

İnsan embriyonik kök hücreleri ve mikroçevre

Human embryonic stem cells and microenvironment

Banu İskender^{1,3}, Kenan İzgi^{2,3}, Salih Şanlıoğlu⁴, Halit Canatan^{1,3}

ÖZET

İnsan embriyonik kök hücreleri (iEKH) pluripotent özellikleri ile sınırsız çoğalıp kendi kendilerini yenileyebilirken, üç embriyonik tabakayı temsil eden hücrelere farklılaşabilme yetenekleri ile rejeneratif tıp alanında büyük ilgi uyandırmışlardır. Genellikle mitotik olarak inaktive edilmiş fare besleyici hücreleri ile büyütülseler de, türler arası kontaminasyon riskini ortadan kaldırmak için insan kökenli besleyici hücrelerin kullanıldığı in vitro kültür sistemleri de bulunmaktadır. Son dönemde geliştirilen kültürlerde iEKH'nin besleyici hücre ile birebir temasına gerek olmadığı, ancak hücre tutunmasını sağlayan substratın varlığının uzun süreli, etkin in vitro iEKH'nin kültürü için gerekli olduğu ileri sürülmüştür. Bu substrat çoğunlukla in vivo mikroçevrenin de bir parçası olan ekstrasellüler matriks moleküllerinden biri ya da birkaçının karışımı olabilmektedir. İEKH biyolojisinde ekstrasellüler matriks molekülleriyle etkileşim, hücrelerin kısa süreli ve geçici in vivo mikroçevre ile interaksyonu nedeniyle şimdiki kadar ihmal edilen bir alan olarak kalmıştır. Ancak ekstrasellüler matriks molekülleriyle oluşturulacak bir in vitro kültür sistemi, besleyici hücrelerin kullanıldığı geleneksel kültür sistemlerine nazaran güvenli bir alternatif oluşturarak, 'İyi Üretim Uygulamaları (GMP)' standardında tedaviye yönelik iEKH'nin üretiminin yolunu açacaktır. Bu nedenle iEKH'nin geniş çaplı üretiminin, iş yükünü en aza indirecek şekilde yapılabilmesi için gerekli in vitro kültür standartlarının oluşturulması, iEKH'nin ekstrasellüler matriks molekülleriyle ilişkilerinin araştırılmasına bağlıdır. Böylelikle hem pluripotent özelliği kontrol eden mekanizmalar hakkında önemli bilgi edinilirken hem de gelecekteki tedaviye yönelik olası uygulamalarda kullanılacak iEKH'nin yönlendirilmiş farklılaşmasını sağlayan sinyal yolları tanımlanabilecektir.

Anahtar kelimeler: İnsan embriyonik kök hücreleri, ekstrasellüler matriks, pluripotent özellik, in vitro kültür sistemleri.

Kısaltmalar: iEKH; insan embriyonik kök hücreleri, ICM; iç hücre kitlesi, GMP; iyi üretim uygulamaları, TGF- β ; dönüştürücü büyüme faktörü- β , FGF-2; fibroblast büyüme faktörü-2, FAK; focal adezyon kinaz, PI-3K/Akt; Fosfatidilinozitol-3' kinaz/Akt, ERK; ekstrasellüler sinyalle düzenlenen kinaz, GSK-3 β ; glikojen sentez kinaz-3 β , IGF; insülin benzeri büyüme faktörü,

ABSTRACT

Human embryonic stem cells (hESCs) possess a great potential in the field of regenerative medicine by their virtue of pluripotent potential with indefinite proliferation capabilities. They can self renew themselves and differentiate into three embryonic germ layers. Although they are conventionally grown on mitotically inactivated mouse feeder cells, there are in vitro culture systems utilizing feeder cells of human origin in order to prevent cross-species contamination. Recently established in vitro culture systems suggested that direct interaction with feeder cells is not necessary but rather attachment to a substrate is required to ensure long-term, efficient hESC culture in vitro. This substrate is usually composed of a mixture of extracellular matrix components representing in vivo natural niche. In hESC biology, the mechanism of interaction of hESCs with extracellular matrix molecules remained insufficiently explored area of research due to their transient nature of interaction with the in vivo niche. However, an in vitro culture system established using extracellular matrix molecules may provide a safer alternative to culture systems with feeder cells while paving the way to Good Manufacturing Practice-GMP production of hESCs for therapeutic purposes. Therefore, it is essential to study the interaction of extracellular matrix molecules with hESCs in order to standardize in vitro culture systems for large-scale production of hESCs in a less labor-intensive way. This would not only provide valuable information regarding the mechanisms that control pluripotency but also serve to dissect the molecular signaling pathways of directed differentiation for prospective therapeutic applications in the future. *J Clin Exp Invest* 2014; 5 (3): 486-495

Key words: Human embryonic stem cells, extracellular matrix, pluripotency, in vitro culture systems.

Abbreviations: hESCs; human embryonic stem cells, ICM; inner cell mass, GMP; good manufacturing practice, TGF- β ; transforming growth factor- β , FGF-2; fibroblast growth factor-2, FAK; focal adhesion kinase, PI-3K/Akt; phosphatidylinositol 3' -kinase-Akt, ERK; extracellular regulated kinase, GSK-3 β ; glycogen synthase kinase-3 β , IGF; insulin-like growth factor.

¹ Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Bilimleri Bölümü Tıbbi Biyoloji AD, Kayseri, Türkiye

² Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Bilimleri Bölümü Klinik Biyokimya AD, Kayseri, Türkiye

³ Erciyes Üniversitesi Betül-Ziya Eren Genom ve Kök Hücre Merkezi, Kayseri, Türkiye

⁴ Akdeniz Üniversitesi, Gen ve Hücre Tedavi Merkezi, Antalya, Türkiye

Correspondence: Banu İskender,

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ABD, 38039, Melikgazi, Kayseri, Türkiye Email: banu.iskender@yahoo.com

Received: 30.04.2014, Accepted: 26.08.2014

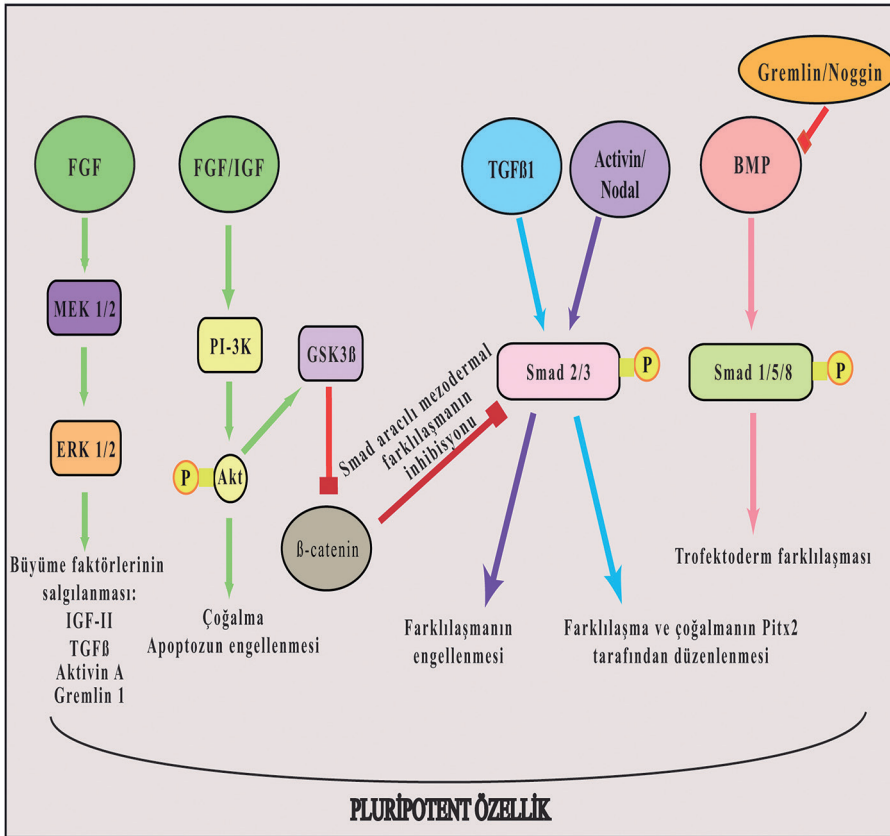
Copyright © JCEI / Journal of Clinical and Experimental Investigations 2014, All rights reserved

