

## **TEKNOLOGI *INDUCED PLURIPOTENT STEM CELL (iPSC)* BERBASIS METODE 3D HANGING DROP SEBAGAI TERAPI GENODERMATOSIS GENERASI BARU**

**Doni Dermawan, Eli Halimah**

Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran  
Jl. Raya Bandung Sumedang KM.21 Jatinangor 45363  
donidermawan07@gmail.com

### **Abstrak**

Genodermatosis merupakan penyakit kulit disebabkan oleh faktor genetik yang berkaitan langsung dengan defisiensi struktur dan fungsi kulit. Beberapa jenis genodermatosis diakibatkan oleh adanya keterlibatan multisistem patologis yang dapat meningkatkan morbiditas dan mortalitas bagi penderitanya. Tingkat insidensi genodermatosis di seluruh dunia yakni antara 1:6000 sampai 1:500.000 dari penyakit kulit secara keseluruhan dan biasanya terjadi sejak lahir dan beberapa terjadi pada usia anak-anak. Keterbatasan akses terapi yang efektif, aman, dan terbukti secara klinis merupakan permasalahan utama dalam penanganan genodermatosis. Terapi gen merupakan fokus utama penelitian sebagai pilihan terapi genodermatosis namun juga memiliki keterbatasan meliputi risiko induksi tumor, pemilihan vektor, ekspresi gen dengan waktu yang singkat, adanya respons imun terhadap terapi gen yang diberikan, terbatas pada penyakit monogenik, dan risiko munculnya efek genotoksitas. Tujuan dari *literature review* ini adalah untuk menganalisis secara komprehensif mengenai teknologi *Induced Pluripotent Stem Cell (iPSC)* berbasis metode kultur sel *3D Hanging Drop* sebagai generasi baru terapi genodermatosis. Hasil studi menunjukkan Teknologi *induced pluripotent stem cell (iPSC)* yang dikombinasikan dengan metode kultur sel *3D hanging drop* memiliki potensi yang sangat tinggi dalam penanganan penyakit genodermatosis ditinjau dari aspek keamanan berdasarkan profil keunggulan karakteristik koreksi secara genetik dengan mengganti jaringan yang mengalami mutasi dengan jaringan yang telah diprogram ulang.

**Kata Kunci:** *3D hanging drop*, Genodermatosis, *iPSC (induced Pluripotent Stem Cell)*

### **Abstract**

*Genodermatoses are skin diseases caused by genetic factors that are directly related to structural deficiencies and skin functions. Several types of genodermatoses are caused by pathological multisystem involvement that can increase morbidity and mortality for the patients. The worldwide incidence rate of genodermatoses is between 1: 6000 to 1: 500,000 of skin diseases as a whole and usually occurs at birth and some occur at the age of the children. Limited access to effective, safety, and clinically proven therapy are the major problems in the treatment of genodermatoses. Gene therapy is the main focus of the study as a choice of genodermatoses therapy but also has limitations including the risk of tumor induction, vector selection, short gene expression, immune response to gene therapy, limited to monogenic diseases, and risk of genotoxicity. The purpose of this literature review is to analyze the Induced Pluripotent Stem Cell (iPSC) technology based on the Hanging Drop 3D cell culture method as a new generation of genodermatoses therapy. The results of the study showed that induced pluripotent stem cell technology (iPSC) combined with 3D hanging drop cell culture method has a very high potential in the treatment of genodermatoses disease in terms of safety aspects based on genetic correction characteristics advantage profile by replacing tissue mutated with tissue which have been reprogrammed.*

**Keywords:** *3D hanging drop*, Genodermatoses, *iPSC (induced Pluripotent Stem Cell)*

## PENDAHULUAN

Genodermatosis merupakan penyakit kulit disebabkan oleh faktor genetik yang berkaitan langsung dengan defisiensi struktur dan fungsi kulit. Beberapa jenis genodermatosis diakibatkan oleh adanya keterlibatan multisistem patologis yang dapat meningkatkan morbiditas dan mortalitas bagi penderitanya. Genodermatosis secara umum dikelompokkan dalam tiga jenis yakni kromosom, gen tunggal, dan poligen. Genodermatosis merupakan penyakit kulit yang jarang ditemukan namun dapat berbahaya bagi kehidupan dan berimplikasi terhadap kualitas hidup penderitanya meliputi pengucilan sosial, disabilitas, dan ekspektasi harapan hidup yang rendah. Jenis genodermatosis yang menjadi perhatian utama penelitian klinis berdasarkan efek patologisnya mencakup iktiosis, epidermolisis bulosa, dan xeroderma pigmentosum.<sup>[1,2,3]</sup>

