

KESTABILAN KROMOSOM DAN PENGEKSPRESAN GEN SEL STEM
EMBRIONIK MANUSIA MEL-1 DENGAN PENKULTURAN
JANGKA PANJANG MENGGUNAKAN SISTEM BEBAS
SEL PEMBEKAL AUTOGENIK DARIPADA
SEL PROGENITOR MESENKIMANYA



TESIS YANG DIKEMUKAKAN UNTUK MEMPEROLEH IJAZAH SARJANA
SAINS PERUBATAN MOLEKUL

INSTITUT PERUBATAN MOLEKUL
UNIVERSITI KEBANGSAAN MALAYSIA
KUALA LUMPUR

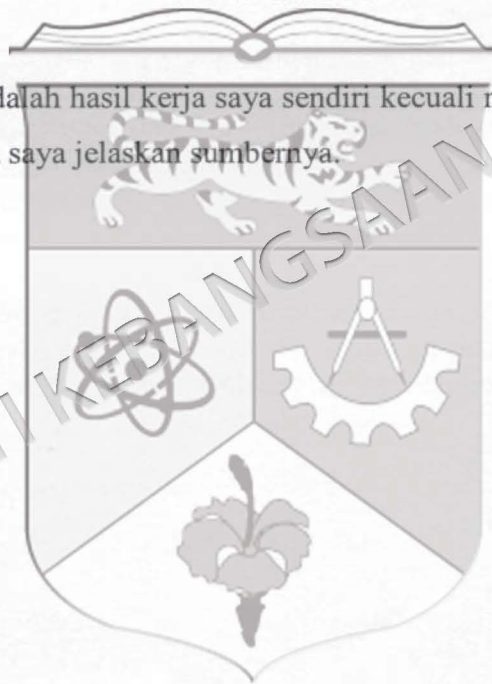
2015



PENGAKUAN

Saya akui karya ini adalah hasil kerja saya sendiri kecuali nukilan dan ringkasan yang tiap-tiap satunya telah saya jelaskan sumbernya.

30 Julai 2015

KHOO TZE SEAN
P 53356

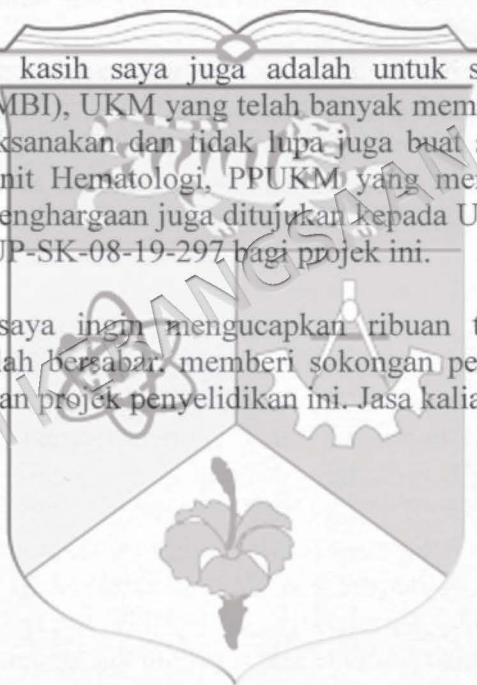
PENGHARGAAN

Saya ingin mengucapkan setinggi-tinggi penghargaan kepada penyelia utama saya Profesor Datuk Dr. A Rahman A Jamal di atas segala bimbingan, dorongan dan tunjuk ajar beliau untuk menjayakan projek penyelidikan ini. Ucapan setinggi-tinggi penghargaan juga adalah kepada kedua-dua penyelia bersama saya iaitu Profesor Datin Dr Noor Hamidah Hussin (juga ketua projek UKM-GUP-SK-08-19-297) dan Dr Then Sue Mian yang sering memberi bimbingan, tunjuk ajar dan nasihat semasa penyelidikan ini dijalankan. Segala kritikan membina dan kesabaran mereka amatlah dihargai.

Di samping itu, saya juga ingin merakamkan terima kasih kepada Dr Looi Mee Lee di atas bantuan teknikal semasa menjalankan eksperimen LC-MS/MS, dan kepada Prof Madya Dr CF Leong yang sudi menyumbangkan antibodi untuk analisa sitometri aliran sel hESc-MPC.