GİRİŞ

İnsan embriyonik kök hücreleri pre-implantasyon embriyoda gelişen iç hücre kitlesi (Inner Cell Mass-ICM)'nden elde edilirler ve sınırsız bölünme özellikleri ile üç farklı embriyonik tabaka (endoderm, mezoderm ve ektoderm)'yı temsil eden hücelere farklılaşabilme potansiyelleri ile tanımlanırlar. Bu hücreleri sayısız bölünme kapasitesi ile bir anlamda ölümsüz kılan ve farklılaşma yeteneği ile diğer hücre tiplerinden ayıran bu özellik 'pluripotent özellik' olarak bilinir [1,2]. Embriyonik kök hücrelerin farklılaşma kapasiteleri in vivo olarak teratoma oluşumu ve in vitro olarak embryoid cisimcik (Embryoid body-EB) oluşumu ile gösterilir. Kendi kendini yenileyebilme (self-renewal) ve farklılaşma potansiyelleri ile embriyonik kök hücreler, gelişimin erken aşamalarının moleküler mekanizmalarının çalışılması, ilaç üretilmesi, toksisite testleri ve olası terapötik uygulamalar için umut vadeden özel bir hücre grubudur [3-5].

Bir embriyonik kök hücrenin kendini yenileme özelliği iki farklı tipte hücre bölünmesi gösterme

yeteneğine bağlıdır. Simetrik hücre bölünmesi ile embriyonik kök hücre karakteri taşıyan aynı iki yavru hücre oluşturabilirken, asimetric hücre bölünmesi ile birbirinden farklı tipte yavru hücreler üretebilir. Asimetric hücre bölünmesi sonucu oluşan yavru hücrelerden biri embriyonik kök hücre özelliğini taşıırken diğeri farklılaşma özelliği gösteren projenitör hücreleri oluşturur [6-8]. Embriyonik kök hücrelerin kendilerini yenileyebilmeleri ya da farklılaşma yönüne gidecek projenitör hücreleri üretmeleri kök hücre kimliğini yönlendiren sinyalleri üreten mikroçevreye ya da 1978 yılında Schofield'in terminolojiye kazandırdığı ifade şekliyle, 'kök hücre nişi'ne bağlıdır [9, 10]. Her ne kadar insan embriyonik kök hücreleri benzer morfoloji ve gen ekspresyon düzenine sahipse de, varolan ve derivasyonu gerçekleştirilen insan embriyonik kök hücre dizilerinde, köken aldıkları iç hücre kitlelerinin farklı oluşu nedeniyle birçok farklılık ortaya çıkmaktadır [1,11-14]. Henüz insan embriyonik kök hücreleri için en uygun (optimal) kültür koşullarının da belirlenememiş olması nedeniyle hücre dizilerindeki farklılıklar çevresel faktörlerce de desteklenerek giderek artmaktadır [15].



Şekil 1. İnsan embriyonik kök hücreleri (iEKH)'nin pluripotent özelliğini etkileyen, şimdiye kadar tanımlanabilmiş büyüme faktörü aracılı sinyal mekanizmalarının şematik gösterimi. Oklar aktive edilen hücre içi elemanları, küt uçlu oklar ise inhibisyon mekanizmalarını göstermektedir.

İEKH rutin olarak fibroblast besleyici hücreleri ile ko-kültür ortamında ya da besleyici hücre kullanılmadığı takdirde hücre yapışmasını ve yayılmasını destekleyecek şekilde düzenlenen, bir ya da birkaç ekstrasellüler matriks bileşeni üzerinde ve seçilen kültür tipine göre besiyerine farklı büyüme faktörü karışımları eklenerek kültüre ediliyorlar [2,16]. İEKH'in pluripotent özelliklerinin korunması için gerekli faktörlerin kültür şartlarına göre değişmesi ve henüz pluripotent özelliğin moleküler mekanizmasının anlaşılammış olması İEKH'nin tedaviye yönelik etkin kullanımı için aşılması gereken en büyük engellerin başında gelmektedir. Farklı organizmalardan elde edilen embriyonik kök hücrelerle yapılan çalışmalar sonucunda belirlenen intrinsik ve ekstrinsik faktörler arasındaki etkileşimin İEKH'nde farklılaşma ve kendini yenileme (self-renewal) arasındaki dengeyi sağladığı bilinmekle birlikte, bu dengeyi sağlayan evrensel bir mekanizmanın varlığı henüz ortaya konulamamıştır [17-19] (Şekil 1). Embriyonik kök hücrelerin farklılaşacakları hücre tipleri ya da kendini yenileyebilme özellikleri intrinsik faktörler kadar hücrenin bulunduğu mikroçevre koşullarından da etkilenmektedir. Şimdiye kadar tanımlanmış olan karaciğer, pankreas, sinir sistemi ve kan dokularına ait erişkin kök hücre nişlerinde mikroçevre elemanlarının kök hücre davranışı üzerindeki etkileri gösterilmiştir [20,21]. Bu nedenle, mikroçevre ve ekstrasellüler matriks moleküllerinin embriyonik kök hücre kaderini belirleyen mekanizmaları ne yönde etkilediğinin araştırılması, hem yabancı patojen ve antijenden arındırılmış in vitro kültür sistemlerinin geliştirilmesi(xeno-free sistemler), hem de embriyonik kök hücrelerin rejeneratif tıp alanındaki kullanım yolunun açılması açısından büyük önem taşımaktadır.

