Review Article

The role of signaling pathways in derivation and maintenance of mouse embryonic stem cells

Samadian A[1, 2], Naji T[1], Totonchi M[2, 3*]

1- Department of Cell and Molecular, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, I. R. Iran.

2- Department of Stem Cells and Developmental Biology at Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, I. R. Iran.

3- Department of Genetics at Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, I. R. Iran.

Received April 24, 2014; Accepted September 6, 2014

Abstract:

Background: Stem cells are believed as the premier hope to regenerate the defected tissues. In this regard, enhancing the efficient derivation of mouse embryonic stem (ES) cells, as the best model of pluripotent stem cell, facilitates capturing of the efficient derivation of human ES cells. Small molecules play a critical role in improving the efficiency of generating the pluripotent stem cells by inhibiting signaling pathways related to differentiation. This study aimed to evaluate the role of some molecular signaling pathways (e.g. JAK/STAT, MAPK/ERK, PI3K/AKT, WNT/GSK3 and TGF-β) in the cells involved in producing and maintaining ES cells.

Materials and Methods: In this review study, the relevant articles to signaling pathways and embryonic stem cells were selected from PubMed database. In addition, the procedure for the efficient derivation of mouse ES cells was analyzed using small molecules under different conditions, like 2i and R2i culture.

Results: The R2i culture condition increases the efficiency of generation and maintenance of ES cell lines from different types of mouse strain. Thus, findings showed that by inhibiting the MEK and TGF-β pathways in this process, the higher frequency of cells would be maintained at ground state of pluripotency with no differentiation.

Conclusion: To understand the molecular effects of R2i culture condition on enhancing the efficiency of generating the mouse ES cells, the assessment of key pluripotency and differentiation gene expressions as well as the epigenetic changes within the ES cell derivation process seems to be essential.

Keywords: Mouse embryonic stem cell, Signaling pathway, Small molecules, Mouse

* **Corresponding Author.**
Email: m.totonchi@royaninstitute.org
Tel: 0098 21 235 62737
Fax: 0098 21 223 10406

Conflict of Interests: ***No***

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences December, 2014; Vol. 18, No 5, Pages 484-496

Please cite this article as: Samadian A, Naji T, Totonchi M. The role of signaling pathways in derivation and maintenance of mouse embryonic stem cells. ***Feyz*** 2014; 18(5): 484-96.

نقش مسیرهای پیام رسانی در تولید و حفظ سلول‌های بنیادی جنینی موشی

اعظم صمدیان [۱و۲]، طاهره ناجی [۳]، مهدی توتونچی [۴و۵*]

خلاصه:

سابقه و هدف: سلول‌های بنیادی به‌عنوان امید اول ترمیم بافت‌های آسیب‌دیده از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند. در این راستا آسان-سازی و افزایش کارایی تولید سلول‌های بنیادی جنینی به‌عنوان بهترین مدل از سلول‌های بنیادی پرتوان، می‌تواند به‌عنوان راه‌کاری برای بالا بردن کارایی تولید سلول‌های بنیادی جنینی انسانی محسوب شود. ریزمولکول‌ها با مهار مسیرهای تمایزی، نقش به‌سزایی در افزایش کارایی تولید و پایداری این سلول‌های پرتوان دارند. در این مطالعه نقش مسیرهای پیام‌رسانی سلولی از قبیل JAK/STAT، MAPK/ERK، PI3K/AKT، Wnt/GSK3 و TGF-B در تولید و حفظ سلول‌های بنیادی جنینی بررسی شده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مروری، مقالات علمی مرتبط با مسیرهای پیام‌رسانی و سلول‌های بنیادی جنینی که ازپایگاه علمی PubMed استخراج شده است، انتخاب و استفاده شد و روند تولید سلول‌های بنیادی جنینی موشی با رویکرد استفاده از ریزمولکول‌ها در شرایط کشتی مانند 2i و R2i ارزیابی شده است.

نتایج: شرایط کشت R2i باعث افزایش کارایی تولید و حفظ رده سلول‌های بنیادی جنینی از همه نژادهای موش شده است. بنابراین، به-نظر می‌رسد در این فرآیند، با مهار مسیرهای MEK و TGF-β، تعداد بیشتری از سلول‌ها در حالت پرتوانی حفظ شده و سلول‌های رشد یافته در یک وضعیت پایه پرتوانی و عدم تمایز یافتگی قرار دارند.

نتیجه‌گیری: به‌منظور آگاهی از مکانیسم و تاثیر مولکولی شرایط کشت R2i بر افزایش کارایی تولید رده سلول‌های بنیادی جنینی موش، بررسی تغییرات مولکولی مانند ارزیابی روند تغییرات بیان ژن‌های کلیدی بنیادینگی و تمایزی و تغییرات اپی‌ژنتیکی در حین فرآیند تولید سلول‌های بنیادی جنینی ضروری به‌نظر می‌رسد.

واژگان کلیدی: سلول‌های بنیادی جنینی موشی، مسیرهای پیام‌رسانی، ریزمولکول‌ها، موش

دو ماه‌نامه علمی– پژوهشی فیض، دوره هجدهم، شماره ۵، آذر و دی ۱۳۹۳، صفحات ۴۹۶-۴۸۴

مقدمه

تکوین جنین در پستانداران با تشکیل سلول تخم آغاز می‌شود. این سلول همه‌توان، پتانسیل تولید میلیاردها سلول لازم برای تشکیل یک موجود کامل شامل جنین و تمامی بافت‌های خارج جنینی مانند جفت را دارد.

این توانایی به‌تدریج در حین تکوین و تقسیم سلولی به‌شدت کاهش می‌یابد. اولین مرحله از تمایز جنین با تشکیل بلاستوسیست آغاز می‌شود. بلاستوسیست از یک لایه سلول بیرونی به نام تروفو-اکتودرم و یک توده سلولی داخلی یا ICM (Inner Cell Mass) تشکیل شده است. تروفواکتودرم فقط در تشکیل جفت شرکت می‌کند، در حالی‌که سلول‌های ICM قابلیت تمایز به سه لایه زاینده جنینی (اکتودرم- مزودرم- اندودرم) را دارند و از این‌رو تحت عنوان سلول‌های جنینی پرتوان معرفی شده‌اند [۱]. این سلول‌های پرتوان در شرایط درون‌تنی به‌صورت گذرا بوده و تحت کنترل یک برنامه تکوینی محض قرار دارند و به موازات تقسیم‌های سلولی متوالی متعهد شده و به تدریج خاصیت پرتوانی خود را از دست می‌دهند. به‌دنبال تزریق این سلول‌ها به نواحی خارج رحمی مانند کلیه یا کپسول بیضه موش بالغ، تومورهای تراتوکارسینوما تشکیل می‌شوند. این مطالعات منجر به یافتن شرایط کشت مناسب برای تولید رده‌های سلول‌های بنیادی جنینی نامیرا از بلاستوسیست با حفظ پتانسیل پرتوانی و خودنوزایی در محیط آزمایشگاهی شده-اند [۲]. تاکنون از پستاندارانی مانند موش، میمون و انسان سلول های بنیادی جنینی (Embryonic Stem Cells or ESCs) با توان خودنوزایی و کشت‌های طولانی‌مدت تولید شده است [۵-۳].

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه سلولی مولکولی، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران

[۲] پژوهشگر، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، گروه سلول‌های بنیادی و زیست شناسی تکوینی، تهران

[۳] استادیار، گروه سلولی مولکولی، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران

[۴] استادیار، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، گروه سلول‌های بنیادی و زیست شناسی تکوینی، تهران

[۵] استادیار، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست شناسی و علوم پزشکی تولید مثل جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، گروه ژنتیک، تهران

* **نشانی نویسنده مسئول:**
تهران، بزرگراه رسالت، خیابان بنی‌هاشم شمالی، پژوهشگاه رویان، مرکز تحقیقات علوم سلولی، گروه سلول‌های بنیادی و زیست شناسی تکوینی