Ucapan terima kasih saya juga adalah untuk semua kakitangan Institut Perubatan Molekul (UMBI), UKM yang telah banyak memberi sokongan dan bantuan semasa kajian ini dilaksanakan dan tidak lupa juga buat semua rakan seperjuangan saya di UMBI dan Unit Hematologi, PPUKM yang memberikan dorongan moral kepada saya. Ucapan penghargaan juga ditujukan kepada UKM untuk geran universiti penyelidikan UKM-GUP-SK-08-19-297 bagi projek ini.

Akhir sekali, saya ingin mengucapkan ribuan terima kasih kepada ahli keluarga saya yang telah bersabar, memberi sokongan penuh dan dorongan kepada saya untuk melaksanakan projek penyelidikan ini. Jasa kalian amat saya hargai.



ABSTRAK


Sel stem embrionik manusia (hESc) merupakan sel pluripoten yang boleh memperbaharui diri justeru ia berpotensi tinggi dalam aplikasi perubatan regeneratif. Kekurangan substrat *xeno-free* ekstrasel (ECM) yang selamat digunakan menghadkan penggunaan derivatif sel hESc dalam aplikasi terapi penggantian sel. Keadaan kultur termasuk penggunaan medium dan substrat kultur yang suboptima merupakan faktor utama yang menyumbang kepada ketidakstabilan kromosom sel hESc. Kajian ini bertujuan untuk mengkaji kestabilan kromosom sel hESc dan menentukan ekspresi gen sel hESc dan sel induk mesenkima (MPC) semasa pengkulturan di atas ECM dalam jangka masa panjang. Kajian ini telah menggunakan titisan sel hESc (MEL-1). Sel MEL-1 dikultur atas ECM yang dipencilkan daripada sel MPC (autogenik) yang terhasil daripada sel hESc melalui protokol pembezaan yang novel yang dihasilkan dalam kajian ini. Pencirian sel MPC dan hESc telah dilakukan menggunakan teknik pewarnaan imunositokimia dan analisis aliran sitometri terhadap panel penanda sel stem mesenkima dan penanda pluripoten sel masing-masing. Asal usul sel MPC telah ditentukan dengan menjalankan analisis RT-PCR terhadap gen yang spesifik pada lapisan germa yang berlainan. Pencirian bagi fungsi sel hESc telah dilakukan dengan menggunakan asai pembentukan badan embriod. Analisis pengekspresan gen yang mengawalatur pluripotensi dan lanjut usia (*longevity*) sel telah dilakukan dengan RT-PCR manakala status penuaan (*senescence*) sel hESc dan MPC juga telah ditentukan melalui asai penuaan galaktosidase. Analisis kromosom sel hESc telah dilakukan dengan teknik kariotip piawai. Analisis pewarnaan imunositokimia dan aliran sitometri terhadap sel MPC menunjukkan ekspresi penanda-penanda awal sel mesenkima. Analisis spektrometer jisim bertandem terhadap campuran ECM yang terhasil daripada MPC menunjukkan kehadiran komponen protein ekstrasel seperti *tenascin C*, fibronectin, dan vitronectin. Kami menunjukkan sel hESc yang dikultur atas ECM kekal pluripotensinya selama 61 laluan dengan mengekspres protein penanda pluripotensi (SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-81, TRA-1-60, Oct-4) dan juga gen yang terlibat dalam pengawalaturan pluripotensi sel seperti FoxD3, Oct-4, Tdgf1, Sox-2, Nanog dan Rex1. Sel hESc tersebut didapati mempunyai kebolehan untuk membeza kepada sel mewakili lapisan ektoderma, endoderma, dan mesoderma. Sel hESc tersebut juga didapati mengekalkan ekspresi gen lanjut usia hTERT dan menunjukkan hasil pewarnaan yang negatif terhadap asai penuaan β -galaktosidase di samping menunjukkan kariotip yang normal (46-XY). Kesimpulannya, sel MEL-1 yang dikultur pada ECM tersebut telah menunjukkan kariotip yang normal dan ekspresi gen lanjut usia yang stabil. Sistem pengkulturan xenofree yang autogenik dan bebas daripada sel pembekal ini telah menyokong pengembangan sel hESc MEL-1 dengan stabil dan berpotensi dimajukan untuk aplikasi klinikal.