İnsan embriyonik kök hücre kültürü

İEKH'nin derivasyonu, iç hücre kitlesi (Inner Cell Mass: ICM)'nin immünolojik ya da mekanik yöntemle trofektodermin epidermal hücrelerinden ayrılması ve besleyici hücreler ya da özel substratlar üzerine transferi ile gerçekleştirilir [1,22]. İzole edilen İEKH, mitotik olarak inaktive edilmiş fare embriyonik fibroblastları (Mouse Embryonic Fibroblast: MEF) üzerinde minimum farklılaşma ile uzun süreli kültüre edilebilirler [23,24]. Bu yöntem kök hücre araştırmalarında geleneksel metot olarak kabul edilmekle birlikte, yüksek kontaminasyon riski ile oluşturulacak embriyonik kök hücrelerin tedaviye yönelik kullanılma ihtimaline engel olduğu için son dönemde araştırmacılar alternatif kültür ortamlarına yönelmiştir [25]. Primer MEF hücrelerinin diğer

bir dezavantajı ise sınırlı proliferasyon kapasiteleri ve hücrelerin yaşlanmasıyla birlikte geç pasajlarda İEKH'nin kültürünü desteklememeleridir [26]. Besleyici hücre kültür stok farklılıkları yine embriyonik kök hücre kültürü için standart in vitro kültür şartlarının sağlanmasını engellemekte ve izole edilmiş insan embriyonik kök hücre dizileri arasında katlanarak artan farklılıklara yenilerini eklemektedir [27].

MEF besleyici hücrelerine alternatif olarak ilk aşamada erişkin ya da fetal kökenli insan besleyici hücreleri kullanılmıştır. Fetal kas ve deri hücreleri, sünnet derisi fibroblastları, erişkin fallop tüpü epitel hücreleri, plasenta fibroblastları, amniyotik epitel hücreler, göbek kordonu hücreleri ve koryonik plak hücrelerinin de aralarında bulunduğu bu besleyici hücreler insan embriyonik kök hücrelerin uzun süreli, stabil kültürünü desteklemiştir [28-35]. İnsan kökenli besleyici hücreler kullanılarak yalnızca uzun süreli insan embriyonik kök hücre kültürü değil aynı zamanda yeni insan embriyonik kök hücre dizilerinin derivasyonu da gerçekleştirilmiştir [36-38]. İEKH'i insan kökenli besleyici hücreleri üzerinde de MEF hücrelerindeki kadar etkin bir şekilde üretilmiş olmalarına rağmen, hücre kültür stoklarında dönem dönem gözlemlenen varyasyonlar ve hücrelerin yaşlanması bu in vitro kültür sisteminde de sorun teşkil etmektedir. Besleyici hücre kültürünün eskimesi ve buna bağlı olarak bu hücrelerin insan embriyonik kök hücre pluripotent özelliğini destekleme yeteneklerini yitirmelerini önlemek amacıyla bazı gruplar tarafından genetik manipulasyonla ölümsüzleştirilen (immortal) insan sünnet derisi ve plasenta stroma fibroblastları gibi besleyici hücreler de kullanılmıştır [39,40].

İnsan embriyonik kök hücrelerinin spontan olarak farklılaştırılmasından elde edilen otolog besleyici hücrelerinin de İEKH'nin kültüründe pluripotent özelliğin korunmasını desteklediği gözlemlenmiştir [41]. Böylelikle otojenik besleyici hücrelerin kullanımı ile in vitro insan embriyonik kök hücre kültürlerinde hem konuk patojen hem de allojenik kontaminasyon önlenerek insan embriyonik kök hücre kültürü genotipik olarak homojen bir sistemde gerçekleştirilmiş olur [22,42,43]. Otojenik besleyici hücrelerden elde edilen şartlandırılmış besiyerinin besleyici hücre yokluğunda dahi uzun süreli insan embriyonik kök hücre kültürünü desteklediği bilinmektedir [42-44]. Otojenik hücreler, fareden elde edilen besleyici hücrelere nazaran daha güvenli bir alternatif oluştursa da, homojen besleyici hücre popülasyonu elde etmek için ileri düzeyde karakterizasyon yapılması gerektiğinden in vitro embriyonik kök hücre kültürü için pratik bir çözüm oluşturmamaktadır.

İn vitro insan embriyonik kök hücre kültürü standardizasyon çalışmalarında göze çarpan son yaklaşım, besleyici hücrelerin ortamdan uzaklaştırılarak, bu hücrelerden kaynaklanabilecek varyasyon ihtimalini ortadan kaldırmak ve bu hücrelerin tedaviye yönelik kullanılması için güvenli kültür koşullarını geliştirmeye dayanmaktadır. Bilindiği üzere, besleyici hücreler iEKH'nin tutunup büyüebilecekleri fibril yapıları oluşturmakla kalmaz aynı zamanda ekstrasellüler ortama salgıladıkları çözünebilir faktörlerle de pluripotent özelliğinin devamını sağlayan sinyal mekanizmalarını tetiklerler. Bu nedenle, in vitro besleyici hücre kültür koşulları hazırlanırken iEKH'nin besleyici hücrelerle etkileşiminin yokluğunda fibroblast büyüme faktörü-2 (FGF-2), insülin, transferrin, dönüştürücü büyüme faktörü- β (TGF- β) gibi büyüme faktörlerine olan ihtiyaçları göz önünde bulundurulmuştur. Aynı zamanda hücrelerin iki boyutlu kültürü için yüzeye tutunmalarını sağlayacak uygun ekstrasellüler matriks molekülünün seçilmesi zorunlu hale gelmiştir [45,46]. Bu alandaki ilk çalışmalar 2005 yılında Klimanskaya ve arkadaşları tarafından fare embriyonik fibroblast besleyici hücrelerden elde edilen ekstrasellüler matriksin iEKH'nin kültüründe kullanılmasıyla başlamıştır [16]. Sonraki çalışmalarda, yalnızca fare embriyonik fibroblastlardan elde edilen ekstrasellüler matriksin değil aynı zamanda insan sünnet derisi, dermal ve plasental fibroblastlar gibi çeşitli insan kökenli besleyici hücreler ve otojenik besleyici hücrelerden elde edilen ekstrasellüler matrikslerin de uzun süreli in vitro iEKH'nin kültürünü desteklediği gösterilmiştir [47-50]. Tüm bu çalışmalar insan embriyonik kök hücre kültürü için besleyici hücrelerle birebir etkileşimin gerekli olmadığı ve çeşitli büyüme faktörleriyle desteklenen uygun ekstrasellüler matriks ortamının pluripotent kök hücre kültürünü desteklemek için yeterli olduğu fikrini kuvvetlendirmiştir. Bu aşamadan sonra birçok çalışma insan ve fare besleyici hücreler tarafından üretilen hangi bileşen ya da bileşenlerin besleyici hücrelerden yoksun ortamda pluripotent özelliğinin devam ettirilmesi için gerekli olduğunun araştırılması doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Özellikle insan embriyonik kök hücre kültüründe fare embriyonik fibroblastlar ve insan neonatal fibroblastlar kullanılarak hazırlanan şartlandırılmış besiyerlerinde kollajen I, III, VI, nidogen-2, fibronektin ve fibulin-1 gibi çoğunluğu fibriller yapıdaki ekstrasellüler matriks moleküllerinin varlığı tespit edilmiştir [51-53]. İnsan deri ve sünnet derisi fibroblastları ile fare embriyonik fibroblastlarından elde edilen ekstrasellüler matrikslerin tümünün proteomik