تلفن: ۰۲۱۲۳۵۶۲۷۳۷ **دورنویس:** ۰۲۱ ۲۳۵۶۲۵۰۷

پست الکترونیک: m.totonchi@royaninstitute.org

تاریخ دریافت: ۹۳/۲/۴ **تاریخ پذیرش نهایی:** ۹۳/۶/۱۵

با توجه به محدودیت منابع جنین انسانی، رده‌های سلولی پرتوان مشتق از جنین موش مدل مناسبی را برای بررسی مراحل اولیه تکوین پستانداران، مطالعات زیست شناسی سلول‌های بنیادی و تحقیق پیرامون تمایز سلولی مهره داران فراهم کرده است [۶]. البته بازدهی تولید سلول‌های بنیادی جنینی، تحت تاثیر نژاد ژنتیکی موش، شرایط کشت و عوامل موثر بر موش‌های باردار متفاوت است [۸،۷]. مسیرهای پیام رسانی، شبکه‌های تنظیمی رونویسی و برهم‌کنش پروتئین‌ها، نقش مهمی در حفظ پرتوانی سلول‌های بنیادی موشی دارند. هم‌چنین، بسیاری از عوامل رونویسی، تنظیم-کننده‌های اپی‌ژنتیکی، چرخه سلولی، miRNAها و فاکتورهای پیام‌رسانی خارج سلولی باعث سرکوب ژن‌های تکوینی و فعال نمودن ژن‌های بنیادینگی می‌شوند [۹]. به‌نظر می‌رسد که فرآیند تولید سلول‌های بنیادی جنینی در واقع نوعی دست‌ورزی در عوامل مولکولی مذکور و به دام انداختن سلول‌های ICM در وضعیت ناپایدار پرتوانی و تبدیل آن به‌صورت رده سلولی پایدار است و می‌توان خصوصیات مشترکی مانند بیان ژن‌های پرتوانی اصلی از قبیل Oct-4، Sox2 و Nanog را در سلول‌های بنیادی جنینی موشی و ICM مشاهده کرد [۱۰]. فراهم کردن شرایط مناسب برای استفاده بهینه از توانایی سلول‌های بنیادی جنینی و به موازات آن شناسایی مکانیسم‌های مولکولی لازم برای حفظ خودنوزایی اهمیت ویژه‌ای داشته و در این راستا تلاش‌های بسیاری به‌منظور دست‌یابی به شرایط کشت بهینه و افزایش کارآیی تولید رده، صورت گرفته که شامل استفاده از سلول‌های فیبروبلاست جنینی موش به‌عنوان لایه‌ی تغذیه کننده، سرم، مولکول‌های شیمیایی، و سایتوکاین‌ها است. هدف از این مطالعه، مروری بر روند پیشرفت در تولید و حفظ سلول‌های بنیادی جنینی موشی با تاکید بر نقش مولکول‌های پیام رسانی و تاثیر دست‌ورزی در مسیرهای پیام رسانی است.

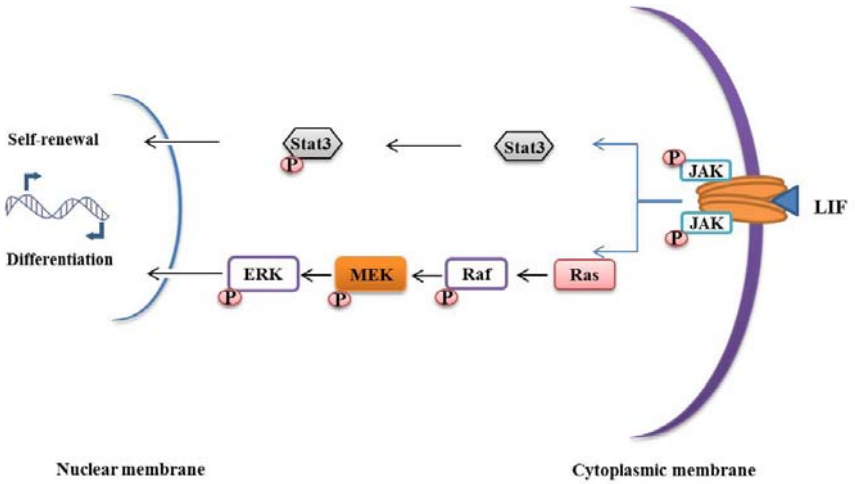
سلول‌های بنیادی جنینی موشی

سلول‌های بنیادی جنینی از توده سلولی درونی بلاستو-سیست به‌دست می‌آیند و با داشتن دو ویژگی خودنوزایی و پر-توانی از سایر سلول‌های بنیادی متمایز می‌شوند. این سلول‌ها با قابلیت خودنوزایی قادرند سلول‌هایی با پتانسیل تکوینی مشابه خود تولید نمایند و با قابلیت پرتوانی خود انواع سلول‌های تمایز یافته را تولید می‌کنند [۱۱]. در سال ۱۹۵۰ تحقیقات در زمینه سلول‌های بنیادی پرتوان با مطالعات انجام شده روی تراتوکار-سینوما آغاز شد. تراتوکارسینوما تومورهای سلولی بدخیم و حاوی سلول‌های کارسینومای جنینی تمایز یافته و تمایز نیافته بوده و قابلیت تمایز به رده‌های سلولی مختلف را دارند. بنابراین، وجود ویژگی‌های تکوینی مشابه بین سلول‌های کارسینومای جنینی و سلول‌های جنینی اولیه، زمینه تحقیقات در مورد این سلول‌ها را در شرایط برون‌تنی فراهم کرد. به‌عنوان مثال سلول‌های کارسینومای جنینی موشی، آنتی‌ژن‌ها و پروتئین‌هایی شبیه به ICM را بیان کرده و در صورت تزریق به بلاستوسیست طبیعی، در تشکیل جنین شرکت می‌کنند. البته این سلول‌ها از نظر ژنتیکی تغییر یافته بوده و توانایی تشکیل جنین سالم را ندارند و فقط بافت‌ها و اندام‌های شبه جنین را ایجاد می‌کنند. هم‌چنین، اگر سلول‌های بنیادی جنینی به ناحیه‌ای غیر از رحم پیوند زده شود، تراتوکارسینوما تشکیل می‌دهند [۱۲].

نقش مسیر LIF/Stat3 در تولید اولین رده سلول‌های بنیادی جنینی موش

اولین رده سلول‌های بنیادی جنینی موش از طریق هم-کشتی جنین‌های مرحله بلاستوسیست موش نژاد ۱۲۹ با سلول‌های فیبروبلاست جنینی (Mouse Embryonic Fibroblast or MEF) در محیط حاوی سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum or FBS) تولید شده است [۱۴،۱۳]. این شرایط پیش از این نیز برای کشت و تکثیر طولانی مدت سلول‌های کارسینومای موشی و تکثیر سلول‌های بنیادی جنینی در وضعیت تمایز نیافته استفاده شده بود [۱۵]. پتانسیل پرتوانی و توان تمایزی سلول‌های بنیادی جنینی حتی پس از پاساژهای مکرر در آزمایشگاه حفظ شده و در صورت پیوند این سلول‌ها به موش‌های بالغ، تراتوما تشکیل می‌دهند. هم‌چنین، با تزریق به بلاستوسیست میزبان، می‌توانند موش‌های کایمر ایجاد کنند [۱۶]. اگرچه شرایط کشت و نگه‌داری سلول‌های بنیادی موشی به‌دلیل استفاده از سرم گاوی ناشناخته است، اما قابلیت حفظ و نگه‌داری بلند مدت و پتانسیل تمایزی این سلول‌ها در محیط آزمایشگاه تحول بزرگی در علوم زیست شناسی، جنین شناسی و پزشکی ترمیمی به‌وجود آورده است. مطالعات نشان داده‌اند که فاکتور ممانعت کننده لوکمیایی (Leukemia Inhibitory Factor or LIF) عنصرکلیدی مترشحه از سلول‌های تغذیه کننده [۱۷،۵] و BMP (Bone Morphogenetic Protein) فاکتور مهم موجود در سرم است که خودنوزایی سلول‌های بنیادی جنینی را سبب می‌شود [۱۸]. بنابراین، با جایگزین کردن سلول‌های تغذیه کننده و سرم با فاکتور LIF و BMP4، محیط کشتی با ترکیب مشخص تولید شد. از آنجا که این فاکتورها در سلول‌های بنیادی جنینی روی مسیرهای پیام رسانی اثر می‌گذارند، از این‌رو بررسی مولکولی این مسیرهای پیام رسانی ضروری به‌نظر می‌رسید. به‌طور طبیعیLIF در شرایط

درون‌تنی توسط دیواره داخلی رحم تولید و ترشح شده و در لانه گزینی بلاستوسیست نقش دارد. گیرنده LIF با عنوان gp130، توسط سلول‌های ICM و یا سلول‌های بنیادی جنینی بیان می‌شود [۱۹]. پس از اتصال فاکتور رشد LIF به gp130، عامل رونویسی STAT3 (Signal Transducers and Activators of Transcription3) فسفریله و فعال شده و با ورود به هسته رونویسی از ژن‌های موثر در پرتوانی را تنظیم می‌کند [۲۰، ۲۱]. راه اندازی مسیر LIF/STAT3 از سوی دیگر می‌تواند سبب فعال شدن مسیر تمایزی MAPK/ERK شود [۲۲]. به‌عبارت دیگر نقش دو سویه‌ای در حفظ پرتوانی و یا تمایز ایفا می‌کند (شکل شماره ۱).



شکل شماره ۱- مسیر پیام رسانی LIF/STAT3: اتصال LIF به گیرنده کیناز مرتبط با آن یعنی JAK (Janus Kinas) را فعال می‌کند. JAK از یک‌سو با فسفریلاسیون Stat3 بیان ژن‌های موثر در پرتوانی و خودنوزایی را تنظیم می‌کند و از سوی دیگر با واسطه مسیر MAPK منجر به بیان ژن‌های تمایزی می‌شود.

