

Embriyonik Kök Hücre Belirteçleri

Embryonic Stem Cell Markers

DERLEME

Hatice İsan¹, Ayşe Uyanık², Ranan Gülhan Aktaş¹

¹Maltepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kanser ve Kök Hücre Araştırma Merkezi, İstanbul, Türkiye.

²İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye.

İletişim: Hatice İsan, Maltepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kanser ve Kök Hücre Araştırma Merkezi, İstanbul, Turkey. E mail: htcsn@gmail.com

ÖZET

Embriyonik kök hücre araştırmaları, embriyonik kök hücrelerin (EKH) sınırsız olarak kendilerini yenileyebilme özellikleri ve farklı hücre tiplerine dönüşebilme yetenekleri (plastisite) sayesinde regeneratif tıbbın en gözde konularından biri haline gelmiştir. Farklılaşmamış EKH'ler memeli pluripotent hücrelerine özel moleküler belirteçleri ifade etme özelliğine sahiptir. EKH'lerin farklılaşmadan kendilerini yenileyebilmesi ve pluripotensite özelliklerinin sağlanması için bu belirteçlerin uygun düzeyde olması gerekmektedir. Bu belirteçlerin ekspresyonundaki değişim embriyo gelişim safhalarının belirlenmesinde, farklı türlerdeki embriyoların tanımlanmasında ve karakterizasyonlarının ortaya çıkarılmasında etkin rol oynamaktadır. Bundan dolayı EKH belirteçlerinin görevlerinin daha iyi anlaşılması klinikteki tedavi metodlarının geliştirilmesine ve hastalık modellerinin araştırılmasına katkı sağlayacaktır. Sunulan derlemede EKH'ler, EKH belirteçleri ve bu belirteçlerin regülasyonu hakkında önemli bilgilerin özetlenmesi amaçlanmıştır.

Anahtar kelimeler: Transkripsiyon faktörler, Nanog, Oct4, Sox2, SSEA4.

GİRİŞ

Embriyonik kök hücreler (EKH), preimplantasyon blastosist dönemindeki iç hücre kitlesinden (İHK) köken alan hücrelerdir. Bu hücreler kendi kendilerini yenileyebilirler. Ayrıca; endoderm, mezoderm ve ektoderm olmak üzere üç hücre tabakasına da farklılaşabilen pluripotent özellikte hücrelerdir (1,2). Bu yüzden EKH'ler erken embriyonik gelişimin ve hücrelerin gelişimlerinin anlaşılmasında, dejeneratif hastalıklara ve yaralanmalara karşı hücre temelli tedavi metodlarının geliştirilmesinde eşsiz bir role sahiptir. İlk olarak fare İHK'sinden 1981 yılında, daha sonra insan blastosistlerinden 1998 yılında elde edilmiştir

SUMMARY

Research on embryonic stem cell has been the most popular subject of regenerative medicine because of the unlimited self-renewal ability and the convertibility to the different cell types (plasticity) of the embryonic stem cell (ESC)'s. Undifferentiated ESCs have a potential to express specific molecular markers specific for mammalian pluripotent cells. These molecular markers are required to be at certain adequate level to maintain pluripotency and renewal of ESCs without differentiation. The changes of the expression of these markers have crucial role on determination of embryo development stages, identification and characterization of embryos in different species. Therefore, studies related with the roles of ESCs markers will contribute to the development of new therapeutic models for clinical studies as well as to understand mechanism of the formation of diseases. The main aim of this review is to summarize breakthrough results of recent studies about ESCs, ESC markers and regulation of these markers. **Keywords:** Transcription factors, Nanog, Oct4, Sox2, SSEA4.