değerlendirilmesi sonucunda fibronektin, kollajen I, VI ve XII ve heparan sülfat proteoglikanların ortak moleküller olduğu tanımlanmıştır [54]. Aynı şekilde otojenik besleyici hücrelerden elde edilen ekstrasellüler matriksin de fibronektin, lamininler ve kollajen VI bakımından zengin olduğu gösterilmiştir [55]. Hayvan ve insan besleyici hücrelerinden elde edilen matriksler dışında ilk sınırlı sayıda ekstrasellüler matriks molekülü içeren sistem 2001 yılında Xu ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır. Bu çalışmada Xu ve arkadaşları (2001), Engelbreth-Holm-Swarm fare sarkomasından elde edilen ve Matrigel olarak bilinen bazal membran preparasyonunun fare embriyonik fibroblastlardan elde edilen şartlandırılmış (conditioned) besiyeri ile birlikte iEKH'nin pluripotent özelliğini in vitro kültür sisteminde koruduğunu göstermişlerdir [13]. Bilindiği üzere Matrigel, kollajen IV, nidogen-1, heparan sülfat proteoglikan ve laminin açısından zengin bir ekstrasellüler matriks karışımıdır [56]. Tüm bu çalışmalardan çıkarılan sonuç, iEKH'nin in vitro kültürünü destekleyen hücrelerden elde edilen materyallerde tanımlanan bileşenlerin besleyici hücre tipinden bağımsız olarak benzer oluşudur. Yapılan birçok proteomik çalışma sonucunda seçilen ekstrasellüler matriks molekülleri iEKH'nin kültürünü optimize etmek, besleyici hücrelerle teması ortadan kaldırmak ve 'iyi üretim uygulamaları (Good Manufacturing Practice-GMP)' düzeyinde kök hücre üretimi sağlamayı hedeflemektedir. Bu konudaki ilk girişimlerde uzun süreli pluripotent hücre kültürü ve derivasyonu, fibronektin, vitronektin ve laminin-511 gibi tek tip ekstrasellüler matriks substratı kullanılarak gerçekleştirilmiştir [57-62]. Daha az yaygın olmakla birlikte, kollajen I, fibrillin-1, CD90 ve CD105'in substrat olarak kullanıldığı çalışmalar da bulunmaktadır [62-64]. Ancak, genetik köken olarak birbirinden farklı iEKH'nin, çeşitli büyüme faktörü kokteylleri ve farklı tutunma substratları ile pluripotent özelliği nasıl korudukları henüz tam anlamıyla açıklanamamış değildir (Tablo 1).

iEKH'nin pluripotent özelliği için evrensel bir yolağın bulunamamış olması, farklı tipte besleyici hücreler, kültür koşullarındaki değişimler iEKH'nin dizilerinde heterojeniteye yol açmaktadır. Bir laboratuvarında kullanılan insan kök hücresi kültür teknikleri çoğu zaman başka bir laboratuvarında izole edilen iEKH dizilerine uygulanamamaktadır. Bu hücrelerin terapötik amaçlı kullanılabilmesinin sağlanabilmesi için kültür koşullarının standardizasyonu zaruri ihtiyaç haline gelmiştir.

Tablo 1. Şimdiye kadar insan embriyonik kök hücreleri (iEKH)'nin besleyici hücreless ortamda büyütülmeleri için kullanılan ekstrasellüler matriks bileşenleri ve besiyeri içerenleri

EKSTRASELLÜLER MATRİKS MOLEKÜLÜ	BESİYERİ İÇERİĞİ	KAYNAK	İEKH KÜLTÜRÜ
Matrigel	MEF'lerden elde edilen 'şartlandırılmış besiyeri': -80% KO -DMEM -20% KO -SR -1 mM l-glutamin -1 mM beta-merkaptetanol -1% esansiyel olmayan amino asitler -8 ng/ml bFGF	Xu ve ark. 2001	+
Heparan Sülfat Proteoglikan	-50:50 F12:DMEM -0.1% BSA -100 mM β- merkaptetanol -1% esansiyel olmayan amino asitler -2 mM l-glutamin -1% N2 -1% B27 -100 ng/ml Ak tivin A -20 ng/ml FGF2 -2 ng/ml NT4 (*)	Abraham ve ark. 2010; Soteriou ve ark. 2013 (*)	+
Laminin -511	Kimyasal olarak tanımlanmış O3 besiyeri (mTeSR1 besiyerinin bir türevi) (*)	Rodin ve ark. 2010 (*); Steiner ve ark. 2010;	+
Laminin -111	MEF'lerden elde edilen 'şartlandırılmış besiyeri': -80% KO -DMEM -20% KO -SR -1 mM l-glutamin -0.1 mM β-merkaptetanol -1% esansiyel olmayan amino asitler -5 ng/ml bFGF (*)	Miyazaki ve ark. 2008 (*); Rodin ve ark. 2010	+
Vitronektin	-Glutamax -based DMEM -Ham's F -12 -15% KSR -100µM β-merkaptetanol -1% esansiyel olmayan amino asitler -4 ng/ml bFGF (*)	Braam ve ark. 2008 (*); Prowse ve ark. 2010	+
Kollajen I	Embryonik germ hücrelerinden elde edilen 'şartlandırılmış besiyeri': -KO -DMEM -10% KO -SR -10% Plasmanate® -2 mM L-glutamin -0.1 mM esansiyel olmayan amino asitler -1 mM sodyum pirüvat -0.1 mM β-merkaptetanol -8 ng/ml bFGF	Jones ve ark. 2010	+
Fibronektin	-85% KO -DMEM -15% SR -2 mM l-glutamine -0.1 mM β-merkaptetanol -1% esansiyel olmayan amino asitler -4 ng/ml TGFβ1 -4 ng/ml bFGF (*)	Amit ve ark. 2004 (*); Baxter ve ark. 2009	+
Fibrillin -I	-50:50 F12:DMEM -0.1% BSA -100 mM β- merkaptetanol -1% esansiyel olmayan amino asitler -2 mM l-glutamin -1% N2 -1% B27 -100 ng/ml Ak tivin A -20 ng/ml FGF2 -2 ng/ml NT4	Soteriou ve ark. 2013	+

İEKH-ekstrasellüler matriks etkileşimleri

Ekstrasellüler matriks molekülleri İEKH için fiziksel destek sağlayan bir zemin oluşturmakla kalmayıp

aynı zamanda hücre dışı ortamdan hücre içine sinyal iletimine aracılık ederler. Ekstrasellüler matriksle tutulum yalnızca hücrelerin morfolojisini etkilemekle

kalmaz, aynı zamanda aktin organizasyonunu da değiştirerek farklılaşmayı, apoptozu, hücre göçü ve hücre çoğalmasını yönlendirecek olan gen ifadesini de düzenler [65,66]. İntegrinler hücre-ekstrasellüler matriks etkileşimine aracılık eden başlıca reseptör grubudur [67]. Enzimatik aktivite yetenekleri olmadığından birçok hücre içi sinyal iletili molekül ve adaptör proteinleri kullanarak hücre dışından gelen sinyalleri çekirdeğe iletirler [25]. Heterodimer reseptör grubuna ait olup, çoğunlukla birden fazla ekstrasellüler matriks bileşeniyle temasta bulunarak hücre içi sinyal mekanizmalarını karmaşık bir biçimde yönetirler [68]. Örneğin $\alpha\beta3$ vitronektin reseptörü olarak tanınmasına karşın, fibronektin, laminin ve tenaskinin de içinde bulunduğu farklı ekstrasellüler matriks moleküllüyle etkileşebilir [69]. Dahası, integrin konformasyonları ligand bağlanması sonucu ve hücrenin liganda cevabı ile düşük ve yüksek affiniteli durumlar arasında geçiş halindedir [70-72]. Hücrenin integrin-ekstrasellüler matriks etkileşimine cevabı sonucunda integrin reseptörlerinin bölgesel yoğunluğu, hücre membranı üzerindeki dağılımları ve sonuç olarak ligandla integrin reseptörleri arasındaki yapışkan bağların sayısı değişebilir [73,74]. Bu durum hücrenin söz konusu ekstrasellüler matriks molekülüne bağlanma kuvvetini etkiler ve hücre aynı integrin reseptörü ile bağlandığı farklı substratlara farklı tepkiler verebilir [75].