علاوه بر مسیر LIF/STAT3، اعضای ابرخانواده TGF-β نیز به‌عنوان تنظیم کننده برخی از مهم‌ترین برهم‌کنش‌های تکوینی شناخته شده‌اند و شامل اعضای مختلفی مانند TGFβ، Nodal، Activin و BMP4 هستند. BMP4 با فعال کردن عوامل رونویسی Smad1, 5, 8 و القای عوامل رونویسی Id (Inhibitors of Differentiation) از تمایز سلول‌های بنیادی جنینی موشی جلوگیری می‌کند [۲۳]. در مقایسه با ICM، گیرنده کلیدی BMP با عنوان BMPR1a در سلول بنیادی جنینی موشی بیان بیشتری دارد. بنابراین، به‌نظر می‌رسد که کاهش فعالیت این مسیر باعث آغاز تمایز در سلول‌های بنیادی در شرایط برون‌تنی و یا آغاز تمایز سلول‌های ICM در حین تکوین جنین می‌شود [۱۰]. محیط کشت حاوی سرم و سلول‌های تغذیه‌کننده، اگرچه شرایط مناسبی را برای دستکاری‌های ژنتیکی در سلول‌های بنیادی جنینی ایجاد کرده است اما شرایط بهینه‌ای برای تولید و نگه‌داری سلول‌های بنیادی جنینی نمی‌شود؛ زیرا از یک طرف فقط قادر به تولید سلول‌های بنیادی جنینی از نژاد خاصی مثل نژاد ۱۲۹ هستند [۲۴] و از سوی دیگر، متغیر بودن سلول‌های تغذیه کننده، ناشناخته بودن ترکیبات سرمی و احتمال ایجاد آلودگی‌های پاتوژنیک یا اگزوژنیک، استفاده از این محیط کشت را با محدودیت‌هایی روبرو می‌کند [۲۵]. هم‌چنین، اگرچه استفاده از LIF و BMP4 توانست نیازمندی‌های مولکولی در سلول‌های پرتوان موش را مشخص سازد و برای حفظ و نگه‌داری طولانی مدت سلول‌های بنیادی جنینی مرسوم شود، اما برای تولید موثر رده‌های پرتوان از نژادهای غیر از ۱۲۹ ناکارآمد بود [۱۸]. با توجه به اینکه در شبکه پرتوانی، مسیرهای پیام‌رسانی متعددی دخیل هستند و ترکیباتی که از لحاظ ویژگی نامشخص هستند، می‌توانند مانع از شناسایی دقیق جریان مولکولی پرتوانی شوند، بنابراین برای پی بردن به مکانیسم‌های مولکولی و بهره برداری بهینه از قابلیت‌های این سلول توانمند، ایجاد شرایط محیط ساده‌تر و قوی‌تر برای تولید آن‌ها ضروری به‌نظر می‌رسد.

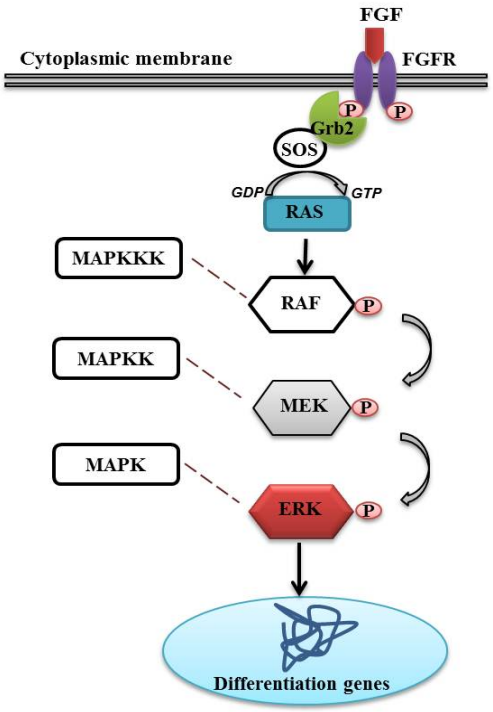
عملکرد ریزمولکول‌ها در بالا بردن کارآیی تولید رده‌های سلول‌های بنیادی جنینی

در سال‌های اخیر به موازات علم زیست شناسی، علم شیمی نیز روندی رو به رشد داشته و مولکول‌های شیمیایی تحت عنوان ریزمولکول‌ها را شناسایی کرده است. محققان زیست شناسی

نیز با کاربرد این ریزمولکول‌ها برای مهار مسیرهای پیام رسانی داخل سلولی، موفق به افزایش کارآیی تولید رده‌های سلول‌های بنیادی شده‌اند. ریزمولکول‌ها، مولکول‌های آلی با وزن مولکولی کم هستند و به‌طور اختصاصی فرآیندهای داخل سلولی مانند مسیرهای پیام رسانی و فرآیندهای اپی‌ژنتیکی را مورد هدف قرار داده و سرنوشت سلولی را تغییرمی‌دهند. این اثر به‌صورت گذرا، سریع و برگشت پذیر بوده و با حذف آن‌ها از محیط کشت به پایان می‌رسد [۲۶]. ریزمولکول‌ها در حفظ پرتوانی، مهار تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به دودمان‌های مختلف [۲۶]، بالا بردن کارآیی تولید سلول‌های بنیادی جنینی موشی [۲۹-۲۷]، تولید و نگه داری سلول‌های بنیادی جنینی انسانی و سلول‌های پرتوان القایی [۳۱،۳۰] نقش به‌سزایی دارند. اگرچه ریزمولکول‌ها ساده و کنترل پذیر هستند، اما ممکن است این مولکول‌های کوچک بیش از یک هدف در داخل سلول داشته باشند و با ایجاد عوارض جانبی مانند مسمومیت در مصارف درمانی محدودیت ایجاد کنند [۲۵]. مطالعات انجام شده درباره مسیرهای پیام‌رسانی سلولی با استفاده از ریزمولکول‌ها، نشان داده است که مهار مسیرهای تمایزی در پایداری سلول‌های پرتوان نقش موثری دارند. به‌عبارت دیگر، در صورتی‌که تمایز خود به‌خودی در این سلول‌ها مهار شود، پرتوانی خود را حفظ خواهند کرد [۲۶].

مسیر FGF/ERK سدی در برابر تولید رده سلول‌های بنیادی جنینی موش

سلول‌های بنیادی از لحاظ پرتوانی در یک توازن ناپایدار قرار دارند و این توازن از طریق برهم‌کنش بین محرک‌های خارجی و مسیرهای داخلی حفظ می‌شود و سرنوشت سلولی را تعیین می‌کند. مسیر FGF/ERK، اولین مسیر شناخته شده در برهم زدن این توازن است و از مسیرهای اصلی تمایزی در سلول‌های بنیادی جنینی محسوب می‌شود. فعالیت FGF (Fibroblast Growth Factor) و اجزاء پایین‌دست آن، یعنی آبشار پیام رسانی ERK/MEK/Raf/Ras، در انتقال پیام از فاکتورهای رشد و سایتوکاین‌ها به داخل سلول نقش مهمی دارد و در فرآیندهای تکوین جنین شامل تکثیر، اتصالات سلولی، بقا، تمایز و مهاجرت مشارکت می‌کند. به‌عبارت دیگر، تنظیم کننده مرز پرتوانی و تمایز است. این مسیر، سلول را در تصمیم گیری بین خودنوزایی و تعهد به سمت رده‌ای خاص، هدایت کرده و برای خروج سلول‌ها از برنامه خودنوزایی و آغاز تمایز مورد نیاز است. در مرکز این آبشار پیام‌رسانی یک GTPase متصل به غشا به نام Ras وجود دارد که در صورت فعال شدن، به‌صورت متوالی Raf، MEK و ERK فسفریله و فعال می‌شود. ERK1,2 فسفریله شده با ورود به هسته باعث بیان برخی ژن‌های تمایزی می‌شوند. بنابراین، مهار این مسیر در بالا بردن کارایی تولید سلول‌های بنیادی جنینی نقش به‌سزایی دارد [۳۲] (شکل شماره ۲).



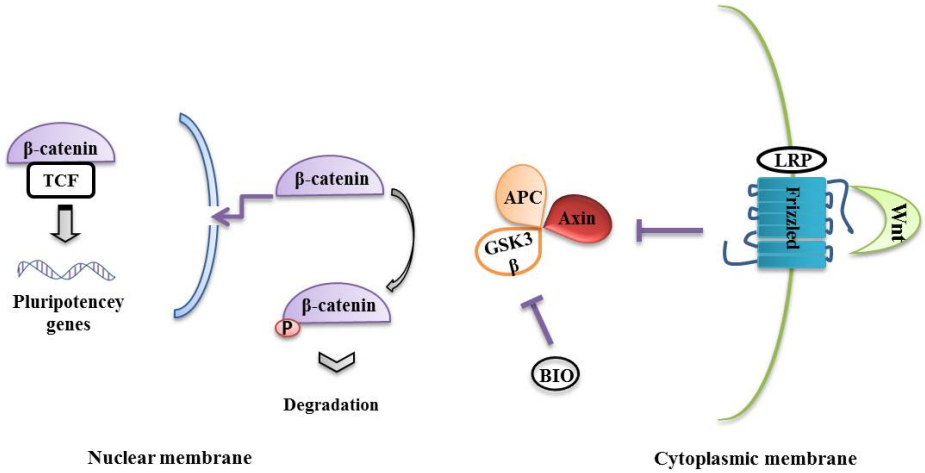
شکل شماره ۲- مسیر پیام رسانی FGF/ERK: اتصال فاکتور رشد فیبروبلاستی (FGF) به گیرنده، با واسطه Grb2 (پروتئین متصل شونده به گیرنده فاکتور رشد ۲) منجر به فعال شدن SOS (مولکول تعویض کننده گوانین) می‌شود. به‌دنبال آن Ras فعال شده و با به راه انداختن آبشار فسفریلاسیون در مسیر MAPK باعث القای بیان ژن‌های تمایزی می‌شود.