CHROMOSOMAL STABILITY AND GENE EXPRESSION UPON LONG TERM CULTURE OF MEL-1 HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS USING AUTOGENIC FEEDER FREE SYSTEM FROM ITS MESENCHYMAL PROGENITORS

ABSTRACT

Human embryonic stem cells (hESc) are known for their pluripotency and self-renewal capability, thus possessing great potential in regenerative medicine. The lack of suitable xeno-free extracellular substrates supporting the safe and stable propagation of hESc currently limits its applications in cell-based therapy. Culture conditions including culture medium and substrates are known to be the main factors which affect chromosome stability of hESc cells. This research was aimed to study the chromosome stability of hESc and determine the gene expression of hESc and its mesenchymal progenitor cells (MPC) upon long term culture on extracellular matrix (ECM). The hESc MEL-1 cell line was used in this study. The cells were cultured on the ECM that was isolated from the mesenchymal progenitor cells (autogenic) of MEL-1, via a novel differentiation protocol developed in this study. The characterization of the MPC and hESc were carried out via immunocytochemistry staining and flow cytometry analysis using a panel of mesenchymal stem cells markers and pluripotent markers respectively. The origin of the MPC was determined using RT-PCR analysis of germ layer specific genes. Functional characterization of pluripotency was performed by embryoid body formation assay. The expression of pluripotent and longevity genes was analyzed by RT-PCR while the state of senescence of hESc and MPC was analyzed by β -galactosidase senescence assay. Standard karyotyping was used to analyze the chromosomes of hESc. Immunocytochemistry and flow cytometry characterization of the MPC revealed the presence of early mesenchymal markers. Tandem mass spectrometry analysis of ECM produced by MPC revealed the presence of a mixture of extracellular proteins which includes tenascin C, fibronectin, and vitronectin. The pluripotency of the MEL-1 cells cultured on the ECM was maintained over 61 passages, as determined by the expression of pluripotent genes (FoxD3, Oct-4, Tdgf1, Sox-2, Nanog, Rex1), protein markers (SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-81, TRA-1-60, Oct-4) and the ability to differentiate into cells representative of ectoderm, endoderm and mesoderm. The hESc showed consistent expression of the longevity gene hTERT, normal 46-XY karyotype and showed negative result for β -galactosidase senescence assay after prolonged culture on the ECM. In conclusion, the MEL-1 cells had shown a normal karyotype and a stable expression of the longevity gene upon long term culture on the ECM. The resulting xeno-free autogenic feeder free system supports a stable expansion of the undifferentiated hESc MEL-1 cells which could be of clinical relevance.

KANDUNGAN

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
PENGAKUAN	ii
PENGHARGAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
SENARAI KANDUNGAN	vi
SENARAI JADUAL	xi
SENARAI ILUSTRASI	xii
SENARAI SINGKATAN	xv
	
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang Sel Stem Embrionik Manusia	1
1.2 Objektif Kajian	5
1.2.1 Objektif utama	5
1.2.2 Objektif spesifik	5
1.3 Hipotesis Kajian	5
BAB II ULASAN KEPUSTAKAAN	
2.1 Latar Belakang	6
2.2 Pengkulturan Sel Stem Embrionik	7
2.3 Pencirian Titisan Sel Stem Embrionik Manusia	11
2.4 Kestabilan Kromosom Sel Stem Embrionik	14
2.5 Sel Stem Dan Proses Penuaan	15
2.6 Latar Belakang Sel Stem Mesenkima (MSC)	16
2.7 Pencirian Sel Stem Mesenkima	17
2.8 Asal Sel MSC Dan Pembezaan Sel Stem Embrionik Kepada Sel MSC	18
2.9 Pembezaan Sel MSC Daripada Sel hESc	18