İEKH'nde bulunan integrin reseptörlerin tümü henüz tanımlanamamıştır ve bugünkü bilgilerimiz genel gen ifadesinden elde edilen bilgilere ve ekstrasellüler matriks molekülleriyle insan embriyonik kök hücrelerin etkileşimini araştıran çalışmalara dayanmaktadır [58,59,76]. Özellikle besleyici hücre kullanılmayan in vitro kültür sistemlerinde iEKH'ndeki integrin dağılımının belirlenmesi hücre içi sinyal mekanizmalarının tespiti açısından önemlidir. Şimdiye kadar iEKH'nin kültüründe kullanılan laminin, vitronektin ve fibronektin gibi substratların birbirinden bağımsız integrin reseptörleri kullandıkları bilinmektedir [57-62]. Farklı integrinlerle etkileşim sonucu ortak bir hücre içi sinyal mekanizmasının ya da alternatif mekanizmaların devreye girerek pluripotent özelliğin uzun süreli kontrolünü sağladığı düşünülmektedir. Son dönemde yapılan çalışmalarda besleyici hücrelerle olan kültür sistemlerinde, etkin bir in vitro sistem oluşturulabilmesi için iEKH ile besleyici hücrelerde uygun integrinlerin bulunması gerektiği gösterilmiştir [77-79]. Bu yüzden, hücrelerdeki integrin reseptörlerinin ve buna bağlı sinyal yollarının tanımlanması pluripotent özelliğin uzun süreli korunumu ve uygun in vitro kültür şartlarının oluşturulabilmesi için gereklidir.

Pluripotent özelliği kontrol eden hücre içi sinyal mekanizmaları

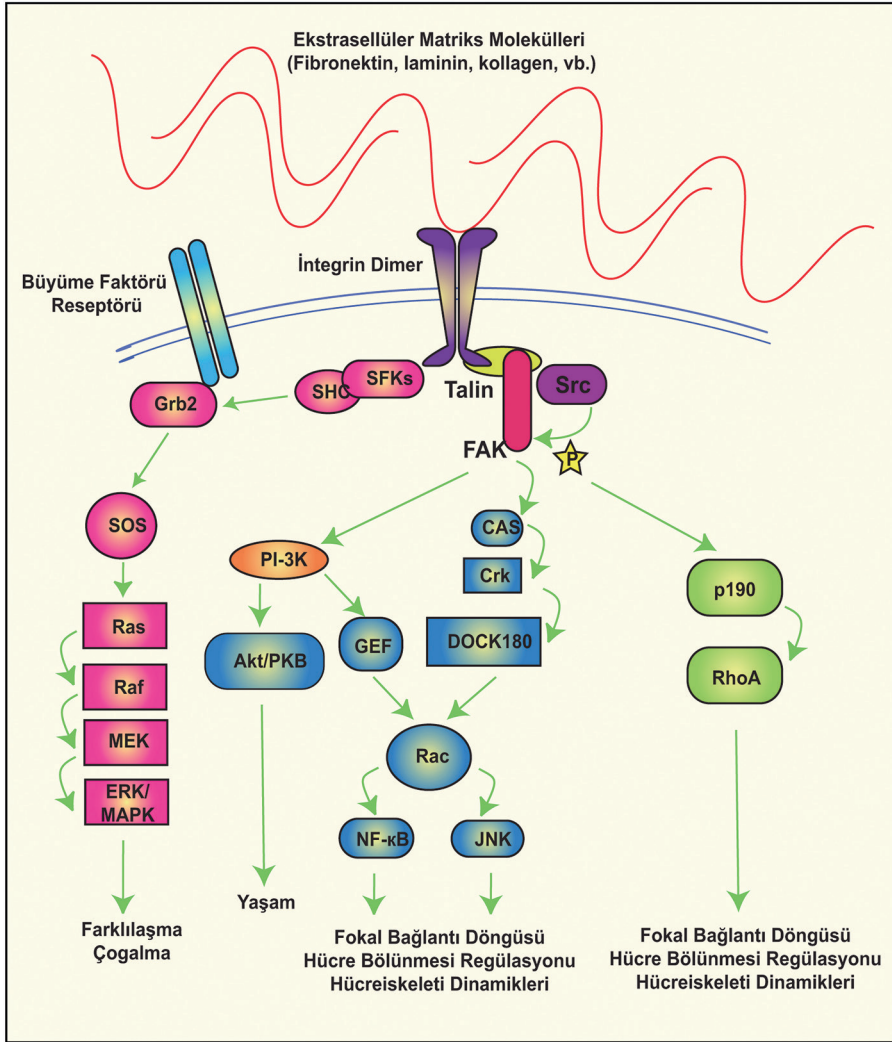
Ekstrasellüler matriksle etkileşim sonucu embriyonik kök hücrelerin substratla reseptör bağlantı kuvvetinin değiştiği ve bu durumun iEKH'nin farklılaşma ya da kendi kendini yenileme kararını etkilediği bilinmektedir [16,80]. Hücrelerin integrin aracılığıyla ekstrasellüler matrikse bağlanmasının, integrinin sitoplazmik bölümünde konformasyon değişikliğine neden olduğu ve bu değişikliğin adezom organizasyonu ile adaptör molekülleri hücre membranına çektiği bilinmektedir [81, 82]. İntegrinle tutunma sonrası fokal adezyon kinaz (FAK), Tyr-397 domaininden otofosforilasyona uğrayarak, Src Kinaz için yüksek afiniteli bağlanma bölgesi oluşturur [81,83]. Substratla bağlantı sonucu integrin dağılımının artışı, Src kinaz konsantrasyonunu artırarak, molekülün sabit aktif forma dönüşmesine neden olur. Aktif hale geçen Src kinaz, FAK'ı bilinen beş farklı tirozin rezidüsünden (Tyr-407, Tyr-576, Tyr-577, Tyr-861 ve Tyr-925) daha fosforilasyona uğratar [84,85]. Fibronektinin birçok hücre sisteminde PI-3K/Akt ve MEK-ERK sinyal mekanizmalarını aktive ettiği bilinmektedir ve embriyonik kök hücre kültürlerinin PI-3K'e bağlı sinyal ağı ile pluripotent özelliği koruyabilir olabileceği gösterilmiştir [86,87]. Yapılan son çalışmalarda pluripotent özelliğin ve farklılaşmamış embriyonik kök hücre yapısının PI-3K/Akt ve Smad 2/3 sinyal yollarının ortak ürünü olduğu ve bu sinyal mekanizmaları arasındaki dengenin kaybolmasının iEKH'ni farklılaşmaya yönlendireceği öngörülmüştür. Artan PI-3K/Akt ekspresyonunun Raf/MEK/ERK aktivitesini baskılayarak yüksek GSK-3 β ve düşük β -katenin aktivitesine neden olduğu ve bu düşük β -katenin aktivitesinin Activin-A/Smad 2-3 aracılı mezoderm gen ekspresyonunu baskıladığı düşünülmektedir [88]. Yine fibronektin aracılığıyla ERK 1/2 ve Akt fosforilasyonunun fare embriyonik kök hücrelerinde hücre büyümesini etkilediği gösterilmiştir [89].

