ES cells to neurons

- and Glia. *Cells Tissues Organs*, 165:165-172.
- Grivennikov, A. 2008. Embryonic Stem Cells and the Problem of Directed Differentiation. *Biochemistry* 73: 1438-1452.
- Harley, C.B. 1991. Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb?. *Mutation Research* 256: 271-282.
- Harley, C.B., Vaziri, H., Counter, C.M. & Allsopp, R.C. 1992. The telomere hypothesis of cellular aging. *Experimental Gerontology* 27: 375-382.
- Hernandez, L., Kozlov, S., Piras, G. & Stewart, C.L. 2003. Paternal and maternal genomes confer opposite effects on proliferation, cell-cycle length, senescence, and tumor formation. *Proceedings of National Academy of Science* 100: 13344–13349.
- Hochedlinger, K. & Jaenisch, R. 2003. Nuclear Transplantation, Embryonic Stem Cells, and the Potential for Cell Therapy. *New England Journal of Medicine* 349: 275-86.
- Johansson, Y. & Reuterstrand, B. 2005. Lag om ändring i lagen (1991:115) om återgårdar i forsknings- eller behandlingssyfte med befruktade ägg från människa. Förarbeten: Prop. 2003/04:148, bet. 2004/05:SoU7, rskr. 2004/05:152.
- Jüngling, K., Nägler, K., Pfrieger, F.W. & Gottmann, K. 2003. Purification of embryonic stem cell-derived neurons by immunoisolation. *The FASEB Journal* 17: 2100–2102.
- Kazunori, K. & Takashi, F. 1994. Transformation of fibroblasts into endothelial cells during angiogenesis. *Cell Tissue Research* 278: 625-628.
- Kawasaki, H., Mizuseki, K., Nishikawa, S., Kaneko, S., Kuwana, Y., Nakanishi, S., Nishikawa, S.I. & Sasai, Y. 2000. Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by Stromal Cell-Derived Inducing Activity. *Neuron* 28: 31-40.
- Kim, E., Clark, A.L., Kiss, A., Hahn, J.W., Wesselschmidt, R., Coscia, C.J. & Belcheva, M.M. 2006. μ - and κ -Opioids Induce the Differentiation of Embryonic Stem Cells to Neural Progenitors. *Journal of Biological Chemistry*. 281: 33749-33760
- Karlsson, U.O. 2009. Obama ger skjuts åt stamcellsforskningen. WWW-dokument http://www.nyteknik.se/nyheter/bioteknik_lakemedel/bioteknik/article534467.ece Hämtad 2009-05-23
- Kitagawa, A., Nakayama, T., Takenaga, M., Matsumoto, K., Tokura, Y., Ohta, Y., Ichinohe, M., Yamaguchi, Y., Suzuki, N., Okano, H. & Igarashi R. 2005. Lecithinized brain-derived neurotrophic factor promotes the differentiation of embryonic stem cells in vitro and in vivo. *Biochemical and biophysical research communications* 328:1051-1057.
- Levenberg, S., Burdick, J.A., Kraehenbuehl, T. & Langer, R. 2005. Neurotrophin-induced differentiation of human embryonic stem cells on three-dimensional polymeric scaffolds. *Tissue Engineering*, 11: 506-512.
- Li, M., Pevny, L., Lovell, B.R., Smith, A. 1998. Generation of purified neural precursors from embryonic stem cells by lineage selection. *Current Biology* 8: 971–974.
- Li, Z., Theus, M.H. & Wei, L. 2006. Role of ERK 1/2 signaling in neuronal differentiation of cultured embryonic stem cells. *Developmental Growth & Differentiation*. 48: 513-523.
- Lindvall, O. & Kokaia, Z. 2009. Prospects of stem cell therapy for replacing dopamine neurons in Parkinson's disease. *Trends in Pharmacological Sciences* 30: 260-267.
- Martin G.R. 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of National Academy of Science of the United States of America* 78: 7634–7638.
- Nichols, J., Zevnik, B., Anastasiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers,