BAB III BAHAN DAN KAEDAH

3.1	Rekaan Kajian	20
3.1.1	Kelulusan etika penyelidikan	21
3.2	Titisan Sel Yang Digunakan	22
3.2.1	Kultur sel karsinoma embryo manusia (NTERA-2)	22
3.2.2	Kultur sel pembekal fibroblas embrionik mencit (MEF)	23
3.2.3	Persediaan sel MEF sebagai sel pembekal bagi pengkulturan sel hESc	24
3.2.4	Pengkulturan sel stem embrionik MEL-1	25
3.3	Pembezaan hESc Kepada MPC	28
3.3.1	Penentuan komposisi optimum bagi aruhan pembezaan hESc kepada MPC	28
3.3.2	Penentuan kepekatan medium yang optimum untuk pembezaan sel MEL-1 kepada sel mesenkima menerusi pencairan bersiri medium TeSR2	28
3.4	Penentuan Faktor Yang Menyumbang Kepada Pembezaan Sel MEL-1 Kepada Sel MPC	30
3.5	Pengkulturan Dan Pencirian Sel Mesenkima (MPC) Yang Terbeza Daripada Sel MEL-1	31
3.5.1	Pengkulturan sel MPC	31
3.5.2	Profil pertumbuhan sel MPC	31
3.5.3	Analisis penanda sel stem mesenkima dengan aliran sitometri	32
3.5.4	Analisa lokalisasi penanda sel stem mesenkima dengan mikroskop konfokal	34
3.6	Analisa Pengekspresan Gen Untuk Mengesan Asal Usul Sel MPC	35
3.6.1	Pengekstrakan RNA jumlah	35
3.6.2	Penentuan kepekatan dan kualiti RNA	35
3.6.3	Rawatan enzim DNase dan sintesis cDNA daripada RNA jumlah	36
3.6.4	Rekabentuk dan penyediaan primer	37
3.6.5	Tindak balas berantai kuantitatif (qPCR)	39
3.7	Pemencilan ECM Daripada Sel MPC	40
3.8	Penentuan Komposisi Protein ECM Yang Terhasil Daripada Sel MPC	40
3.9	Pengkulturan Sel MEL-1 Di Atas ECM Dan Matrigel	43
3.9.1	Pengkulturan sel MEL-1 di atas matrigel	43

3.9.2	Pengkulturan sel MEL-1 di atas ECM	43
3.9.3	Subkultur sel MEL-1 yang dikultur di atas ECM Dan matrigel	44
3.9.4	Pengawetankrio sel MEL-1	44
3.10	Pencirian Sel MEL-1 Yang Dikembangkan Di Atas ECM Dan Matrigel	45
3.10.1	Analisis aliran sitometri bagi protein penanda pluripoten	45
3.10.2	Analisis pewarnaan imunositokimia bagi protein penanda pluripoten	45
3.10.3	Analisis pengekspresan gen yang berkait rapat dengan pengawalaturan sifat pluripoten sel	46
3.10.4	Asai pembentukan badan embriod	49
3.10.5	Tindak balas berantai kuantitatif (qPCR)	50
3.11	Analisa Kariotip Dengan Kaedah Penjaluran-G (<i>G-Banding</i>)	51
3.11.1	Persediaan sebaran metafasa sel MEL-1	51
3.11.2	Pewarnaan Giemsa dan analisa penjaluran-G	51
3.12	Analisis Status Penuaan Sel Dengan Pewarnaan Galaktosidase- β	52
3.13	Analisa Pengekspresan Gen Yang Berkaitrapat Dengan Kestabilan Kromosom Dan Penuaan Sel	53
3.13.1	Pengekstrakan RNA jumlah	53
3.13.2	Tindak balas berantai polimerasi kuantitatif (qPCR)	55
3.14	Pemeriksaan Kontaminasi Mikoplasma Dalam Kultur Sel MEF, NTERA-2, DAN MEL-1	55
3.15	Analisa Statistik	56

BAB IV HASIL

4.1	Pengkulturan Sel NTERA-2, MEF Dan MEL-1	57
4.2	Pembezaan Sel MEL-1 hESc Kepada Sel Progenitor Mesenkima (MPC)	59
4.3	Penentuan Faktor Yang Menyumbang Kepada Pembezaan Sel MEL-1 Kepada Sel MPC	61
4.4	Pengkulturan Dan Pencirian Sel Mesenkima (MPC) Yang Terbeza Daripada Sel MEL-1	62
4.5	Analisa Pengekspresan Gen Untuk Mengesan Asal Usul Sel MPC	64
4.6	Penentuan Komposisi Protein ECM Yang Terhasil Daripada Sel MPC	65
4.7	Pengkulturan Dan Pencirian Sel MEL-1 Yang Dikultur Di Atas Matrigel Dan ECM	66