Aktivin/Nodal, Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF), Insulin Benzeri Büyüme Faktörü (IGF) ve Wnt gibi birçok hücre dışı sinyal mekanizmasının iEKH'nin pluripotent özelliğini etkilediği bilinmekle birlikte, bu sinyal mekanizmalarının çoğu tam olarak tanımlanamamış kültür koşullarında çalışıldığı için iEKH'nin kaderini ne şekilde etkiledikleri tam olarak ortaya konulamamıştır [90-92]. Bu durum farklı laboratuvar şartlarında birbiriyle çelişen sonuçların alınmasına neden olmuştur. Örneğin, Singh ve arkadaşlarının düşük ERK aktivitesinin iEKH'nin pluripotent özelliğini desteklediği savına karşın, farklı gruplar yüksek ERK aktivitesinin farklılaşmamış hücre kültürü için gerekli olduğunu savunmuşlar-

dır [86,88,93]. Ekstrasellüler matriks proteinleri ile bağlantı sonucu aktive olan ve pluripotent özelliğin devam ettirilmesiyle bağlantılı olduğu düşünülen sinyal yolları şekilde özetlenmiştir (Şekil 2).

İEKH'nin süspansiyon halinde üretilmesine ilişkin sınırlı sayıda çalışma vardır ancak bu hücrelerin

besleyici hücre bulunmayan kültür sistemlerinde bir substrata bağlanma gereksinimleri olduğu gözlenmiştir [60,94]. İEKH'nin ekstrasellüler matriksten kopmaları ve koloni yapılarının bozulması apoptozu tetikleyerek hücrelerin yaşamı ve farklılaşma potansiyelleri açısından olumsuz etki yaratır [95,96].



Şekil 2. Laminin, kollajenler ve fibronektin gibi ekstrasellüler matriks molekülleriyle etkileşim sonucu aktive olan sinyal mekanizmalarından bazıları. Büyüme faktörleriyle aktive olan bazı sinyal mekanizmalarının integrin reseptörler aracılığıyla da aktive edildiği bilinmektedir. Ekstrasellüler matriks bağlantılı sinyal sisteminde ana modülün Src/FAK kompleksi olduğu ve bu kompleksin aracılık ettiği sinyal iletiminin çoğalma, farklılaşma, hücre yaşamı, göçü ve polaritesini etkilediği gösterilmiştir.

SONUÇ

İnsan embriyonik kök hücre derivasyonu ve üretiminde karşılaşılan başlıca sorun pluripotent özelliğin mekanizmasının tam olarak aydınlatılamamış olması ve buna bağlı olarak standart kültür şartlarının oluşturulamamasıdır. Şimdiye kadar birbirinden bağımsız gruplarca İEKH'nin kültürü başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiş olsa da, oluşturulan İEKH'nin farklılaşma potansiyellerinde görülen değişiklikler genetik heterojenitenin de etkisiyle giderek artmak-

tadır. Teorik olarak ekstraembriyonik dokular hariç tüm vücut dokularını oluşturabilecek potansiyelde olan bu hücre dizilerinde çevresel etmenlerce oluşturulan bu farklılıklar, İEKH'nin tedaviye yönelik kullanılması önünde en büyük engeldir. Tüm bu bilgiler ışığında, pluripotent özelliği kontrol eden tüm intrinsik ve ekstrinsik faktörler göz önünde bulundurularak geliştirilecek bir kültür sistemi, İEKH'nin potansiyellerini kaybetmeden geniş çaplı üretilmelerine ve klinik amaçlı kullanılmalarına olanak tanıyacağı söylenebilir. İEKH'nin özellikle farklı ekstrasellüler

matriks molekülleriyle etkileşiminin pluripotent özelliğın devamıyla sonuçlanması, birbirinden bağımsız ya da ortak bir mekanizmanın pluripotent özelliğı yönettiğini düşündürmektedir. Bu sinyal iletim mekanizmalarının açıklığa kavuşturulması ile pluripotent özelliğın in vitro kontrolü sağlanacak, evrensel standartta kültür sistemi tasarlanabilecek ve çevresel etmenlerce ortaya çıkarılacak heterojenitenin önüne geçilerek tedaviye yönelik iEKH'nin üretimini yolu açılacaktır.