Tingkat kejadian atau insidensi genodermatosis di seluruh dunia yakni antara 1:6000 sampai 1:500.000 dari penyakit kulit secara keseluruhan dan biasanya terjadi sejak lahir dan beberapa terjadi pada usia anak-anak. Di Indonesia belum terdapat prevalensi genodermatosis secara menyeluruh namun tercatat terdapat sebanyak 10 orang yang dirawat atau 0,52% di RSUD Dr. Soetomo Surabaya dengan kasus genodermatosis selama periode 2010-2014. Dimana 50% berjenis

kelamin pria dan 50% berjenis kelamin wanita dengan kelompok usia terbanyak yaitu 5-14 tahun sebanyak 5 orang (50%). Genodermatosis yang ditemukan terdiri dari 3 pasien iktiosis, 2 pasien epidermolisis bulosa (EB), 2 pasien xeroderma pigmentosum (XP), 1 neurofibromatosis (NF) tipe-1, 1 limfangioma sirkumkripta, 1 nevus epidermal verukosa. Data lainnya yakni sebanyak dua pasien (0,59%) dengan genodermatosis terdapat di rumah sakit Dr. Moewardi Surakarta pada periode 2011-2012.<sup>[4,5,6]</sup>

Sampai saat ini hanya terdapat terapi simptomatik yang tersedia dalam penanganan genodermatosis. Keterbatasan akses terapi yang efektif, aman, dan terbukti secara klinis merupakan permasalahan utama dalam penanganan genodermatosis. Terapi gen merupakan fokus utama penelitian sebagai pilihan terapi genodermatosis namun juga memiliki keterbatasan meliputi risiko induksi tumor, pemilihan vektor, ekspresi gen dengan waktu yang singkat, adanya respons imun terhadap terapi gen yang diberikan, terbatas pada penyakit monogenik, dan risiko munculnya efek genotoksisitas.<sup>[7]</sup>

Penelitian terkini untuk menangani genodermatosis berbasis terapi gen yakni pemanfaatan sel punca (*stem cell*) untuk menggantikan jaringan kulit yang mengalami mutasi serta defisiensi struktur

dan fungsi. *Induced pluripotent stem cell (iPSC)* merupakan jenis sel punca yang memiliki prospek yang memiliki tingkat efisiensi dan keamanan paling tinggi di antara jenis sel punca lainnya. *iPSC* dapat berdiferensiasi menjadi keratinosit dan fibroblast yakni komponen seluler utama kulit dan dapat merekonstruksi struktur kulit. *iPSC* memiliki keunggulan utama yakni sifatnya yang pluripotent (dapat berdiferensiasi menjadi berbagai jaringan dan organ), tingkat proliferasi yang tinggi, dan sesuai dengan kode etik dikarenakan diperoleh dari jaringan dewasa serta tidak adanya proses penghacuran embrio.<sup>[8,9]</sup>

Tujuan dari *literature review* ini adalah untuk menganalisis secara komprehensif mengenai teknologi *Induced Pluripotent Stem Cell (iPSC)* berbasis metode kultur sel *3D Hanging Drop* sebagai terapi genodermatosis generasi baru yang memiliki tingkat efektivitas dan efisiensi yang tinggi.

## **METODE**

Metode yang digunakan dalam penulisan karya ilmiah ini adalah *Cochrane Collaboration Review* yang mencakup studi literatur, pengujian kualitas studi, pengumpulan dan karakterisasi data, analisis, interpretasi hasil, dan rekomendasi uji klinik serta penelitian lebih lanjut.