(2,3). EKH'ler hakkında çalışmalara başlandığından bu yana; EKH'lerin kendi kendini yenileme ve farklılaşma mekanizmaları üzerinde etkili olan sitokinler, transkripsiyon faktörleri ve yüzey belirteçleri gibi genetik ve epigenetik pek çok etken araştırılmıştır. Memeli blastosistlerinin iç hücre kitlelerinden kaynaklanan EKH'ler başka hücre tiplerine farklılaşma yeteneğine sahiptir. İHK'de gözlemlenen EKH'lerin bu pluripotensite özelliği pek çok transkripsiyon faktörü tarafından sağlanmaktadır. Transkripsiyon faktörleri organizmanın ihtiyaçlarına göre; uygun zamanda, uygun miktarda ve uygun hücrede gen ifadenmesinin sağlanmasında görev almaktadır.

Genlerin düzenlenmesinde; ifade artışına (up-regulation) yada ifade azalışına (down-regulation) yol açarlar. Aynı zamanda bu transkripsiyon faktörlerinin çoğu gelişim sürecinde aktif olarak rol oynarlar.

HÜCRE YÜZEY BELİRTEÇLERİ

Farklılaşmamış EKH'ler; memeli pluripotent hücrelerine spesifik moleküler belirteçleri eksprese etme özelliğine sahiptirler. İnsan EKH'lerinde sıkça eksprese edilen yüzey belirteçleri glikolipid yapıdaki antijenler olan SSEA-3 ve SSEA-4 ile proteoglikan yapıdaki TRA 1-60 ve TRA 1-81'dir. Hücre yüzey antijenleri hücrelerin tanımlanmasında ve hücrelerin farklılaşmasının analiz edilmesinde oldukça önemlidir. Özellikle seviye spesifik antijenler (SSA) gelişime bağlı olarak erken embriyonik safha boyunca düzenlenirler. Bu yüzden yüzey belirteçleri, hem fare hem de insan EKH'lerin farklılaşmasının gösterilmesinde sıklıkla kullanılan önemli belirteçlerdir.

Seviye Spesifik Embriyonik Antijenler (SSEA)

Seviye spesifik embriyonik antijenler karbonhidrat epitoplari içeren lakto ve globo-seri glikolipidlerdir (4,5). Gelişim süresince bu karbonhidrat ilişkili SSEA1, SSEA3 ve SSEA4 antijenler hücre yüzey etkileşimlerinin kontrolünde yer alırlar. SSEA-1 (CD15/ Lewis x) preimplantasyon aşamasındaki fare embriyolarında, fare ile insan germ hücrelerinde ve teratokarsinoma hücrelerinin yüzeyinde eksprese edilirken; insan EKH'lerinde ve insan embriyonik karsinoma hücrelerinde ekspresyonu bulunmamıştır (5,6). SSEA-1 ekspresyonu insan hücrelerinin farklılaşması sırasında artarken; fare hücrelerinin farklılaşması sırasında azalmaktadır. SSEA-3, farklılaşmamış primat EKH'lerinde, insan embriyonik germ hücrelerinde, insan EKH ve de teratokarsinoma hücrelerinde eksprese edilmektedir.

SSEA-4 seramid bağlı glikosfingolipid yapı ile ilişkili bir yüzey antijenidir. SSEA-4 ekspresyonu insanda döllenen yumurtada, primitif endoderimde, pre-implantasyon döneminde erken safhada bulunan embriyodaki İHK'sında ve embriyonal karsinoma hücrelerinde gözlenir; fakat blastosist aşamasında ve İHK'da eksprese edilmezler (7,8). Farklılaşmamış fare EKH'leri SSEA-4'ü eksprese etmezler. Farklılaşmış fare embriyonal karsinoma hücreleri ve EKH'lerinde SSEA4'ün varlığı gözlenmektedir (9,10).