4.8	Analisa Kariotip Dengan Kaedah “G-Banding”	70
4.9	Analisis Status Penuaan Sel Dengan Pewarnaan Galaktosidase- β	72
4.10	Analisa Pengekspresan Gen Yang Terlibat Dalam Pengawalaturan Kestabilan Kromosom Dan Penuaan Sel	72
4.11	Pemeriksaan Kontaminasi Mikoplasma Dalam Kultur Sel MEF, NTERA-2, DAN MEL-1	74

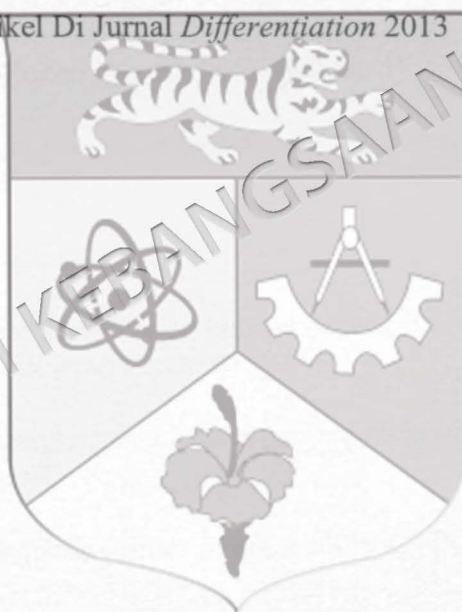
BAB V PERBINCANGAN

5.1	Pengkulturan Sel hESc	76
5.2	Pembezaan Sel hESc Kepada MPC	77
5.3	Penyediaan Protein ECM Daripada Sel MPC	82
5.4	Pengembangan, Pembiakan Dan Pencirian Sel hESc Di Atas ECM Dan Matrigel	84
5.5	Pengenalpastian Komposisi Protein ECM	86
5.6	Kestabilan Kromosom Melalui Analisa Kariotip Sel hESc	88
5.7	Status Penuaan Sel Dan Profil Pengekspresan Gen Yang Mengawalatur Kestabilan Kromosom Dan Penuaan Sel hESc	89

BAB VI KESIMPULAN

6.1	Kesimpulan Keseluruhan	91
6.2	Limitasi Kajian Dan Cadangan Kajian Lanjutan	92

RUJUKAN	94
LAMPIRAN	
A Surat Kelulusan Jawatankuasa Etika Penyelidikan	106
B Abstrak Pembentangan Poster <i>First Asian Federation Of Haematology Scientific Meeting 2010</i>	107
C Abstrak Pembentangan Poster <i>The 9th Annual Scientific Meeting Of The College Of Pathologists, Academy Of Medicine Malaysia</i>	108
D Abstrak Pembentangan Poster <i>Regional Conference On Molecular Medicine (RCMM) 2011</i>	109
E Abstrak Pembentangan Poster <i>1st National Stem Cell Congress 2012</i>	110
F Penerbitan Artikel Di Jurnal <i>Differentiation 2013</i>	111



SENARAI JADUAL

No. Jadual		Halaman
3.1	Penyediaan campuran medium F-DMEM untuk pengkulturan sel MEF	24
3.2	Komponen medium hESc-CM	27
3.3	Komponen medium ES-HEPES	27
3.4	Senarai antibodi yang digunakan untuk analisa aliran sitometri	33
3.5	Penyediaan campuran reaksi transkripsi berbalik	37
3.6	Profil reaksi transkripsi berbalik	37
3.7	Senarai jujukan primer untuk analisa qPCR	38
3.8	Penyediaan campuran tindak balas berantai kuantitatif (qPCR)	39
3.9	Profil tindak balas qPCR	39
3.10	Penyediaan lengkungan normal piawai BSA untuk pengasaan Bradford	41
3.11	Profil kecerunan pemisahan peptida melalui sistem kromatografi cecair	42
3.12	Senarai jujukan primer untuk analisa RT-PCR	48
3.13	Persediaan larutan pengesanan SA- β -gal	53
3.14	Senarai jujukan primer untuk analisa RT-PCR	54
4.1	Senarai protein ECM dirembes oleh sel MPC yang dikenalpasti dengan alat spektrometer jisim (LC-MS/MS)	66