Studi literatur dilakukan dengan mengumpulkan data dari berbagai penelitian yang telah dipublikasi dalam jurnal nasional dan internasional

terakreditasi seperti *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, *Journal of Investigative Dermatology*, *Periodical of Dermatology and Venereology*, dan *Nature Molecular Cell Biology*. Data sekunder juga didapatkan dari buku bidang dermatologi yakni *Andrews' Diseases of the Skin Clinical Dermatology*.

Data yang didapatkan merupakan data kualitatif dan data kuantitatif. Data kualitatif diolah melalui suatu proses pemilihan dan penyederhanaan data yang disajikan dalam bentuk naratif. Kemudian ditarik kesimpulan secara bertahap dengan mempertimbangkan dan memperhatikan perkembangan perolehan data. Data kuantitatif diolah dengan mendeskripsikan variabel penelitian yang telah diambil dari berbagai sumber dengan menarasikan menjadi suatu bentuk paragraf, sehingga data yang dihasilkan memiliki penjelasan.

## **PEMBAHASAN**

*Induced pluripotent stem cell (iPSC)* merupakan pemrograman ulang secara langsung sel somatik menjadi sel punca oleh empat faktor transkripsi (*Oct3/4*, *Sox2*, *c-Myc*, dan *Klf4*) atau yang dikenal dengan Faktor Yamanaka dapat menghasilkan sifat pluripoten seperti sel punca embrionik dan menjadi awal era baru penelitian dan terapi berbasis sel punca termasuk pada bidang dermatologi. Pembentukan *iPSC* dilakukan melalui tahapan preparasi gen *Fbx15*, kultur sel, infeksi retroviral, konstruksi plasmid, analisis histologi, perunutan genomik,

penentuan kariotipe, DNA *microarray*, diferensiasi secara *in vitro*, dan uji imunopresipitasi. Teknologi *iPSC* mengalami kemajuan yang pesat dalam pengaplikasiannya terhadap bidang

pengobatan penyakit genetik dan degeneratif, pemodelan penyakit, serta penemuan obat baru.<sup>[10]</sup>

**Tabel 1.** Perbandingan antara *iPSC* dengan Sel Punca Embrionik dan Sel Punca Dewasa.<sup>[11,12]</sup>

Aspek	Sel Punca Embrionik	Sel Punca Dewasa	<i>induced Pluripotent Stem Cell (iPSC)</i>
<b>Sumber</b>	embrio	jaringan dewasa	jaringan dewasa
<b>Potensi</b>	pluripoten	multipoten	pluripoten
<b>Proliferasi <i>in vitro</i></b>	sangat tinggi	terbatas	sangat tinggi
<b>Penggunaan klinik</b>	perlu induksi	dapat langsung ditransplantasi	perlu induksi
<b>Kode etik</b>	tidak sesuai	sesuai	sesuai