TRA-1-60 ve TRA-1-81

İnsan pluripotent kök hücreleri ve embriyonal karsinoma hücrelerinin(11)yüzeyinde bulunan TRA-1-60 ve TRA-1-81 antijenleri EKH'lerin tanımlanması ve izolasyonunda sıklıkla kullanılan antijenlerdir. Ayrıca teratokarsinoma ve embriyonik germ hücrelerinde de ekspresyonları mevcuttur (12,13,14). İnsan ve fare embriyolarındaki yüzey belirteçlerinin ekspresyon zamanlarını kıyaslamak için yapılan çalışmada SSEA1, SSEA3, SSEA4, TRA-1-60 ve TRA-1-81 indirekt immünfloresan boyama yöntemiyle incelenmiştir. TRA-1-60, TRA-1-81, SSEA3 ve SSEA4 insanda zona pellusidasından ayrılan (hatch olan) blastosistlerde temel olarak İHK'de yer almaktadır. Aynı safhadaki

fare embriyolarında aynı belirteçler bulunmaz; fakat daha erken safhadaki bölünme döneminde varlıkları gözlemlenmiştir. Buna karşın SSEA1'in ekspresyonu insan blastosistlerin de trofektodermden sağlanırken, farelerde özellikle İHK olmak üzere trofektodermden de sağlanmaktadır (12).

TRANSKRİPSİYON FAKTÖRLERİ

Pluripotensiden sorumlu transkripsiyon faktörleri olan Nanog, Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc ve Lin 28 proteinleri yeniden programlama etkenleri olarak tanımlanmaktadır. Fare EKH'lerinin pluripotentiğinin sağlanmasında özellikle Oct4, Nanog ve Sox2 rol oynar. Bu transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonu İHK, epiblast ve farklılaşmamış EKH'lerde oldukça fazladır (15). Bu genlerin her birinin transkripsiyonunun eksikliğinde pluripotentiğin sağlanamamasından dolayı erken safhada embriyonik ölüm gerçekleşmektedir (16,17,18).

Nanog

Nanog proteini, hücrenin nükleer bileşenine lokalize olmuş, 305 aminoasit içeren DNA materyalinin bağlanmasını kolaylaştıran bir proteindir. Nanog proteini EKH'lerin, pluripotent özelliğini etkileyen bir faktördür. İlk kez kompaktlaşma safhasında görülür, implantasyonda varlığını sürdürürken,implantasyondan hemen sonra ekspresyon düzeyi düşer. Bu gen insan ile farenin embriyonik kök hücreleri ve embriyonikgerm hücreleri gibi farklılaşmamış hücrelerinde eksprese olurken; testis, over gibi farklılaşmış hücrelerde de saptanmıştır (17). Nanog, İHK'nin ortaya çıkmasında özellikle germ hücrelerinin oluşumunda gerekli bir proteindir. Aynı zamanda in vitro olarak farklılaşmanın engellenmesinde önemli rolü olan bir transkripsiyon faktörüdür (19). Nanog geninin mRNA'sı insan ve farenin pluripotent hücrelerinde bulunurken, olgunlaşmış hücrelerde bulunmamaktadır. Nanog geninin eksprese olmaması, hem EKH'lerin hem de İHK'nın kendi kendini yenileme özelliklerinin kaybına yol açar. Bu durum EKH'lerin ekstraembriyonik doku hücrelerine dönüşmelerini indükler (17,20).

Oct4

Oct-4, EKH'lerin pluripotensi özelliğinin korunmasında ana rol oynayan bir proteindir. Bu nedenle bu hücrelerin teşhisinde en iyi bilinen ve en çok kullanılanıdır. Fare blastosistineosit tarafından getirilen ve embriyo gelişiminde ifade düzeyi kontrol altında tutulan bir transkripsiyon faktörüdür. Oct4 transkripsiyon faktörü, insanda POU5f1 geni tarafından kodlanır. Blastosist evresindeki embriyonun iç hücre kitlesinde eksprese olur ve farklılaşma süresi boyunca ekspresyonu azalır. Bu faktörün ifade seviyesi değişkenlik göstermekle beraber hücre kaderinin belirlenmesinde oldukça önemlidir, eksik veya fazla eksprese olması EKH'lerin farklılaşmasına yol açar. Embriyonik kök hücrelerin gelişiminde bu transkripsiyon faktörünün ifade seviyesinin 3 önemli etkisi gözlemlenmektedir: Oct-4 ifadesindeki artış, hücrelerin primitif endoderm ve mezoderm