KAYNAKLAR

- Thomson J, Itskovitz-Eldor J, Shapiro S, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;282:1145-1147.
- Reubinoff B, Pera M, Fong C, et al. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol* 2000;18:399-404.
- Itskovitz-Eldor J, Schuldiner M, Karsenti D, et al. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Mol Med* 2000;6:88-95.
- Stojkovic M, Lako M, Stojkovic P, et al. Derivation of human embryonic stem cells from day-8 blastocysts recovered after three-step in vitro culture. *Stem Cells* 2004;22:790-797.
- Przyborski S. Differentiation of human embryonic stem cells after transplantation in immune-deficient mice. *Stem Cells* 2005;23:1242-1250.
- Mitsiadis T, Barrandon O, Rochat A, et al. Stem cell niches in mammals. *Exp Cell Res* 2007;313:3377-3385.
- Yamashita YM, Yuan H, Cheng J, Hunt, AJ. Polarity in stem cell division: asymmetric stem cell division in tissue homeostasis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010;2:a001313.
- Naveiras O, Daley G. Stem cells and their niche: a matter of fate. *Cell Mol Life Sci* 2006;63:760-766.
- Moore K, Lemischka I. Stem cells and their Niches. *Science* 2006;311:1880-1885.
- Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 1978;4:7-25.
- Sato N, Sanjuan I, Heke M, et al. Molecular signature of human embryonic stem cells and its comparison with the mouse. *Dev Biol* 2003;260:404-413.
- Cowan C, Klimanskaya I, McMahon J, et al. Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. *N Engl J Med* 2004;250:1353-1356.
- Xu C, Inokuma M, Denham J, et al. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2001;19:971-974.
- Zeng X, Miura T, Luo Y, et al. Properties of pluripotent human embryonic stem cells BG01 and BG02. *Stem Cells* 2004;22:292-312.
- Skottman H, Mikkola M, Lundin K, et al. Gene expression signatures of seven individual human embryonic stem cell lines. *Stem Cells* 2005;23:1343-1356.
- Klimanskaya I, Chung Y, Meisner L, et al. Human embryonic stem cells derived without feeder cells. *Lancet* 2005;365:1636-1641.
- Ng H, Surani M. The transcriptional and signalling networks of pluripotency. *Nat Cell Biol* 2011;13:490-496.
- Pan G, Chang Z, Schöler H, Pei, D. Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4. *Cell Res* 2002;12:321-329.
- Spagnoli F, Hemmati-Brivanlou A. Guiding embryonic stem cells towards differentiation: lessons from molecular embryology. *Curr Opin Genet Dev* 2006;16:469-475.
- Okita K, Yamanaka S. Intracellular signaling pathways regulating pluripotency of embryonic stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther* 2006;1:103-111.
- Stewart R, Stojkovic M, Lako M. Mechanisms of self-renewal in human embryonic stem cells. *Eur J Cancer* 2006;42:1257-1272.
- Wang Q, Fang Z, Jin F, et al. Derivation and growing human embryonic stem cells on feeders derived from themselves. *Stem Cells* 2005;23:1221-1227.
- Amit M. Clonally Derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol* 2000;227:271-278.
- Ilic D. Culture of human embryonic stem cells and the extracellular matrix microenvironment. *Regen Med* 2006;1:95-101.
- Martin M, Muotri A, Gage F and Varki, A. Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid. *Nat Med* 2005;11:228-232.
- Park J. Establishment and maintenance of human embryonic stem cells on STO, a permanently growing cell line. *Biol Reprod* 2003;69:2007-2014.
- Heng B, Liu H and Cao, T. Feeder cell density--a key parameter in human embryonic stem cell culture. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2004;40:255-257.
- Amit M, Margulets V, Segev H, et al. Human feeder layers for human embryonic stem cells. *Biol Reprod* 2003;68:2150-2156.
- Choo A, Padmanabhan J, Chin A and Oh, S. Expansion of pluripotent human embryonic stem cells on human feeders. *Biotechnol Bioeng* 2004;88:321-331.
- Miyamoto K, Hayashi K, Suzuki T, et al. Human placenta feeder layers support undifferentiated growth of primate embryonic stem cells. *Stem Cells* 2004;22:433-440.
- Richards M, Fong C, Chan W, et al. Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2002;20:933-936.
- Lai D, Cheng W, Liu T, et al. Optimization of culture conditions to support undifferentiated growth of human embryonic stem cells. *Cell Reprogram* 2010;12:305-314.
- Fletcher J, Ferrier P, Gardner J, et al. Variations in humanized and defined culture conditions supporting derivation of new human embryonic stem cell lines. *Cloning Stem Cells* 2006;8:319-334.
- Zhan X, Hill C, Brayton CF and Shambloott, MJ. Cells derived from human umbilical cord blood support the

- long-term growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Cloning Stem Cells* 2008;10:513-522.
35. Park Y, Choi I, Lee S, et al. Undifferentiated propagation of the human embryonic stem cell lines, H1 and HSF6, on human placenta-derived feeder cells without basic fibroblast growth factor supplementation. *Stem Cells Dev* 2010;19:1713-1722.
 36. Hovatta O, Mikkola M, Gertow K, et al. A culture system using human foreskin fibroblasts as feeder cells allows production of human embryonic stem cells. *Hum Reprod* 2003;18:1404-1409.
 37. Inzunza J, Gertow K, Strömberg M, et al. Derivation of human embryonic stem cell lines in serum replacement medium using postnatal human fibroblasts as feeder cells. *Stem Cells* 2005;23:544-549.
 38. Lee J, Lee J, Park J, et al. Establishment and maintenance of human embryonic stem cell lines on human feeder cells derived from uterine endometrium under serum-free condition. *Biol Reprod* 2005;72:42-49.
 39. Ellerström C, Strehl R, Moya K, et al. Derivation of a xeno-free human embryonic stem cell line. *Stem Cells* 2006;24:2170-2176.
 40. McKay T, Camarasa M, İskender B, et al. Human feeder cell line for derivation and culture of hESC/hiPSc. *Stem Cell Res* 2011;7:154-162.
 41. Unger C, Gao S, Cohen M, et al. Immortalized human skin fibroblast feeder cells support growth and maintenance of both human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Hum Reprod* 2009;24:2567-2581.
 42. Xu C, Jiang J, Sottile V, et al. Immortalized fibroblast-like cells derived from human embryonic stem cells support undifferentiated cell growth. *Stem Cells* 2004;22:972-980.
 43. Stojkovic P, Lako M, Stewart R, et al. An autogeneic feeder cell system that efficiently supports growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2005;23:306-314.
 44. Yoo SJ, Yoon BS, Kim JM, et al. Efficient culture system for human embryonic stem cells using autologous human embryonic stem cell-derived feeder cells. *Exp Mol Med* 2005;37:399-407.
 45. Choo A, Ngo A, Ding V, et al. Autogeneic feeders for the culture of undifferentiated human embryonic stem cells in feeder and feeder-free conditions. *Methods Cell Biol* 2008;86:15-28.
 46. Amit M, Shariki C, Margulets V and Itskovitz-Eldor, J. Feeder layer- and serum-free culture of human embryonic stem cells. *Biol Reprod* 2004;70:837-845.
 47. Ludwig T, Levenstein M, Jones J, et al. Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. *Nat Biotechnol* 2006;24:185-187.
 48. Fu X, Toh W, Liu H, et al. Autologous feeder cells from embryoid body outgrowth support the long-term growth of human embryonic stem cells more effectively than those from direct differentiation. *Tissue Eng Part C Methods* 2010;16:719-733.
 49. Abraham S, Sheridan S, Miller B, Rao, R. Stable propagation of human embryonic and induced pluripotent stem cells on decellularized human substrates. *Biotechnol Prog* 2010;26:1126-1134
 50. Meng G, Liu S, Li X, Krawetz, R, Rancourt, D. Extracellular matrix isolated from foreskin fibroblasts supports long-term xeno-free human embryonic stem cell culture. *Stem Cells Dev* 2010;19:547-556.
 51. Searle B, Turner M, Nesvizhskii, A. Improving sensitivity by probabilistically combining results from multiple MS/MS search methodologies. *J Proteome Res* 2008;7:245-253.
 52. Lim J and Bodnar, A. Proteome analysis of conditioned medium from mouse embryonic fibroblast feeder layers which support the growth of human embryonic stem cells. *Proteomics* 2002;2:1187-1203.
 53. Prowse A, McQuade L, Bryant K, et al. A proteome analysis of conditioned media from human neonatal fibroblasts used in the maintenance of human embryonic stem cells. *Proteomics* 2005;5:978-989.
 54. Prowse A, McQuade L, Bryant K, et al. Identification of potential pluripotency determinants for human embryonic stem cells following proteomic analysis of human and mouse fibroblast conditioned media. *J Proteome Res* 2007;6:3796-3807.
 55. Fu X, Toh W, Liu H, et al. Establishment of clinically compliant human embryonic stem cells in an autologous feeder-free system. *Tissue Eng Part C Methods* 2011;17:927-937.
 56. Kleinman H, McGarvey M, Liotta L, et al. Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma. *Biochemistry* 1982;21:6188-6193.
 57. Miyazaki T, Futaki S, Hasegawa K, et al. Recombinant human laminin isoforms can support the undifferentiated growth of human embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;375:27-32.
 58. Rodin S, Domogatskaya A, Ström S, et al. Long-term self-renewal of human pluripotent stem cells on human recombinant laminin-511. *Nat Biotechnol* 2010;28:611-615.
 59. Braam S, Zeinstra L, Litjens S, et al. Recombinant vitronectin is a functionally defined substrate that supports human embryonic stem cell self-renewal via $\alpha 5 \beta 1$ integrin. *Stem Cells* 2008;26:2257-2265.
 60. Prowse A, Doran M, Cooper-White J, et al. Long term culture of human embryonic stem cells on recombinant vitronectin in ascorbate free media. *Biomaterials* 2010;31:8281-8288.
 61. Baxter M, Camarasa M, Bates N, et al. Analysis of the distinct functions of growth factors and tissue culture substrates necessary for the long-term self-renewal of human embryonic stem cell lines. *Stem Cell Res* 2009;3:28-38.
 62. Soteriou D, İskender B, Byron A, et al. Comparative proteomic analysis of supportive and unsupportive extracellular matrix substrates for human embryonic stem cell maintenance. *J Biol Chem* 2013;288:18716-1873.
 63. Rajala K, Lindroos B, Hussein S, et al. A defined and xeno-free culture method enabling the establishment