- I., Scholer, H. & Smith, A. 1998. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 95: 379–391.
- Persson, G. & Engqvist, L. 2004. Stamcellsforskning. Regeringens proposition 2003/04:148 s.26-28.
- Reynolds, B.A, Weiss, S.1992. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255: 1707–1710.
- Rippon, H.J., Lane, S., Qin, M., Ismail, N.S., Wilson, M.R., Takata, M. & Bishop, A.E. 2008. Embryonic Stem Cell as a Source of Pulmonary Epithelium In Vitro and In Vivo. *Proceedings of the American Thoracic Society* 5: 717-722.
- Robertson, E.J. 1987. Embryo-derived stem cell lines. I: Teratocarcinoma and Embryonic Stem Cells: a Practical Approach. pp. 71–112. Oxford, UK.
- Rohwedel, J., Sehlmeier, U., Shan, J., Meister, A. & Wobus, AM. 1996. Primordial germ cell-derived mouse embryonic germ (EG) cells in vitro resemble undifferentiated stem cells with respect to differentiation capacity and cell cycle distribution. *Cell Biology International* 20: 579–587.
- Schoonjans, L., Albright, G.M., Li, J.L., Collen, D. & Moreadith, R.W. 1996. Pluripotential rabbit embryonic stem (ES) cells are capable of forming overt coat color chimeras following injection into blastocysts. *Molecular Reproduction and Development* 45: 439–443.
- Schoonjans, L., Kreemers, V., Danloy, S., Moreadith, RW., Laroche, Y. & Collen, D. 2003. Improved generation of germline-competent embryonic stem cell lines from inbred mouse strains. *Stem Cells* 21: 90–97.
- Singh, R.N., Nakano, T., Xuing, L., Kang, J., Nedergaard, M. & Goldman, S.A. 2005. Enhancer-specified GFP-based FACS purification of human spinal motor neurons from embryonic stem cells. *Experimental Neurology* 196: 224–234.
- Smith, AG. 2001. Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annu Rev Cell Developmental Biology* 17: 435–462.
- Solter, D. & Knowles B.B. 1978. Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1). *Proceedings of National Academy of Science* 75: 5565–5569.
- Stojkovic, M., Lako, M., Stojkovic, P., Stewart, R., Przyborski, S., Armstrong, L., Evans, J., Herbert, M., Hyslop, L., Ahmad, S., Murdoch, A. & Strachan, T. 2004. Derivation of human embryonic stem cells from day-8 blastocysts recovered after three-step in vitro culture. *Stem Cells* 22: 790–797.
- Takagi, Y., Takahashi, J., Saiki, H., Morizane, A., Hayashi, T., Kishi, Y., Fukuda, H., Okamoto, Y., Koyanagi, M., Ideguchi, M., Hayashi, H., Imazato, T., Kawasaki, H., Suemori, H., Omachi, S., Iida, H., Itoh, N., Nakatsuji, N., Sasai, Y. & Hashimoto, N. 2005. Dopaminergic neurons generated from monkey embryonic stem cells function in a Parkinson primate model. *Journal of Clinical Investigation* 115: 102–109.
- Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S. & Jones, J.M. 1998. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocytes. *Science* 282: 1145-1147.
- Thomson, J.A., Kalishman, J., Golos, T.G., Durning, M., Harris C.P., Becker R.A. & Hearn, J.P. 1995. Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Developmental Biology* 92: 7844-7848.
- Thomson J.A. & Marshall V.S. 1998. Primate embryonic stem cells. *Current Topics in Developmental Biology* 38: 133-165.
- Viswanathan, S., Frishman, L.J. & Robson, J.G. 2000. The uniform field and pattern

- ERG in macaques with experimental glaucoma: removal of spiking activity. *Investigative Ophthalmology & visual science* 41: 2797–2810.
- Williams, R.L., Hilton, D.J., Pease, S., Willson, T.A., Stewart, CL., Gearing, D.P., Wagner, E.F., Metcalf, D., Nicola, N.A. & Gough, N.M. 1988. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 336: 684–687.
- Wright, W.E., Piatyszek, M.A., Rainey, W.E., Byrd, W. & Shay, J.W. 1996. Telomerase Activity in Human Germline and Embryonic Tissues and Cells. *Developmental Genetics* 18: 173-179.
- Ying, Q.L. & Smith, A.G. 2003. defined conditions for neural commitment and differentiation. *Methods Enzymol* 365: 327-341.
- Zeng, X., Cai, J., Chen, J., Luo, Y., You, Z.B., Fotter, E., Wang, Y., Harvey, B., Miura, T., Backman, C., Chen, G.J., Rao, M.S. & Freed, W.J. 2004. Dopaminergic differentiation of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 22: 925-940.
- Zhang, S.C., Wernig, M., Duncan, I.D., Brustle, O. & Thomson, J.A. 2001. In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology* 19: 1129–1133.
- Zwaka, .T.P. & Thomson, J.A. 2003. Homologous recombination in human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology* 3: 319–321.