yönünde farklılaşmasına neden olmaktadır. Düşük seviyede ifade edildiğinde ise; hücreler pluripotent özellikte kalmakta ve farklılaşma olmamaktadır. İfadesinin baskılanması ve eksik ifadenmesi durumunda hücrelerin pluripotensite kapasiteleri kaybolmakta ve sonucunda bu hücreler trofektoderm yönünde farklılaşmaktadır (21). Oct4 protein seviyesi gastrulasyon aşamasında belirli seviyelerde seyrederek. Primitif endoderm hücreleri farklılaşmaya ve ektoderme göç etmeye başladıklarında, bu hücrelerin Oct4 protein seviyeleri geçici olarak artar. Daha sonra Oct4 gen ekspresyonu primitif endoderm ve epiblast hücrelerinde baskılanır. Gastrulasyon aşamasında seyreden bu durum embriyo implantasyon aşamasında da aynıdır. Son olarak Oct4 gen ekspresyonu primordiyal germ hücrelerini baskılar; bu hücreler ekstra embriyonik mezodermin ilk özelleşen hücreleridir. Oct4 farklılaşmış hücrelerde ekspresyon olmaz. İnsanda İHK hücrelerinde trofektoderm hücrelerine kıyasla daha fazladır. Oct4 geni fare oositlerinde ana transkripsiyon faktörü olarak ekspresyon edilir. Zigotun ilk yarıklanmasında kaybolur, embriyo dört hücreli aşamaya geldiğinde tekrar görülür. Bu gen gastrulasyon sonrası farklılaşmış hücrelerde bulunmaz (22). Sox2 Sox2 geni EKH'lerin pluripotensite özelliğinin korunması için vazgeçilmez bir genidir (23). Morula ve blastosist gibi erken embriyonik safhalarda, germ hücrelerinde ve epiblastta ifade edilir. Embriyo gelişiminde Sox2 geninin ifadesinin baskılanması durumunda epiblast oluşumunda bazı sorunların gelişmesinden dolayı embriyolar yok olur. Trofektodermal ve kısmen endodermal farklılaşmayı engelleyerek EKH'lerin pluripotensiyel özelliğinin sürdürülmesinde gereklidir (24). Sox2'nin en önemli görevlerinden birisi de Oct4 ekspresyonunu regüle etmesidir. Yapılan çalışmalarda Sox2 ve Oct4'ün birbirinin ifadesini etkileyerek kök hücrelerin pluripotensite karakterinin oluşturulmasında görev aldıkları gösterilmiştir (23). Sox2'nin farelerdeki eksikliği hücrelerin %95'inin (23), insandaki eksikliği ise hücrelerin %98.5'inin (24) trofektoderm belirteçlerince pozitif hücrelere dönüşümüne yol açar. Sox2'nin farelerde artışı EKH'lerin çeşitli hücre tiplerine dönüşümüne, nöronal farklılaşmaya ya da kitlesel hücre ölümlerine yol açarken (25, 26); insanda artışı trofektoderm soyuna ait hücrelere dönüşümünü sağlar (24).

Klf:

Klf (Krupple-like factor) ailesi hücre proliferasyonu, farklılaşması, gelişimi ve apoptozisi olmak üzere pek çok biyolojik aktivitenin sürdürülmesini sağlar. Klf ailesinden Klf5, Oct4 ve Nanog'un transkripsiyonunu düzenlemekle beraber gelişimsel süreçte oldukça önemlidir. Klf4 ve Klf2 ise; EKH'lerin pluripotensiyel özelliğinin sağlanmasından sorumlu Nanog, Mycn gibi başka transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonlarını düzenlerler. Klf gen ailesi tek başlarına EKH'lerin kendilerini yenileme kapasitelerinde etkin rol oynamamaktadır (27).