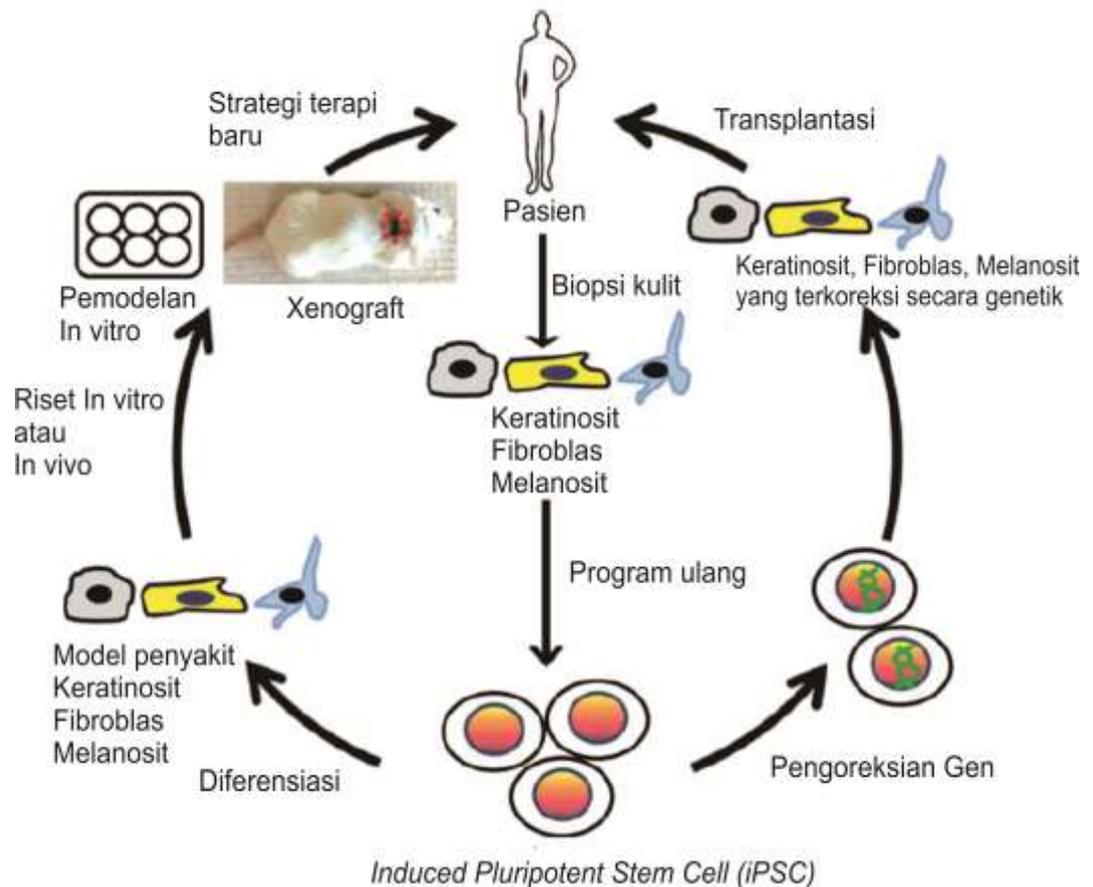
Keunggulan *iPSC* memiliki potensi yang baik dalam bidang dermatologi dimana kulit merupakan jaringan ideal untuk pengaplikasian awal terapi berbasis *iPSC* dikarenakan kulit mudah diperoleh dan digunakan serta jika terjadi efek yang tidak diinginkan pada area tertentu dapat dikeluarkan. Penggunaan *iPSC* terhadap terapi genodermatosis dapat mengoreksi pada tingkat genetik seperti pada epidermolisis bullosa dan iktiosis yang disebabkan oleh cacat monogenik. Koreksi yang dicapai pada *iPSC* yang berasal dari pasien dengan penyakit kulit dapat dihasilkan oleh diferensiasi *iPSC* yang

terkoreksi ke dalam sel kulit yang sifatnya autolog untuk transplantasi.

Keberhasilan pengembangan terapi genodermatosis berbasis *iPSC* sangat bergantung pada empat tahapan penting. Pertama, isolasi sel dari pasien melalui biopsi kulit. Kedua, sel yang telah diperoleh kemudian diprogram ulang untuk menghasilkan *iPSC* dengan empat faktor induksi (Faktor Yamanaka) sehingga diperoleh sifat pluripoten. Ketiga, kecacatan genetik pada *iPSC* yang telah dihasilkan perlu untuk dikoreksi secara genetik dengan rekombinasi homolog. Keempat, sel pluripoten spesifik yang diperoleh perlu untuk berdiferensiasi

menjadi tipe sel yang relevan dan penyakit pasien kemudian ditransplantasikan terhadap pasien tersebut (autograft). *iPSC* yang belum terkoreksi dapat digunakan sebagai sumber sel spesifik yang relevan

dengan penyakit untuk pemodelan penyakit secara *in vitro* sehingga dapat digunakan sebagai sarana analisis mekanisme penyakit dan penemuan obat baru.<sup>[9]</sup>



**Gambar 1.** Tahapan Aplikasi *iPSC* Terhadap Genodermatosis.<sup>[9]</sup>

**Pemrograman Ulang Sel dari Pasien dengan Genodermatosis**

Pembentukan *iPSC* dari pasien genodermatosis telah berhasil secara klinis dengan mengoreksi gen yang relevan dengan penyakit melalui pemrograman ulang sel.