Burdon و همکارانش نیز نشان داده‌اند که مهار فاکتور رونویسی Erk1/2 در پرتوانی تاثیری مثبت دارد [۳۳]. FGF4 که توسط سلول‌های بنیادی جنینی ترشح می‌شود، فعال‌کننده اصلی مسیر FGF/ERK محسوب می‌گردد [۳۴]. این لیگاند در جنین اولیه بیان زیادی دارد و توسط عوامل رونویسی OCT4 و SOX2 تنظیم می‌شود و از این‌رو در حفظ پرتوانی نقشی بسیار مهم دارد [۳۷-۳۵]. اگرچه مهار شیمیایی مسیر پیام رسانی ERK می‌تواند باعث کاهش تمایز خود به‌خودی در کشت سلول‌های بنیادی جنینی شود [۳۴،۲۲]، اما مهار این مسیر به تنهایی برای حفظ پرتوانی سلول‌های بنیادی جنینی کافی نبوده و باید به محیط کشت، LIF نیز افزوده شود و یا سلول‌ها به میزان بیشتری کشت داده شوند [۳۸]. سلول‌های بنیادی جنینی دارای یک توانایی ذاتی در

حفظ پرتوانی هستند و در عدم حضور فاکتورهای خارجی، مسیرهای مرتبط با پرتوانی فعال می‌شود. مطالعات نشان داده‌اند که ریزمولکول Pluripotin توانایی خودنوزایی mESC را در شرایط فاقد سلول‌های تغذیه کننده، سرم و LIF حفظ می‌کند. این ریزمولکول از طریق مهار هم‌زمان دو پروتئین القا کننده تمایزی داخل سلولی، شامل پروتئین فعال کننده Ras (Ras GAP) و ERK1 عمل می‌کند. [۳۹]. از دیگر ریزمولکول‌های مهار کننده این مسیر می‌توان به U0126 (مهار کننده مسیر MEK1)، SU5402 (مهار کننده گیرنده FGF یا FGFR1)، PD184352 (مهار کننده ERK)، PD98059 (مهار کننده Raf) و PD0325901 (مهار کننده قوی MEK) اشاره کرد [۴۴-۴۰]. هم‌چنین، استفاده از مهار کننده‌های این مسیر به‌همراه LIF و BMP4 باعث تولید کارآمد برخی از رده‌های پرتوان از بلاستوسیست‌های نژادهایی غیر از ۱۲۹ که تا قبل از آن به راحتی امکان‌پذیر نبود، شده است [۴۵].

تاثیر مهار مسیر Wnt/GSK3 در فرآیند تولید سلول‌های بنیادی جنینی موش

قبل از شناسایی مسیر Wnt و مولکول GSK3 (Glycogen synthase kinase 3)، تنها مسیر موثر در خودنوزایی سلول بنیادی جنینی موش، مسیر پیام رسانی LIF/-STAT3 محسوب می‌شد؛ در حالی‌که این مسیر در حین تکوین جنین قبل از لانه‌گزینی (گاسترولاسیون) ضروری نبوده است. از طرف دیگر با توجه به اینکه STAT3 در حفظ خودنوزایی سلول‌های بنیادی جنینی انسانی نقش چندانی نداشت، شناسایی دیگر مسیرهای موثر در حفظ خودنوزایی ESCs مورد بررسی قرار گرفتند [۴۶]. مطالعات نشان داده‌اند که مهار آنزیم GSK3 می‌تواند خودنوزایی ESCs را تقویت کند [۴۸-۴۶]. مولکول چند عملکردی GSK3 نقش بسیار مهمی در فرآیندهای زیستی مانند الگوزایی بافتی، آپوپتوز، متابولیسم گلوکز، هومئوستازی سلول‌های بنیادی و تنظیم چرخه سلولی برعهده دارد و تنظیم کننده مسیرهای پیام رسانی مهمی از جمله Wnt، BMP، MAPK/Erk، mTOR و انسولین است. عملکرد نادرست این مولکول می‌تواند باعث بروز بیماری‌هایی مانند بیماری دوقطبی، اسکیزوفرنی، آلزایمر و سرطان شود. بنابراین، با شناسایی تاثیر مهار این مولکول مهم می‌توان مکانیسم‌های حاکم بر پرتوانی را تعیین کرد [۴۹]. مسیر Wnt بیش از ۳۰ لیگاند خارج سلولی دارد که با گیرنده Frizzled واکنش می‌دهد. تحریک خارج سلولی این مسیر با اتصال پروتئین Wnt به گیرنده خود در سطح سلول و فعال شدن Dishelved آغاز می‌شود. Dishelved با مهار GSK3 باعث تجمع سیتوپلاسمی β-catenin و ورود آن به هسته می‌شود. در هسته β-catenin با Tcf3 برهم‌کنش داده و کمپلکس حاصل به‌عنوان فعال کننده ژن‌های محرک تکثیر، عمل می‌کند [۵۰] (شکل شماره ۳). Tcf3 مهار کننده اصلی فاکتورهای رونویسی پرتوانی است [۵۲،۵۱] و بنابراین حذف آن باعث حفظ پرتوانی و مهار تمایز سلول‌های بنیادی جنینی می‌شود [۵۳].



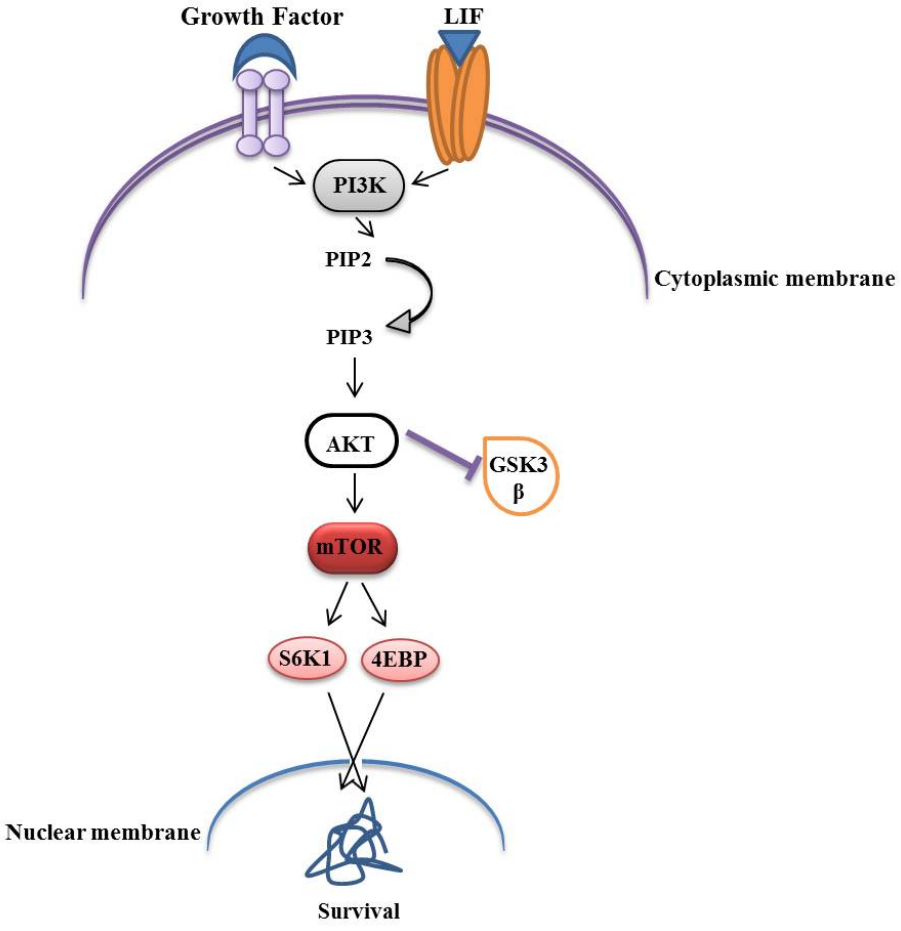
شکل شماره ۳- مسیر پیام رسانی Wnt/GSK3: اتصال مولکول wnt به گیرنده منجر به جداشدن Axin از کمپلکس تخریب کننده β-catenin می‌شود. β-catenin وارد هسته شده و به‌عنوان یک کمک فعال کننده TCF عمل می‌کند و بیان ژن‌های پرتوان را سبب می‌شود.