Myc Ailesi:

Myc ailesi kanserle olan ilişkisi açısından proto-on-

kogen fonksiyon yürütmektedir. Yamanaka ve ark.'nın yaptığı çalışmada; c-Myc trans geninin reaktivasyon kazanması sonucu uyarılmış pluripotensite kök hücrelerinin yaklaşık %20'si ölümcül teratomlara neden olmuştur (28). Bunun sonucunda bu faktörün kullanılması, ciddi endişelere neden olmuştur. c-Myc, genomda yaklaşık 4.000 bölgeye bağlanıp genomun gevşemesini sağlayarak diğer transkripsiyon faktörlerinin genomla bağlanmasını kolaylaştırır.

Lin28:

mRNA bağlayan bir proteindir. EKH'ler ve embriyonik karsinoma hücrelerinde çoğalma ve farklılaşma döngüsünde rolü bulunmaktadır. Yu ve ark.'nın yaptığı çalışmada (insan hücrelerinin programlanması) Lin28'in kullanılabilirliğini göstermişlerdir; fakat daha sonra bu faktörün mutlak gerekli olmadığını gösterilmiştir (29).

Transkripsiyon Faktörlerinin Birbirleriyle İlişkisi:

Oct4, Nanog ve Sox2 genleri insan ve fare embriyonik kök hücrelerinde hücrelerin farklılaşmasında veya farklılaşmayı pluripotensiyel özelliğinin korunmasında rol oynayan önemli transkripsiyon faktörleridir. Ayrıca bu genlerin ekspresyonu hücrelere kendini yenileme özelliği sağlamaktadır. EKH'lerin pluripotensiyel oluşmasını sağlayan Fgf4, Utf1, Nanog ve Sox2 gibi pek çok transkripsiyon faktörünün fonksiyonunu, Oct-Sox aktivatörü gerçekleştirmektedir (30). Sox2 ve diğer Sox faktörleri (Sox4, Sox11, Sox15) Oct-Sox aktivatörüne bağlı genlerin ekspresyonunu önemli derecede etkilemektedir. Oct4 ekspresyonunu pozitif veya negatif yönden etkileyen çoklu genleri ise sadece Sox2 düzenlemektedir (23) Sox2, EKH'lerin kendi kendini yenileme fonksiyonlarında mutlak olarak gereklidir. Oct4 transkripsiyonel aktivasyonu ile oldukça ilişkili olan Sox2; EKH'lerin pluripotensiyel sağlanmasında eşsiz bir role sahiptir. Masui ve ark.'larının yaptığı çalışmalarda Sox2 seviyelerindeki azalma sonucu qPCR analiziyle 623 genin aktivasyonu, 648 genin inaktivasyona uğradığı gösterilmiştir. Bu gen değişiklikleri; Oct4 ve Nanog ekspresyonunda artış, Sox ailesinden Sox4, Sox11, Sox15' in ekspresyonundaysa azalışa sebep olmuştur (23). Nanog, Oct4 ve Stat3'ün pluripotensiyel sağlanmasında ve kendi kendini yenilemede rolleri kanıtlanmıştır. Preimplantasyon döneminde hücrelerin trofektoderme farklılaşacağına veya pluripotensite bir şekilde kalacağına ilk olarak morula safhasında karar verilir. Bu aşamada Nanog ekspresyonu düşük olduğu için anahtar yapı Oct4'tür. İkinci olarak hücrelerin primitif endoderme farklılaşacağına veya İHK hücrelerinin epiblast gibi pluripotensite bir şekilde kalacağına blastosist aşamasında karar verilir. Nanog bu aşamada ekspresyon edilmeye başlanır ve fonksiyonu hücrelerin geleceğinin belirlenmesinde çok kritiktir. Sonuç olarak EKH'lerin trofektoderme veya primitif endoderme farklılaşmasının önlenmesinde sırasıyla Oct4 ve Nanog temel yapı taşlarıdır. Ancak hücrelerin kendi kendini yenilemesinde bu faktörler yeterli değildir. Stat3 tarafından aktive edilmiş LIF (lösemi inhibitör faktör)'e ihtiyaç duyulmaktadır. Nanog'un etkisi