**Tabel 2.** Gen yang terkoreksi berbasis *iPSC* pada penyakit Epidermolisis Bullosa.<sup>[13,14]</sup>

Gen yang Terkoreksi	Penyakit
	Junctional
<i>LAMB3</i>	Epidermolisis Bullosa (JEB)
	Resesif Distropik
<i>Col7A1</i>	Epidermolisis Bullosa (RDEB)
<i>KRT5, KRT14</i>	Epidermolisis Bullosa Simpleks

Epidermolisis bullosa (EB) adalah jenis penyakit kulit lepuh kongenital dengan manifestasi klinis mulai dari ringan berupa lepuh pada kulit akibat trauma (EB simpleks) hingga bentuk parah berupa epidermolisis yang tersebar luas disertai ulserasi kronis dan pembentukan skar (*junctional EB* dan *recessive dystrophic EB*). Terapi gen bertujuan mengembalikan kadar protein struktural yang hilang.<sup>[15]</sup>

### **Diferensiasi *iPSC* Menjadi Sel Kulit**

Kemampuan *iPSC* untuk berdiferensiasi menjadi tipe sel kulit menentukan keberhasilan terapi. Keratinosit, melanosit, dan fibroblast telah berhasil diperoleh dari *iPSC* dengan penggunaan asam retinoat dan *bone morphogenetic protein-4 (BMP4)*. Keratinosit yang diperoleh dari *iPSC* dapat membentuk jaringan epidermis dan kulit fungsional ketika ditransplantasi dengan fibroblast. Melanosit dapat diperoleh dari *iPSC* dengan penambahan faktor transkripsi *Wnt3a* dan endotelin-3. Sedangkan fibroblast dapat diperoleh dari kultur *iPSC* dengan *EGF* dan *BMP4*.<sup>[16,17]</sup>

### **Terapi Koreksi Genetik pada Genodermatosis Berbasis *iPSC***

Salah satu hambatan terapi gen adalah ketersediaan vektor yang aman dan mampu menghasilkan efek terapeutik jangka panjang dengan risiko mutagenesis yang rendah. Pendekatan berbasis vektor plasmid dan adenoviral untuk penghantaran gen kurang efisien dalam menginduksi efek korektif jangka panjang

pada keratinosit. Dengan demikian, terapi koreksi genetik melalui rekombinasi homolog mungkin satu-satunya terapi untuk genodermatosis, terutama untuk penyakit yang melibatkan mutasi kehilangan fungsi secara resesif, seperti yang terjadi pada JEB dan RDEB. Karena epidermis terus diperbarui oleh sel induk dewasa yang berada di lapisan basal proliferasi, koreksi genetik permanen harus menargetkan populasi *iPSC*.<sup>[18]</sup>

### ***iPSC* Untuk Pemodelan Penyakit**

Meskipun sel kulit dapat dengan mudah diisolasi dari biopsi pasien, dapat diperbanyak, dan digunakan untuk pemodelan mekanisme penyakit genodermatosis namun siklus hidup yang singkat menjadi kendala pengujian secara *in vitro*. Sel kulit yang diperoleh dari *iPSC* dapat mempertahankan fenotipnya pada kultur 3D contohnya pada diferensiasi *RDEB-iPSC* menjadi keratinosit dan sangat berguna bagi penelitian aspek fisiologis dan patologis kulit pada genodermatosis.