تاکنون مطالات متعددی تولید و نگه داری سلول‌های بنیادی جنینی موش را با استفاده از ریزمولکول‌های مهار کننده این مسیر نشان داده‌اند [۵۴،۴۵،۳۸،۲۹]. مهار GSK3 باعث ثبات β-catenin درون سلولی و برهم‌کنش آن با Tcf3 شده و اثر مهار کنندگی آن را خنثی می‌کند [۵۵]. تحریک داخل سلولی این مسیر می‌تواند توسط BIO (oxin6-bromoindirubin-3) صورت

گیرد. BIO یک مهار کننده دارویی است که GSK3 را غیرفعال کرده و وضعیت غیرتمایزی و بیان فاکتورهای رونویسی اختصاصی پرتوانی در سلول‌های بنیادی جنینی موش و انسان را بهتر حفظ می‌کند. این مسئله وجود یک نقش حفاظت شده برای مسیر Wnt پیام رسانی در موش و انسان را تائید می‌کند. بدین‌ترتیب، مطالعات فوق نشان می‌دهند که با مهار GSK3 کارآیی تولید سلول‌های بنیادی جنینی افزایش می‌یابد [۵۶]. اما BIO به‌طور کاملا اختصاصی عمل نکرده و واکنش‌های متقاطع دیگری نیز با CDK و سایر کینازها دارد. بنابراین، علاوه بر مهار GSK3، مهار کننده CDKs نیز محسوب می‌شوند. این مهار کننده از طریق توقف چرخه سلولی در فاز G1/S یا G2/M، مانع از تکثیر سلول‌های کشت یافته شده و در نهایت کاهش بقا سلول را سبب می‌شود [۵۷]. از مهار کننده‌های دیگر این مسیر می‌توان به CHIR99021 اشاره نمود که نقش به‌سزایی در افزایش کارایی تولید سلول‌های بنیادی جنینی دارد [۵۸].

مسیر پیام رسانی تنظیمی PI3K/AKT

بسیاری از عملکردهای سلولی مانند تکثیر، بقا و مهاجرت سلولی توسط PI3Ks (Phosphoinositide 3-kinases) کنترل می‌شود. انواع مختلفی از فاکتورهای رشد، مولکول‌های چسبنده سلولی و کموکاین‌ها می‌توانند باعث فعال شدن این مسیر شوند. در غشا سلولی PI3K با فسفریلاسیون PIP2 یک پیامبر ثانویه داخل سلولی به نام PIP3 را تولید کرده و از طریق فعال کردن عوامل پایین‌دست خود تحت عنوان AKT عملکرد خود را انجام می‌دهد. AKT فعال نیز با فسفریلاسیون و فعال سازی mTOR نقشی تنظیمی در رشد، تکثیر و بقاء سلولی دارد [۵۹،۶۰] (شکل شماره ۴).

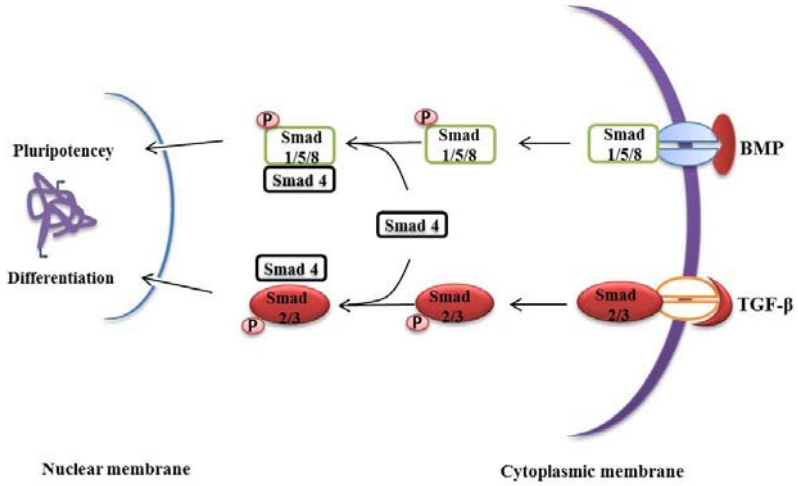


شکل شماره ۴- مسیر پیام رسانی PI3K/AKT: با اتصال لیگاندهایی مانند فاکتور رشد و یا LIF گیرنده‌های سطح سلول فعال شده و منجر به فعال سازی آنزیم PI3K، تولید PIP3 و متعاقبا فسفریلاسیون و فعال سازی AKT به‌عنوان یک کیناز مرکزی در این مسیر می‌شود. در نهایت mTOR نیز در اثر فسفریلاسیون توسط AKT فعال شده و در تنظیم رشد، تکثیر و بقا سلولی نقش ایفا می‌کند.

همچنین، مسیر پیام رسانی PI3K/AKT با تسهیل عبور از فاز G1 به S در تنظیم سیکل سلولی نقش به‌سزایی دارد و از این‌رو یک مسیر مهم در آپوپتوز و سرطان محسوب می‌شود [۶۱]. این مسیر در سلول‌های بنیادی جنینی موشی به‌وسیله سایتوکاین LIF [۶۲] و در سلول‌های بنیادی جنینی انسانی با انسو-لین، IGF و bFGF فعال می‌شود [۶۳]. مطالعات نشان داده‌اند که مهار شیمیایی PI3K به‌وسیله مهار کننده LY294002 باعث کاهش بیان فاکتورهای رونویسی مرتبط با پرتوانی در سلول‌های بنیادی جنینی موش شده و نشان دهنده این است که این مسیر در پرتوانی و خودنوزایی نقش دارد. هم‌چنین، حذف سایتوکاین LIF باعث کاهش فعالیت این مسیر می‌شود [۶۲]. اهمیت مسیر پیام رسانی PI3K/AKT در تنظیم سلول‌های بنیادی جنینی، در واکنش‌های متقاطع با دیگر مسیرهای پیام رسانی است. mTOR در سلول‌های بنیادی جنینی موش به‌عنوان یک تنظیم کننده کلیدی در خودنوزایی سلول شناخته شده است و مهار آن سلول‌ها را از حالت پرتوانی خارج کرده و به سمت تمایز پیش می‌برد [۶۴]. AKT با مهار GSK3، به‌عنوان تنظیم کننده مسیر Wnt عمل کرده و از این‌رو در حفظ خودنوزایی و افزایش کارآیی تولید سلول‌های بنیادی جنینی موشی موثر است [۶۵،۵۰]. برای مهار مسیر Wnt در شرایط عاری از سایتوکاین LIF، از مهار کننده‌های اختصاصی GSK3 استفاده می‌شود. بنابراین، PI3K در متعادل کردن واکنش‌های متقاطعی که بین مسیرهای پیام رسانی مختلف در سلول‌های بنیادی جنینی رخ می‌دهد نقش کلیدی دارد [۶۶].

نقش کلیدی مسیر پیام رسانی TGF-β

مسیر پیام رسانی (Transforming Growth Factor β) TGF-β اولین بار در تومورها به‌عنوان یک پیام ضد تکثیری شناسایی شده است و در حفظ هموستازی بافت‌ها، فرآیندهای تکوینی و تعیین سرنوشت سلول‌ها نقشی حیاتی داشته و در طول تکامل حفظ شده است. مطالعات، تاثیر مسیر پیام رسانی TGF-β در تمایز و تخصصی شدن به سمت مزودرم و اندودرم را نشان داده است، اما درباره نقش این مسیر پیام رسانی در سلول‌های بنیادی جنینی موش نظر قطعی وجود ندارد [۷۰-۶۷]. از یک‌سو نقش TGF-β در رشد و حفظ خودنوزایی سلول‌های بنیادی جنینی مطرح شده و از سوی تاثیر مثبت مهار این مسیر بر خودنوزایی سلول‌های بنیادی جنینی گزارش شده است. هم‌چنین، مطالعات انجام شده در زمینه تولید سلول‌های پرتوان القایی (Induced Pluripotent Stem cells یا iPSCs) موش تأثیر مثبت مهار این مسیر را در افزایش کارآیی تولید سلول‌های فوق نشان داده است [۷۳-۷۱]. همان طور که پیش از این ذکر شد، ابر خانواده TGF-β شامل اعضای مختلفی مانند TGF-β، Nodal و Activin و BMP4 است. مطالعات نشان داده‌اند که وجود پیام رسانی TGF-β/Activin/Nodal از طریق فعال سازی فاکتورهای رونویسی Smad2,3 برای تکثیر سلول‌های بنیادی جنینی موش ضروری است. اتصال لیگاندهای Activin، Nodal و TGF-β به گیرنده خود باعث فسفریلاسیون Smad2,3 می‌شوند. پروتئین‌های p-Smad2,3 پس از اتصال به Smad4 وارد هسته شده و بیان ژن را تنظیم می‌کنند [۲۳] (شکل شماره ۵).



شکل شماره ۵- مسیر پیام رسانی TGFβ: در پیام رسانی وابسته به BMP (بالای شکل)، با اتصال BMP به گیرنده تیروزین کینازی خود Smad1/5/8 فسفریله و فعال شده و با برهم کنش با Smad4 مهار ژن‌های تمایزی را سبب می‌شود. در پیام‌رسانی وابسته به TGFβ (پایین شکل)، با اتصال TGFβ به گیرنده تیروزین کینازی خود Smad2/3 فسفریله و فعال شده و با برهم کنش با Smad4 بیان ژن‌های تمایزی را القا می‌کند.

از ریزمولکول‌های مهارکننده مسیر TGFβ می‌توان به SB431542، A83-01 و Alk5i اشاره نمود. ریزمولکول SB431542 با مهار گیرنده TGFβ باعث عدم پیام‌رسانی می‌شود و در نتیجه میزان فسفریلاسیون Smad2 به‌شدت کاهش می‌یابد [۷۶-۷۴]. از طرف دیگر، نشان داده شده است که مهار توام مسیر MEK و TGF-β باعث راه اندازی مسیر BMP4 می‌شود. در این فرآیند SB با مهار فسفریلاسیون Smad2,3 از بیان عامل رونویسی smad7 که تنظیم کننده منفی مسیر خانواده TGF-β است ممانعت کرده و با حذف مهار از روی ژن‌های Id باعث افزایش اثر پیام رسانی BMP4 می‌شود [۱۸].