ilişkilidir (17). Sonuç olarak preimplantasyon morula döneminde Oct4 ve Sox2'nin, blastosist dönemindeyse Oct4 ve Sox2'ye ilaveten Nanog'un da EKH'lerin farklılaşmasında önemli rolü olduğu gösterilmiştir. EKH'lerde Sox2 gen ekspresyonu kendisi ve Oct-4 geni tarafından, Oct-4 gen ekspresyonu ise kendisi ve Sox2 geni tarafından düzenlenmektedir (31).

| Tablo1 | | | | |
|------------|-----------|--------|-----|------------|
| İnsan | | | | |
| Antijenler | 2-8 Hücre | Morula | İHK | Trofoblast |
| SSEA1 | - | + | - | + |
| SSEA3 | - | + | | - |
| SSEA4 | - | + | | - |
| TRA-1-60 | - | + | ++ | - |
| TRA-1-81 | - | - | ++ | - |
| Fare | | | | |
| SSEA1 | + | + | ++ | + |
| SSEA3 | + | + | - | - |
| SSEA4 | + | ++ | - | - |
| TRA-1-60 | + | - | - | - |
| TRA-1-81 | - | - | - | - |

Tablo: 1. İnsan ve fare embriyolarında preimplantasyon safhalarındaki hücre yüzey antijen ekspresyonları(12).

SONUÇ

Bir embriyonun normal gelişim sürecini tamamlayabilmesi için kök hücre belirteçlerinin embriyo gelişim zamanına uygun şekilde dağılımını ve değişimini tamamlaması gerekir. Çok farklı fonksiyonlara sahip bu kök hücre belirteçlerinin artması ya da azalması; embriyonik kök hücrelerde morfolojik ve fonksiyonel değişikliklere, dolayısıyla da embriyo anomalilerine sebep olabilir. EKH'lerin farklı hücre tiplerine dönüşebilmelerinin temel mekanizmalarının incelenmesi, farklılaşma ve yönlendirmede rol alan genlerin araştırılması, türler arası EKH'lerin ayırımının yapılması bu yüzey belirteçleri ve transkripsiyon faktörleri mekanizmalarının ve fonksiyonlarının çok iyi bilinmesine bağlıdır. Embriyolarda kök hücre potansiyelindeki hücrelerin varlığının ve farklı kök hücre belirteçlerinin ifade düzeylerinin araştırılması; gerek embriyolar gerekse embriyonik kök hücreler ile ilgili araştırmalarda ve tedavilerde yol gösterici sonuçlar ortaya çıkaracaktır.