### **3D Hanging Drop Sebagai Metode Kultur Sel *iPSC***

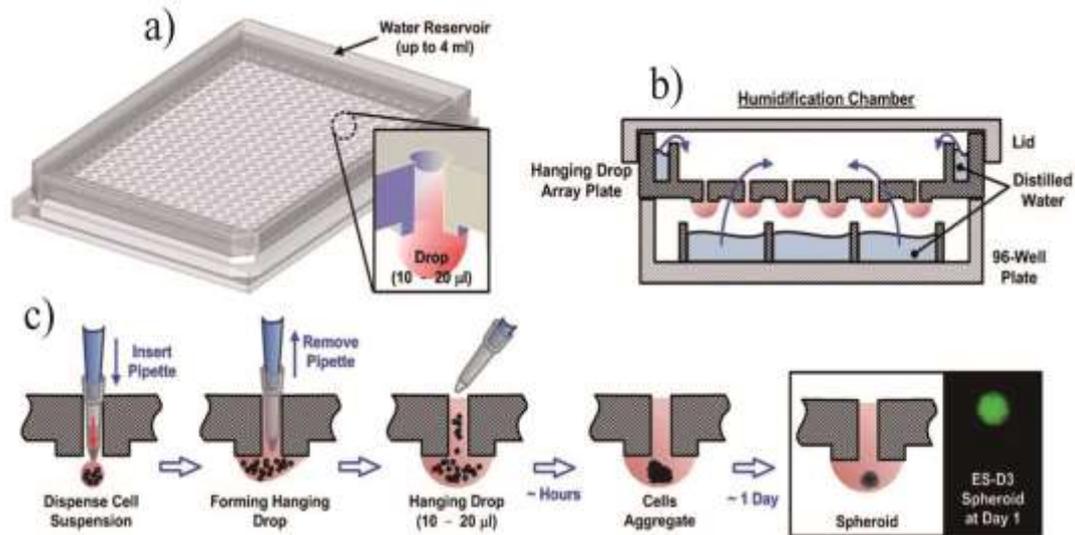
Kultur sel tiga dimensi (3D) diperlukan dalam percobaan model seluler dengan tingkat kesamaan dengan jaringan fisiologis tubuh yang lebih baik. Kultur sel dua dimensi (2D) konvensional sering kali gagal dalam memperoleh fungsi seluler dan respon yang terdapat pada jaringan. Hasilnya yakni pengujian suatu senyawa obat dan pengujian biologi berbasis kultur 2D cenderung tidak simetris dan memiliki

keterbatasan kapabilitas hasilnya. Untuk memperoleh data fisiologis yang lebih relevan, telah dikembangkan bermacam teknik kultur sel 3D untuk mereplikasi karakteristik *in vivo* dari jaringan fisiologis. Beberapa metode ini melibatkan penggunaan matriks ekstraseluler, hidrogel, dan matriks penyangga, metode lainnya memerlukan penggunaan bioreaktor dan permukaan substrat yang direkayasa.<sup>[19,20]</sup>

Kultur sel dalam bentuk sferoid (bentuk bola) 3D memiliki reproduksibilitas dan tingkat kesamaan yang tinggi dengan jaringan fisiologis. Pembentukan sferoid melibatkan kultivasi sel tersuspensi dalam tetes gantung pada bagian bawah plat. Proses ini memerlukan pembalikan tutup diikuti dengan penggantian tetesan. Hasilnya yakni tetesan akan rentan terhadap gangguan yang mengakibatkan jatuhnya tetesan, penyebaran yang berlebih, dan tersatukannya dengan tetesan disebelahnya. Kelemahan lainnya dari metode pembentukan sferoid

konvensional yakni sulitnya melakukan pertukaran media kultur tanpa merusak sferoid serta kesulitan dalam peningkatan skala kultur sferoid untuk skrining dan pengujian senyawa obat melalui *High Throughput Screening (HTS)*. Diperlukan metode pembentukan kultur sferoid yang efektif dan efisien dalam proses kultur sel *iPSC*.<sup>[21]</sup>

*3D Hanging Drop Method* merupakan metode dan perangkat baru yang dapat membentuk sferoid yang memiliki keseragaman ukuran pada mikroplat 384-lubang dan menggunakan instrumen *High Throughput Screening (HTS)* mencakup pembaca plat, sistem analisis, dan pencitraan otomatis. Teknologi ini ditemukan oleh Dr. Shuichi Takayama pada tahun 2011 dan disempurnakan pada tahun 2013. Tujuan dirancangnya teknologi ini yakni untuk menghasilkan lingkungan *in vitro* yang relevan dengan lingkungan *in vivo* sehingga fungsi dan karakteristik sel pada kondisi sehat dan patologis dapat ditinjau dengan jauh lebih baik.<sup>[22]</sup>



Gambar

2. Teknologi Kultur Sel *3D Hanging Drop*. a) Plat kultur sferoid 384 *hanging drop*. b) *Chamber* humidifikasi yang digunakan untuk kultur sferoid 3D pada plat *hanging drop*. c) Proses pembentukan *hanging drop* pada plat.<sup>[22]</sup>