سیستم های کشت ایجاد شده توسط ریزمولکول‌ها

در مطالعات صورت گرفته مهار کننده‌های مسیرهای پیام رسانی اغلب به‌صورت منفرد و یا ترکیبی مورد استفاده قرار گرفته و رده‌های سلولی با کارآیی‌های متفاوت ایجاد شده است. بنابراین، ترکیبی مناسب و موثر از مهار کننده‌ها می‌تواند نقش به‌سزایی در افزایش کارآیی تولید رده‌های سلولی داشته باشد.

ترکیب محیط کشت 3i

مطالعات نشان داده‌اند که ترکیب سه ریزمولکول مهار کننده شامل مهارکننده گیرنده FGF (SU5402)، مهار کننده MAPK kinase یا Mek1/2 (PD184352) و مهار کننده GSK3 (CHIR99021) که تحت عنوان 3i شناخته می‌شود، خودنوزایی سلول‌های بنیادی پرتوان موش را در شرایط عاری از سرم و LIF به‌خوبی حفظ می‌کند. هم‌چنین، 3i باعث تولید سلول‌های بنیادی جنینی با کارآیی بالا از نژادهای مختلف موش می‌شود. رده‌های پرتوان موش که تا قبل از این به دلایل ناشناخته در شرایط سرم و LIF ایجاد نمی‌شدند، تحت تیمار با 3i به راحتی ایجاد شده‌اند [۷۹،۳۸-۷۷].

ترکیب محیط کشت 2i؛ پایانی بر تبعیض نژادی در فرآیند تولید سلول های بنیادی جنینی موش

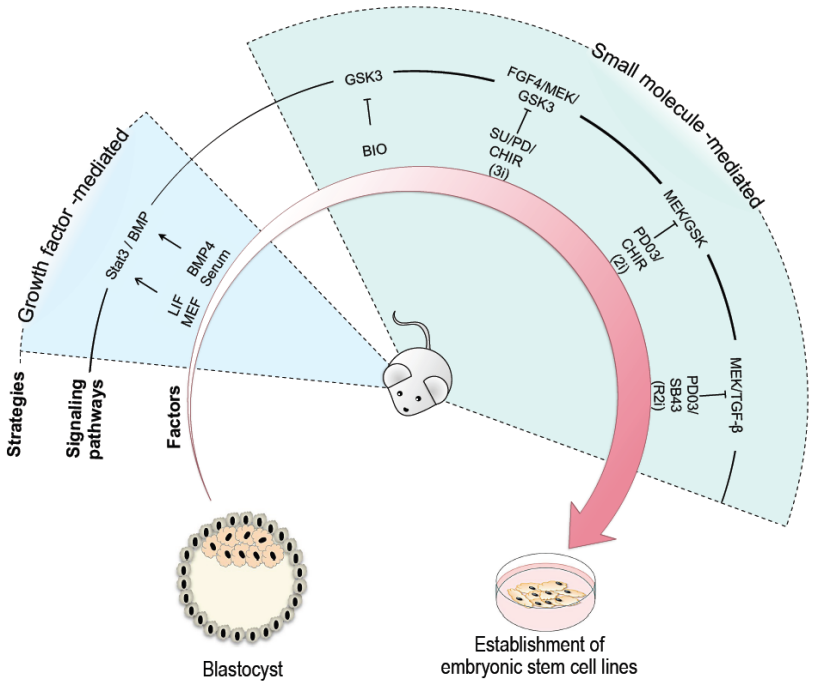
با به‌کارگیری مهار کننده قوی‌تر Mek تحت عنوان PD0325901، نیاز به مهار کننده گیرنده FGF برطرف شده و بنابراین ترکیب 2i، شامل دو ریزمولکول CHIR99021 و PD032591 به‌عنوان جایگزین بهتر 3i معرفی شد [۲۹]. در رابطه با مهار GSK3 در ترکیب 2i مطالعات اخیر نشان داده‌اند که اثر CHIR99021 وابسته به β-catenin است و اثر مشابه آن را تا حد زیادی با از میان برداشتن پروتئین برهم‌کنش دهنده با β-catenin یعنی Tcf3 (Transcription Factor 3) می‌توان مشاهده کرد [۸۰،۵۵]. اگرچه، ترکیب 2i ویژگی‌های قابل توجهی از خود نشان داده و تاثیر فاکتور نژاد را در فرآیند تولید سلول‌های بنیادی جنینی موشی حذف کرده است، اما به‌دلیل استفاده از مهار کننده مولکول GSK3 و چالش‌های مرتبط با آن هنوز در پاسخ‌گویی به مکانیسم‌های دقیق حاکم بر پرتوانی دچار مشکلات جدی است. علاوه بر بحث‌های چالش برانگیز که در مورد مهار GSK3 مطرح است، عملکرد منفی مهار GSK3 بر حفظ تمامیت ژنومی نیز مورد بحث است. مطالعات مختلف نشان داده‌اند که مهار - کننده‌های GSK3، از فرآیند جدا شدن کروموزومی در تقسیم سلولی ممانعت می‌کنند [۸۱]. بنابراین، مهار GSK3 به‌دلیل عملکرد گسترده آن در درون سلول و به مخاطره انداختن تمامیت ژنومی برای تولید و حفظ سلول‌های پرتوان موش گزینه مناسبی نبوده و نمی‌تواند مکانیسم‌های دقیق حاکم بر پرتوانی را مشخص سازد. بنابراین، جایگزین کردن دیگر مسیرهای موثر در پرتوانی مورد توجه قرار گرفت.

ترکیب محیط کشت R2i؛ شرایطی بهینه برای تولید سلول‌های بنیادی جنینی موش

در راستای تولید رده سلول‌های بنیادی جنینی پژوهشگاه رویان روش جدیدی برای تولید موثر سلول‌های بنیادی جنینی موش از نژادهای مقاوم به تولید رده معرفی کرده است. با استفاده از ریزمولکول‌های PD0325901 و SB431542 که به ترتیب مهار کننده مسیرهای تمایزی MAPK و TGF-β می‌باشند و تحت عنوان Royan 2 inhibitors یا R2i معرفی شده است، می‌توان از نژادهای مقاوم به تولید رده، با کارآیی ۱۰۰ درصد رده‌های پرتوان سلول‌های بنیادی جنینی تحت شرایط متعارف کشت تولید کرد. ریزمولکول SB431542 با کاهش میزان فسفریلاسیون Smad2 در سلول‌های رشد یافته فعالیت مسیر TGFβ را مهار می‌کند. این رده‌ها تمامی ویژگی‌های رده‌های پرتوان شامل مورفولوژی، بیان مارکرهای پرتوانی از قبیل OCT4، SSEA1 و آلکالین فسفاتاز، تمایز درون آزمایشگاهی با حذف فاکتور رشد LIF و تشکیل کایمر پس از تزریق به سیتوپلاسم میزبان را به‌خوبی نشان دادند. هم‌چنین، ترکیب R2i باعث تولید موثر سلول‌های بنیادی جنینی موشی از تک بلاستومرهای جنین‌های ۲، ۴ و ۸ سلولی و رده‌های پرتوان از گونه بسیار مقاوم به تولید موش صحرایی نیز شده است. تولید کلونی از تک سلول‌ها و مهمتر از همه، حفاظت از تمامیت ژنومی از دیگر مزایای مهم این ترکیب به‌شمار می‌آید [۲۸،۲۷].

نتیجه‌گیری

سلول‌های بنیادی انسانی می‌توانند آینده درخشانی را در زمینه استفاده در پزشکی ترمیمی و سلول درمانی رقم زنند و با تمایز به سلول‌های خاص به‌عنوان مدلی مناسب برای بررسی داروها مورد استفاده قرار گیرند. از این‌رو، تولید و حفظ این سلول‌ها در شرایط برون‌تنی مورد توجه قرار گرفته است. امروزه یکی از چالش‌هایی که در مورد سلول‌های بنیادی انسانی وجود دارد، عدم موفقیت در کارآیی تولید این سلول‌ها است. بنابراین، دانش مولکولی mESCs می‌تواند در راستای بالا بردن کارآیی تولید سلول‌های بنیادی انسانی مورد استفاده قرار گیرد. هدف از نگارش این مقاله مروری، بررسی روند پیشرفت و افزایش کارآیی تولید و حفظ سلول‌های بنیادی جنینی موشی با تاکید بر اهمیت مسیرهای پیام‌رسانی و عوامل تاثیرگذار بر این مسیرها بود (شکل شماره ۶).