KAYNAKLAR

1. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from Mouse embryos. *Nature*, 1981;292:154-156.
2. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early Mouse embryo scultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*.1981;78:7634-7638.
3. Thomson Ja, Itskovitz-Eldor J, Shapiro Ss, et all. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*.1998; 282:1145-1147.
4. Shablott M.J, Axelman, J, Wang S, et all. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.1998; 95: 13726-13731.
5. Solter D, Knowles BB. Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (ssea-1). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1978; 75: 5565-5569.
6. Knowles BB, Aden DP, Solter D. Monoclonal antibody detecting a stage-specific embryonic antigen (ssea-1) on preimplantation mouse embryos and teratocarcinoma cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol*. 1978; 81: 51-53.
7. Shevinsky LH, Knowles BB, Damjanov I et all. Monoclonal antibody to murine embryos defines a stage-specific embryonic antigen expressed on mouse embryos and human teratocarcinoma cells. *Cell*. 1982; 30:697-705.
8. Kannagi R, Cochran NA, Ishigami F et all. Stage-specific embryonic antigens (SSEA-3 and -4) are epitopes of a unique globo-series ganglioside isolated from human teratocarcinoma cells. *Embo J*. 1983; 2:2355-2361.
9. Solter D, Shevinsky LH, Knowles BB et all. The induction of antigenic changes in a teratocarcinoma stem cell line (F9) by retinoic acid. *Dev Biol*. 1979; 70:515-521.
10. Silver LM, Martin GR, Strickland S, eds. *Teratocarcinoma Stem Cells*. Cold Spring Harbor, NY. Cold Spring Harbor Press. 1983; 635-646.
11. Andrews P.W,Banting G, Damjanov I, Arnaud D, Avner P. Three monoclonal antibodies defining distinct differentiation antigens associated with different high molecular weight polypeptides on the surface of human embryonal carcinoma cells. *Hybridoma*. 1984; 3: 347-361.
12. Henderson J.K, Draper J.S, Baillie H.S,et all. Preimplantation human embryos and embryonic stem cells show comparable expression of stage-specific embryonic antigens. *Stem Cells*. 2002; 20: 329-337.
13. Draper J.S, Pigott C, Thomson J.A, Andrews P.W. Surface antigens of human embryonic stem cells: Changes upon differentiation in culture. *J. Anat*. 2002; 200: 249-258.
14. Schopperle W.M, DeWolf W.C. The tra-1-60 and tra-1-81 human pluripotent stem cell markers are expressed on podocalyxin in embryonal carcinoma. *Stem Cells*. 2007; 25: 723-730.
15. Niwa, H. How is pluripotency determined and maintained? *Development*. 2007; 134: 635-646.

16. Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, et al. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell*. 1998; 95: 379–391.
17. Mitsui K, Takuzawa Y, Itoh H, et al. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*. 2003; 113: 631–642.
18. Avilion A, Nicolis S.K, Pevny L.H, et al Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev*. 2003; 17: 126–140.
19. Cavaleri F, Schöler H. Molecular Bases of Pluripotency. *Essentials of Stem Cell Biology*. Lanza R (Ed.), San Diego, USA, Academic Press. 2009; 39-60.
20. Chambers I, Colby D, Robertson M, et al. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*.2003;113(13): 643–655.
21. Wu G, Schöler HR. Role of Oct4 in the early embryo development. *Cell RegenLond*. 2014;3(1): 7.
22. NiwaH, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cell. *Nat Genet*. 2000;24: 372–6.
23. Masui S, Nakatake Y, Toyooka Y, et al. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat. Cell Biol*.2007;9: 625–635.
24. Adachi K, Suemori H, Yasuda Sh, Nakatsuji N, Kawase E. Role of SOX2 in maintaining pluripotency of human embryonic stem cells. *Genes to Cells*. 2010; 15: 455–469.
25. Kopp J.L, Ormsbee B.D, Desler, M. &Rizzino, A. Small increases in the level of sox2 trigger the differentiation of mouse embryonic stem cells. *Stem Cells*.2008; 26: 903– 911.
26. Zhao S, Nichols J, Smith A.G. & Li M. SoxB transcription factors specify neuroectodermal lineage choice in ES cells. *Mol. Cell. Neurosci*. 2004;27: 332–342.
27. Parisi S, Passaro F, Aloia, L, et al. Klf5 is involved in self-renewal of mouse embryonic stem cells. *J. Cell Sci*. 2008;121: 2629–2634.
28. Okita K, Ichisaka, T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 2007; 448: 313–317.
29. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin, II, Thomson JA. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007; 318: 1917-1920.
30. Maruyama M, Ichisaka T, Nakagawa M. & Yamanaka S. Differential roles for Sox15 and Sox2 in transcriptional control in mouse embryonic stem cells. *J. Biol. Chem*.2005; 280: 24371–24379 .
31. Okumura-Nakanishi N, Saito M, Niwa H, Ishikawa F. Oct-3/4 and Sox2 Regulate Oct-3/4 Gene in Embryonic Stem Cells. *The Journal Of Biological Chemistry*.2005; 280: 5307–5317.