Berdasarkan penelitian Takayama, *3D Hanging Drop Method* memungkinkan pembentukan, pengujian, dan analisis dari sferoid 3D mudah untuk dilakukan. Perangkat terdiri dari plat kultur tetes gantung utama, penutup, dan trei komplementer yang berfungsi untuk menjaga sterilitas dan mengurangi kemungkinan terjadinya evaporasi. Plat kultur utama terdiri dari lubang akses yang memungkinkan pemasukkan cairan dan sferoid dari sisi atas. Terdapat sebuah reservoir di sekitar plat kultur yang berfungsi untuk mengurangi evaporasi. Dimensi keseluruhan perangkat telah memenuhi standar *American National Standards Institute (ANSI)* dan *Society of Biomolecular Screening (SBS)*. *3D Hanging Drop Method* dilakukan dengan meneteskan volume yang kecil dari suspensi sel melalui tip pipet ke dalam lubang akses dari mikroplat bagian atas

kemudian tetes gantung distabilkan oleh struktur bagian bawah dari mikroplat kemudian senyawa obat dapat ditambahkan atau dikeluarkan pada setiap tetes gantung. Pengujian kolorimetri dan fluoresensi dapat dengan mudah dilakukan dengan memasukkan mikroplat *3D Hanging Drop* ke suatu instrumen pembaca plat. Kultur sel sferoid yang dikombinasikan dengan *High Throughput Screening (HTS)* dapat meningkatkan akurasi terhadap upaya pembentukan *iPSC* serta penemuan dan pengembangan obat.<sup>[22]</sup>

## SIMPULAN

Teknologi *induced pluripotent stem cell (iPSC)* yang dikombinasikan dengan metode kultur sel *3D hanging drop* memiliki potensi yang sangat tinggi dalam penanganan penyakit genodermatosis ditinjau dari aspek efisiensi dan keamanan berdasarkan profil keunggulan

karakteristik koreksi secara genetik dengan mengganti jaringan yang mengalami mutasi dengan jaringan yang telah diprogram ulang. *iPSC* juga berpotensi sebagai sarana pemodelan mekanisme penyakit dan skrining obat baru dalam penanganan genodermatosis.

### SARAN

Perlu adanya penelitian lebih lanjut dalam aspek implementasi *induced pluripotent stem cell (iPSC)* berbasis metode kultur sel *3D hanging drop* sebagai terapi genodermatosis generasi baru.

### UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis menyadari bahwa terdapat beberapa pihak yang membantu dalam penyusunan *literature review* ini. Oleh karena itu, penulis ingin menyampaikan ucapan terimakasih kepada, Dr. Eli Halimah, MS., Apt selaku dosen pembimbing dan Rizky Abdullah, Ph.D., Apt selaku dosen mata kuliah Metodologi Penelitian Fakultas Farmasi Universitas Padjadjaran.

### KONFLIK KEPENTINGAN

Penulis menyatakan tidak terdapat potensi konflik kepentingan dengan kepenulisan dan atau publikasi *literature review* ini.

### DAFTAR PUSTAKA

1. Aravindha NB, Rajesh E, Kruppa J, Gnananandar G. 2015. Genodermatoses. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences* 7(1):203-206.