شکل شماره ۶- شکل شماتیک روند پیشرفت تولید سلول‌های بنیادی جنینی موشی با واسطه فاکتورهای رشد و ریز مولکول‌ها به‌همراه مسیرهای پیام رسانی مرتبط

برهم‌کنش بین مسیرهای پیام رسانی، محرک‌های خارجی، عوامل رونویسی مرتبط و انعطاف پذیری سلول‌های بنیادی جنینی در پاسخ به این عوامل نقش مهمی در حفظ پرتوانی و یا آغاز تمایز ایفا می‌کند. با توجه به اینکه شرایط کشت R2i باعث افزایش کارآیی تولید و حفظ سلول‌های بنیادی جنینی شده است؛ بنابراین، به‌نظر می‌رسد با مهار مسیرهای MEK و TGFβ در این فرآیند تعداد بیشتری از سلول‌ها در یک وضعیت پایه پرتوانی و عدم تمایز یافتگی قرار دارند. به‌منظور بررسی مکانیسم اثر R2i در تولید رده، بررسی تغییرات مولکولی پویا مانند ارزیابی روند تغییر بیان ژن‌های کلیدی بنیادینگی و تمایزی، ارزیابی بیان ژن‌های اپی‌ژنتیکی و الگوی متیلاسیون ژنومی حین فرآیند تولید سلول‌های بنیادی جنینی از ICM ضروری به‌نظر می‌رسد. از این‌رو، امیدواریم تا با شناسایی دقیق‌تر مکانیسم‌های موثر درک بهتری از روند تولید سلول‌های بنیادی موش حاصل شده و بر اساس آن در آینده‌ای نه چندان دور الگوی مناسبی برای تولید و حفظ پایدار سلول‌های بنیادی انسانی ارائه شود.

تشکر و قدردانی

از سرکار خانم دکتر نفیسه حسنی برای مساعدت و همکاری ایشان در نگارش علمی این مقاله و از سرکار خانم راضیه کرم‌زاده برای مساعدت در طراحی شکل شماره ۶ مقاله، کمال تشکر و قدردانی را داریم. این مطالعه حاصل حمایت مالی از طرف پژوهشگاه رویان بوده و نویسندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را از مسئولین محترم آن پژوهشگاه ابراز می‌دارند.

References:

[1] Suwinska A, Czolowska R, Ozdzenski W, Tarkowski AK. Blastomeres of the mouse embryo lose totipotency after the fifth cleavage division: expression of Cdx2 and Oct4 and developmental potential of inner and outer blastomeres of 16- and 32-cell embryos. ***Dev Biol*** 2008; 322(1): 133-44.

[2] Solter D. From teratocarcinomas to embryonic stem cells and beyond: a history of embryonic stem cell research. ***Nat Rev Genet*** 2006; 7(4): 319-27.

[3] Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. ***Nat Biotechnol*** 2000; 18(4): 399-404.

[4] Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. ***Science*** 1998; 282(5391): 1145-7.

[5] Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, Wong GG, Moreau J, Stahl M, et al. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. ***Nature*** 1988; 336(6200): 688-90.

[6] Niwa H. How is pluripotency determined and maintained? ***Development*** 2007; 134(4): 635-46.

[7] Suzuki O, Matsuda J, Takano K, Yamamoto Y, Asano T, Naiki M, et al. Effect of genetic background on establishment of mouse embryonic stem cells. ***Exp Anim*** 1999; 48(3): 213-6.

[8] Baharvand H, Taee A. Effects of mouse strain on establishment of embryonic stem cell lines. ***J Iran Anatomical Sci*** 2004; 2: 21-31.

[9] Ding J, Xu H, Faiola F, Ma'ayan A, Wang J. Oct4 links multiple epigenetic pathways to the pluripotency network. ***Cell Res*** 2012; 22(1): 155-67.

[10] Tang F, Barbacioru C, Bao S, Lee C, Nordman E, Wang X, et al. Tracing the derivation of embryonic stem cells from the inner cell mass by single-cell RNA-Seq analysis. ***Cell Stem Cell*** 2010; 6(5): 468-78.

[11] Alvarez CV, Garcia-Lavandeira M, Garcia-Rendueles ME, Diaz-Rodriguez E, Garcia-Rendueles AR, Perez-Romero S, et al. Defining stem cell types: understanding the therapeutic potential of ESCs, ASCs, and iPS cells. ***J Mol Endocrinol*** 2012; 49(2): R89-111.

[12] Yu J, Thomson JA. Pluripotent stem cell lines. ***Genes Dev*** 2008; 22(15): 1987-97.

[13] Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. ***Nature*** 1981; 292(5819): 154-6.

[14] Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. ***Proc Natl Acad Sci U S A*** 1981; 78(12): 7634-8.

[15] Martin GR, Evans MJ. Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: formation of embryoid bodies in vitro. ***Proc Natl Acad Sci U S A*** 1975; 72(4): 1441-5.

[16] Bradley A, Evans M, Kaufman MH, Robertson E. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. ***Nature*** 1984; 309(5965): 255-6.

[17] Williams RL, Hilton DJ, Pease S, Willson TA, Stewart CL, Gearing DP, et al. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. ***Nature*** 1988; 336(6200): 684-7.

[18] Ying QL, Nichols J, Chambers I, Smith A. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. ***Cell*** 2003; 115(3): 281-92.

[19] Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I, Kontgen F, et al. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. ***Nature*** 1992; 359(6390): 76-9.

[20] Matsuda T, Nakamura T, Nakao K, Arai T, Katsuki M, Heike T, et al. STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. ***EMBO J*** 1999; 18(15): 4261-9.

[21] Niwa H, Burdon T, Chambers I, Smith A. Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. ***Genes Development*** 1998; 12(13): 2048-60.

[22] Burdon T, Chambers I, Stracey C, Niwa H, Smith A. Signaling mechanisms regulating self-renewal and differentiation of pluripotent embryonic stem cells. ***Cells Tissues Organs*** 1999; 165(3-4): 131-43.

[23] Ogawa K, Saito A, Matsui H, Suzuki H, Ohtsuka S, Shimosato D, et al. Activin-Nodal signaling is involved in propagation of mouse embryonic stem cells. ***J Cell Sci*** 2007; 120(Pt 1): 55-65.

[24] Nichols J, Smith A. Pluripotency in the embryo and in culture. ***Cold Spring Harb Perspect Biol*** 2012; 4(8): a008128.

[25] Zhang Y, Li W, Laurent T, Ding S. Small molecules, big roles -- the chemical manipulation of stem cell fate and somatic cell reprogramming. ***J Cell Sci*** 2012;125(Pt 23): 5609-20.

[26] Xu Y, Shi Y, Ding S. A chemical approach to stem-cell biology and regenerative medicine. ***Nature*** 2008; 453(7193): 338-44.

[27] Hassani SN, Totonchi M, Farrokhi A, Taei A, Larijani MR, Gourabi H, et al. Simultaneous suppression of TGF-beta and ERK signaling contributes to the highly efficient and reproducible generation of mouse embryonic stem cells from previously considered refractory and non-permissive strains. ***Stem Cell Rev*** 2012; 8(2): 472-81.

[28] Hassani SN, Totonchi M, Sharifi-Zarchi A, Mollamohammadi S, Pakzad M, Moradi S, et al. Inhibition of TGFbeta signaling promotes ground state pluripotency. ***Stem Cell Rev*** 2014; 10(1): 16-30.