- of clinical-grade human embryonic, induced pluripotent and adipose stem cells. *PLoS ONE* 2010;5:e10246.
64. Jones M, Chu C, Pendleton J, et al. Proliferation and pluripotency of human embryonic stem cells maintained on type I collagen. *Stem Cells Dev* 2010;19:1923-1935.
 65. Adams J. Molecular organisation of cell-matrix contacts: essential multiprotein assemblies in cell and tissue function. *Expert Rev Mol Med* 2002;4:1-24.
 66. Reddig P and Juliano R. Clinging to life: cell to matrix adhesion and cell survival. *Cancer Metastasis Rev* 2005;24:425-439.
 67. Boudreau N, Jones P. Extracellular matrix and integrin signalling: the shape of things to come. *Biochem J* 1999;339(pt 3):481-488.
 68. Humphries M. Integrin activation: the link between ligand binding and signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* 1996;8:632-640.
 69. Stupack D, Cheresch D. Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival. *J Cell Sci* 2002;115(Pt 19):3729-3738.
 70. Hughes P, Pfaff M. Integrin affinity modulation. *Trends Cell Biol* 1998;8:359-364.
 71. Kim C, Ye F and Ginsberg, M. Regulation of integrin activation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2011;27:321-345.
 72. O'Toole T, Katagiri Y, Faull R, et al. Integrin cytoplasmic domains mediate inside-out signal transduction. *J Cell Biol* 1994;124:1047-1059.
 73. Carman, C and Springer, T. Integrin avidity regulation: are changes in affinity and conformation underemphasized? *Curr Opin Cell Biol* 2003;15:547-556.
 74. Margadant C, Monsuur H, Norman J and A, S. Mechanisms of integrin activation and trafficking. *Curr Opin Cell Biol* 2011;23:607-614.
 75. Geiger B, Bershadsky A, Pankov R, Yamada, K. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:793-805.
 76. Vuoristo S, Virtanen I, Takkunen M, et al. Laminin isoforms in human embryonic stem cells: synthesis, receptor usage and growth support. *J Cell Mol Med* 2009;13(8B):2622-2633.
 77. Hongisto H, Vuoristo S, Mikhailova A, et al. Laminin-511 expression is associated with the functionality of feeder cells in human embryonic stem cell culture. *Stem Cell Res* 2012;8:97-108.
 78. Rowland T, Miller L, Blaschke A, et al. Roles of integrins in human induced pluripotent stem cell growth on Matrigel and vitronectin. *Stem Cells Dev* 2010;19:1231-1240.
 79. Meng Y, Eshghi S, Li Y, et al. Characterization of integrin engagement during defined human embryonic stem cell culture. *FASEB* 2010;24:1056-1065.
 80. Chen S, Fitzgerald W, Zimmerberg J, et al. Cell-cell and cell-extracellular matrix interactions regulate embryonic stem cell differentiation. *Stem Cells* 2007;25:553-561.
 81. Oxley C, Anthis N, Lowe E, et al. An integrin phosphorylation switch: the effect of beta3 integrin tail phosphorylation on Dok1 and talin binding. *J Biol Chem* 2008;283:5420-5426.
 82. Mulrooney J, Hong T and Grabel L. Serine 785 phosphorylation of the beta1 cytoplasmic domain modulates beta1A-integrin-dependent functions. *J Cell Sci* 2001;114(Pt 13):2525-2533.
 83. Abaskharoun M, Bellemare M, Lau E, Margolis R. Expression of hyaluronan and the hyaluronan-binding proteoglycans neurocan, aggrecan, and versican by neural stem cells and neural cells derived from embryonic stem cells. *Brain Res* 2010;1327:6-15.
 84. Calalb M, Polte T, Hanks S. Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases. *Mol Cell Biol* 1995;15:954-963.
 85. Harrison, S. Variation on an Src-like theme. *Cell* 2003;112:737-740.
 86. Armstrong L, Hughes O, Yung S, et al. The role of PI3K/AKT, MAPK/ERK and NFkappabeta signalling in the maintenance of human embryonic stem cell pluripotency and viability highlighted by transcriptional profiling and functional analysis. *Hum Mol Genet* 2006;15:1894-1913.
 87. Watanabe S, Umehara H, Murayama K, et al. Activation of Akt signaling is sufficient to maintain pluripotency in mouse and primate embryonic stem cells. *Oncogene* 2006;25:2697-2707.
 88. Singh A, Reynolds D, Cliff T, et al. Signaling Network Crosstalk in Human Pluripotent Cells: A Smad2/3-Regulated Switch that Controls the Balance between Self-Renewal and Differentiation. *Cell Stem Cell* 2012;10:312-326.
 89. Park J, Ryu J and Han H. Involvement of caveolin-1 in fibronectin-induced mouse embryonic stem cell proliferation: role of FAK, RhoA, PI3K/Akt, and ERK 1/2 pathways. *J Cell Physiol* 2011;226:267-275.
 90. Bendall S, Stewart M, Menendez P, et al. IGF and FGF cooperatively establish the regulatory stem cell niche of pluripotent human cells in vitro. *Nature* 2007;448(7157):1015-1021.
 91. Dravid G, Ye Z, Hammond H, et al. Defining the role of Wnt/beta-catenin signaling in the survival, proliferation, and self-renewal of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2005;23:1489-1501.
 92. Vallier L, Mendjan S, Brown S, et al. Activin/Nodal signalling maintains pluripotency by controlling Nanog expression. *Development* 2009;136:1339-1349.
 93. Li J, Wang G, Wang C, et al. MEK/ERK signaling contributes to the maintenance of human embryonic stem cell self-renewal. *Differentiation* 2007;75:299-307.
 94. Steiner D, Khaner H, Cohen M, et al. Derivation, propagation and controlled differentiation of human embryonic stem cells in suspension. *Nat Biotechnol* 2010;28:361-364.
 95. Wang X, Lin G, Martins-Taylor K, et al. Inhibition of caspase-mediated anoikis is critical for basic fibroblast growth factor-sustained culture of human pluripotent stem cells. *J Biol Chem* 2009;284:34054-34064.
 96. Pera M, Tam, P. Extrinsic regulation of pluripotent stem cells. *Nature* 2010;465:713-720.