2. James WD, Elston DM, Berger TG. 2011. *Andrews' Diseases of the Skin Clinical Dermatology 11<sup>th</sup> Edition*. London: Saunders.p.542-78.
3. Khavari PA, Rollman O, Vahlquist A. 2002. Cutaneous Gene Transfer for Skin and Systemic Diseases. *Journal of Internal Medicine* 252(2):1-10.
4. Tadini G, Brena M, Carlo. 2015. *Atlas of Genodermatoses, 2<sup>nd</sup> Edition*. Milan : CRC Press. p.56.
5. Adisty D, Zulkarnain I. 2016. Studi Retrospektif : Insidensi dan Penatalaksanaan Genodermatosis. *Periodical of Dermatology and Venereology* 28(2):35–41.
6. Pramuningtyas R, Yuniar K, Widhiati S, Julianto I, Kariosentono H. 2012. Pola Penyakit Kulit dan Kelamin pada Anak di Bawah 14 Tahun di RS Dr.Moewardi Surakarta. *Media Dermato Venerologica Indonesiana (MDVI)* 39(1):19-23.
7. Tanojo H, Yenny SW. 2012. Terapi Gen Untuk Genodermatosis. *Media Dermato Venerologica Indonesiana (MDVI)* 39(1):134-140.
8. Itoh M, Arao NU, Guo Z, Liu Z, Higgins C, Christiano AM. 2013. Generation of 3D Skin Equivalent Fully Reconstituted from Human Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs). *PloS ONE* 8(10):1-9.
9. Bilousova G, Roop D. 2014. Induced Pluripotent Stem Cells in Dermatology: Potentials, Advances, and

10. Yamanaka S, Takahashi K. 2016. A Decade of Transcription Factor mediated Reprogramming to Pluripotency. *Nature Molecular Cell Biology* 17(3):183-193.

11. Sreenivas D, Sreenivasa A, Satyavani S, Reddy B, Vasudevan S. 2011. Where Will the Stem Cells Lead Us? Prospects for Dentistry in the 21st Century. *Journal of Indian Society of Periodontology* 15(3): 199-204.

12. Lin, H., Otsu, M., Nakauchi, H. 2013. *Stem Cell Therapy : an Exercise in Patience and Prudence*. London : Philosophical Transactions and The Royal Society Publisher. p.137.

13. Tolar J, Xia L, Riddle MJ, Lees CJ, Eide CR, McElmurry RT, Titeux M, Osborn MJ, Lund TC, Hovnanian A, *et al.* 2011. Induced pluripotent stem cells from individuals with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Journal of Investigative Dermatology* 131(1):848–856.

14. Tolar J, Xia L, Lees CJ, Riddle M, McElroy A, Keene DR, Lund TC, Osborn MJ, Marinkovich MP, Blazar BR, *et al.* 2013. Keratinocytes from induced pluripotent stem cells in junctional epidermolysis bullosa. *Journal of Investigative Dermatology* 133(2): 562–565.

15. Featherstone C, Uitto J. 2007. Ex vivo gene therapy cures a blistering skin

disease. *Trends in Molecular Medicine* 13(1):219-222.

16. Ohta S, Imaizumi Y, Okada Y, Akamatsu W, Kuwahara R, Ohyama M, Amagai M, Matsuzaki Y, Yamanaka S, Okano H, *et al.* 2011. Generation of human melanocytes from induced pluripotent stem cells. *PloS ONE* 6(2):e16182.

17. Hewitt KJ, Shamis Y, Hayman RB, Margvelashvili M, Dong S, Carlson MW, Garlick JA. 2011. Epigenetic and phenotypic profile of fibroblasts derived from induced pluripotent stem cells. *PloS ONE*. 6(2):e17128.

18. Osborn MJ, Starker CG, McElroy AN, Webber BR, Riddle MJ, Xia L, DeFeo AP, Gabriel R, Schmidt M, von Kalle C, *et al.* 2013. TALEN-based gene correction for epidermolysis bullosa. *Molecular Therapy* 21(3):1151–1159.

19. Pampaloni F, Reynaud EG, Stelzer EH. 2007. The Third Dimension Bridges the Gap Between Cell Culture and Live Tissue. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8(2):839–845.

20. Friedrich J, Ebner R, Kunz-Schughart L.A. 2007. Experimental Anti-tumor Therapy in 3-D: Spheroids – Old Hat or New Challenge? *International Journal of Radiation Biology* 83(1):849–871.

21. Lin RZ, Chang HY. 2008. Recent Advances in Three Dimensional Multicellular Spheroid Culture for Biomedical Research. *Journal of Biotechnology* 3(5):1172–1184.

22. Takayama S, Tung Y, Hsiao A, Allen S, Torisawa Y, Ho M. 2011. High-throughput 3D Spheroid Culture and Drug Testing Using a 384 Hanging Drop Array. *Journal of Royal Society of Chemistry* 136(3):473-478.