[29] Wray J, Kalkan T, Smith AG. The ground state of pluripotency. ***Biochem Soc Trans*** 2010; 38(4): 1027-32.
[30] Mollamohammadi S, Taei A, Pakzad M, Totonchi M, Seifinejad A, Masoudi N, et al. A simple and efficient cryopreservation method for feeder-free dissociated human induced pluripotent stem cells and human embryonic stem cells. ***Hum Reprod*** 2009; 24(10): 2468-76.
[31] Pakzad M, Totonchi M, Taei A, Seifinejad A, Hassani SN, Baharvand H. Presence of a ROCK inhibitor in extracellular matrix supports more undifferentiated growth of feeder-free human embryonic and induced pluripotent stem cells upon passaging. ***Stem Cell Rev*** 2010; 6(1): 96-107.
[32] Lanner F, Rossant J. The role of FGF/Erk signaling in pluripotent cells. ***Development*** 2010; 137(20): 3351-60.
[33] Burdon T, Stracey C, Chambers I, Nichols J, Smith A. Suppression of SHP-2 and ERK signalling promotes self-renewal of mouse embryonic stem cells. ***Dev Biol*** 1999; 210(1): 30-43.
[34] Kunath T, Saba-El-Leil MK, Almousailleakh M, Wray J, Meloche S, Smith A. FGF stimulation of the Erk1/2 signalling cascade triggers transition of pluripotent embryonic stem cells from self-renewal to lineage commitment. ***Development*** 2007; 134(16): 2895-902.
[35] Masui S, Nakatake Y, Toyooka Y, Shimosato D, Yagi R, Takahashi K, et al. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. ***Nature Cell Biol*** 2007; 9(6): 625-35.
[36] Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. ***Nat Genet*** 2000; 24(4): 372-6.
[37] Yuan H, Corbi N, Basilico C, Dailey L. Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3. ***Genes Dev*** 1995; 9(21): 2635-45.
[38] Ying QL, Wray J, Nichols J, Batlle-Morera L, Doble B, Woodgett J, et al. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. ***Nature*** 2008; 453(7194): 519-23.
[39] Chen S, Do JT, Zhang Q, Yao S, Yan F, Peters EC, et al. Self-renewal of embryonic stem cells by a small molecule. ***Proc Natl Acad Sci U S A*** 2006; 103(46): 17266-71.
[40] Alessi DR, Cuenda A, Cohen P, Dudley DT, Saltiel AR. PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. ***J Biol Chem*** 1995; 270(46): 27489-94.
[41] Barrett SD, Bridges AJ, Dudley DT, Saltiel AR, Fergus JH, Flamme CM, et al. The discovery of the benzhydroxamate MEK inhibitors CI-1040 and PD 0325901. ***Bioorg Med Chem Lett*** 2008; 18(24): 6501-4.
[42] Delaney AM, Printen JA, Chen H, Fauman EB, Dudley DT. Identification of a novel mitogen-activated protein kinase kinase activation domain recognized by the inhibitor PD 184352. ***Mol Cell Biol*** 2002; 22(21): 7593-602.
[43] Li J, Wang G, Wang C, Zhao Y, Zhang H, Tan Z, et al. MEK/ERK signaling contributes to the maintenance of human embryonic stem cell self-renewal. ***Differentiation*** 2007; 75(4): 299-307.
[44] Mohammadi M, McMahon G, Sun L, Tang C, Hirth P, Yeh BK, et al. Structures of the tyrosine kinase domain of fibroblast growth factor receptor in complex with inhibitors. ***Science*** 1997; 276(5314): 955-60.
[45] Batlle-Morera L, Smith A, Nichols J. Parameters influencing derivation of embryonic stem cells from murine embryos. ***Genesis*** 2008; 46(12): 758-67.
[46] Sato N, Meijer L, Skaltsounis L, Greengard P, Brivanlou AH. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. ***Nat Med*** 2004; 10(1): 55-63.
[47] Cartwright P, McLean C, Sheppard A, Rivett D, Jones K, Dalton S. LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. ***Development*** 2005; 132(5): 885-96.
[48] Ogawa K, Nishinakamura R, Iwamatsu Y, Shimosato D, Niwa H. Synergistic action of Wnt and LIF in maintaining pluripotency of mouse ES cells. ***Biochem Biophys Res Commun*** 2006; 343(1): 159-66.
[49] Valvezan AJ, Zhang F, Diehl JA, Klein PS. Adenomatous polyposis coli (APC) regulates multiple signaling pathways by enhancing glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) activity. ***J Biol Chem*** 2012; 287(6): 3823-32.
[50] Dreesen O, Brivanlou AH. Signaling pathways in cancer and embryonic stem cells. ***Stem Cell Rev*** 2007; 3(1): 7-17.
[51] Cole MF, Johnstone SE, Newman JJ, Kagey MH, Young RA. Tcf3 is an integral component of the core regulatory circuitry of embryonic stem cells. ***Genes Dev*** 2008; 22(6): 746-55.
[52] Pereira L, Yi F, Merrill BJ. Repression of Nanog gene transcription by Tcf3 limits embryonic stem cell self-renewal. ***Mol Cell Biol*** 2006; 26(20): 7479-91.
[53] Guo G, Huang Y, Humphreys P, Wang X, Smith A. A PiggyBac-based recessive screening method to identify pluripotency regulators. ***PloS One*** 2011; 6(4): e18189.
[54] Buehr M, Smith A. Genesis of embryonic stem cells. ***Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*** 2003; 358(1436): 1397-402.
[55] Wray J, Kalkan T, Gomez-Lopez S, Eckardt D, Cook A, Kemler R, et al. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 alleviates Tcf3 repression of the pluripotency network and increases embryonic stem cell resistance to differentiation. ***Nat Cell Biol*** 2011; 13(7): 838-45.

[56] Meijer L, Skaltsounis AL, Magiatis P, Polychronopoulos P, Knockaert M, Leost M, et al. GSK-3-selective inhibitors derived from Tyrian purple indirubins. ***Chem Biol*** 2003; 10(12): 1255-66.
[57] Hoessel R, Leclerc S, Endicott JA, Nobel ME, Lawrie A, Tunnah P, et al. Indirubin, the active constituent of a Chinese antileukaemia medicine, inhibits cyclin-dependent kinases. ***Nat Cell Biol*** 1999; 1(1): 60-7.
[58] Ye S, Tan L, Yang R, Fang B, Qu S, Schulze EN, et al. Pleiotropy of glycogen synthase kinase-3 inhibition by CHIR99021 promotes self-renewal of embryonic stem cells from refractory mouse strains. ***PloS One*** 2012; 7(4): e35892.
[59] Vanhaesebroeck B, Leevers SJ, Ahmadi K, Timms J, Katso R, Driscoll PC, et al. Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. ***Annu Rev Biochem*** 2001; 70: 535-602.
[60] Vanhaesebroeck B, Waterfield MD. Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. ***Exp Cell Res*** 1999; 253(1): 239-54.
[61] Brazil DP, Yang ZZ, Hemmings BA. Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. ***Trends Biochem Sci*** 2004; 29(5): 233-42.
[62] Hirai H, Karian P, Kikyo N. Regulation of embryonic stem cell self-renewal and pluripotency by leukaemia inhibitory factor. ***Biochem J*** 2011; 438(1): 11-23.
[63] Singh AM, Reynolds D, Cliff T, Ohtsuka S, Mattheyses AL, Sun Y, 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(3): 312-26.
[64] Welham MJ, Storm MP, Kingham E, Bone HK. Phosphoinositide 3-kinases and regulation of embryonic stem cell fate. ***Biochem SocTrans*** 2007; 35(Pt 2): 225-8.
[65] Bechard M, Trost R, Singh AM, Dalton S. Frat is a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-regulated determinant of glycogen synthase kinase 3beta subcellular localization in pluripotent cells. ***Mol Cell Biol*** 2012; 32(2): 288-96.
[66] Hassani SN, Totonchi M, Gourabi H, Scholer HR, Baharvand H. Signaling roadmap modulating naive and primed pluripotency. ***Stem Cells Dev*** 2014; 23(3): 193-208.
[67] Fei T, Zhu S, Xia K, Zhang J, Li Z, Han JD, et al. Smad2 mediates Activin/Nodal signaling in mesendoderm differentiation of mouse embryonic stem cells. ***Cell Res*** 2010; 20(12): 1306-18.
[68] Galvin KE, Travis ED, Yee D, Magnuson T, Vivian JL. Nodal signaling regulates the bone morphogenic protein pluripotency pathway in mouse embryonic stem cells. ***J Biol Chem*** 2010; 285(26): 19747-56.
[69] James D, Levine AJ, Besser D, Hemmati-Brivanlou A. TGFbeta/activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. ***Development*** 2005; 132(6): 1273-82.
[70] Watabe T, Miyazono K. Roles of TGF-beta family signaling in stem cell renewal and differentiation. ***Cell Res*** 2009; 19(1): 103-15.
[71] Ichida JK, Blanchard J, Lam K, Son EY, Chung JE, Egli D, et al. A small-molecule inhibitor of tgf-Beta signaling replaces sox2 in reprogramming by inducing nanog. ***Cell Stem Cell*** 2009; 5(5): 491-503.
[72] Maherali N, Hochedlinger K. Tgfbeta signal inhibition cooperates in the induction of iPSCs and replaces Sox2 and cMyc. ***Curr Biol*** CB. 2009; 19(20): 1718-23.
[73] Yuan X, Wan H, Zhao X, Zhu S, Zhou Q, Ding S. Brief report: combined chemical treatment enables Oct4-induced reprogramming from mouse embryonic fibroblasts. ***Stem Cells*** 2011; 29(3): 549-53.
[74] Inman GJ, Nicolas FJ, Callahan JF, Harling JD, Gaster LM, Reith AD, et al. SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor-beta superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7. ***Mol Pharmacol*** 2002; 62(1): 65-74.
[75] Li J, Campanale NV, Liang RJ, Deane JA, Bertram JF, Ricardo SD. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase and transforming growth factor-beta1/Smad signaling pathways modulates the development of fibrosis in adriamycin-induced nephropathy. ***Am J Pathol*** 2006; 169(5): 1527-40.
[76] Tojo M, Hamashima Y, Hanyu A, Kajimoto T, Saitoh M, Miyazono K, et al. The ALK-5 inhibitor A-83-01 inhibits Smad signaling and epithelial-to-mesenchymal transition by transforming growth factor-beta. ***Cancer Sci*** 2005; 96(11): 791-800.
[77] Kiyonari H, Kaneko M, Abe S, Aizawa S. Three inhibitors of FGF receptor, ERK, and GSK3 establishes germline-competent embryonic stem cells of C57BL/6N mouse strain with high efficiency and stability. ***Genesis*** 2010; 48(5): 317-27.
[78] Nichols J, Jones K, Phillips JM, Newland SA, Roode M, Mansfield W, et al. Validated germline-competent embryonic stem cell lines from nonobese diabetic mice. ***Nat Med*** 2009; 15(7): 814-8.
[79] Yamagata K, Ueda J, Mizutani E, Saitou M, Wakayama T. Survival and death of epiblast cells during embryonic stem cell derivation revealed by long-term live-cell imaging with an Oct4 reporter system. ***Dev Biol*** 2010; 346(1): 90-101.
[80] Yi F, Pereira L, Hoffman JA, Shy BR, Yuen CM, Liu DR, et al. Opposing effects of Tcf3 and Tcf1 control Wnt stimulation of embryonic stem cell self-renewal. ***Nat Cell Biol*** 2011; 13(7): 762-70.
[81] Tighe A, Ray-Sinha A, Staples OD, Taylor SS. GSK-3 inhibitors induce chromosome instability. ***BMC Cell Biol*** 2007; 8: 34.