SENARAI ILUSTRASI

No. Rajah		Halaman
2.1	Koloni sel stem embrionik manusia (hESc) yang dikultur di atas lapisan sel pembekal fibroblas embrionik mencit (MEF)	9
3.1	Carta alir rekabentuk eksperimen kajian secara keseluruhan	21
3.2	Rekabentuk eksperimen untuk menentukan faktor utama yang menyumbang kepada pembezaan sel MEL-1 kepada sel mesenkima	30
4.1	Sel NTERA-2 apabila diperhatikan bawah mikroskop fasa kontras menunjukkan morfologi sel berbentuk epitelium dengan nisbah nukleus:sitoplasma yang tinggi dan bertumbuh dengan rapat dan padat	57
4.2	Sel NTERA-2 mengekspres penanda pluripoten SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, dan OCT-4 tetapi tidak mengekspres penanda pembezaan awal SSEA-1	58
4.3	a) Sel MEF apabila diperhatikan di bawah mikroskop fasa kontras menunjukkan morfologi sel berbentuk gelendong. b) Sel MEL-1 menunjukkan pembezaan spontan yang melampau apabila dikultur bersama dengan sel MEF	58
4.4	Peratusan agregat sel MEL-1 melekat pada permukaan plat apabila dirangsang dengan medium pembezaan dengan faktor pencairan yang berlainan selama 9 hari	59
4.5	Pembezaan sel MEL-1 fasa pertama menghasilkan agregat sel yang melekat pada permukaan plat, mengembang dan membentuk lapisan sel yang berbentuk epitelium	60
4.6	Pembezaan fasa kedua menghasilkan sel MPC yang berbentuk gelendong	60
4.7	Sel MEL-1 didapati tidak membeza apabila dikultur dalam keadaan 2D, samada dengan a) medium pembezaan ataupun b) medium hESc. Hanya sel MEL-1 hESc yang membeza dalam keadaan 3D dan didedahkan kepada medium pembezaan berjaya membeza kepada sel epitelium. Sel MEL-1 yang dikultur dalam keadaan 3D tetapi dibekal dengan medium hESc tidak menghasilkan sebarang sel epitelium	61
4.8	Profil pertumbuhan sel MPC yang terhasil daripada pembezaan sel MEL-1	62

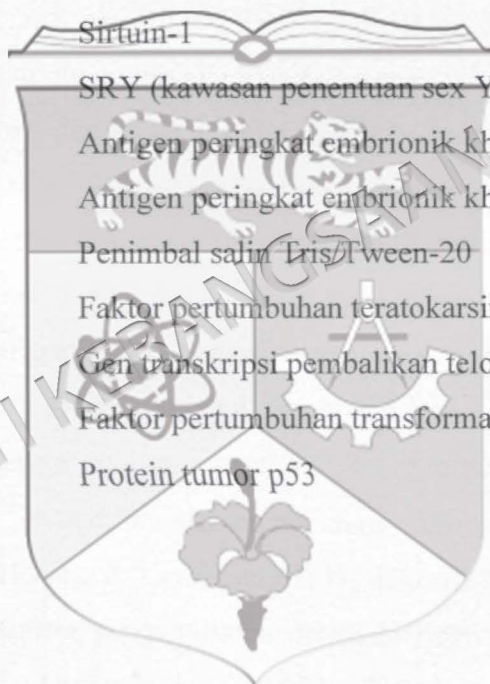
- 4.9 Analisis aliran sitometri terhadap penanda-penanda protein yang khusus bagi sel stem mesenkima dari sumsum tulang 63
- 4.10 Analisis pewarnaan imunositokimia sel MPC menunjukkan ekspresi protein CD166 pada periferi permukaan sel MPC manakala ekspresi Nestin terletak pada sitoplasma sel MPC. Sel MPC berupaya membentuk agregat yang kelihatan seperti sfera-neuro apabila dikultur di atas permukaan yang tidak menyokong pelekatan sel 63
- 4.11 Profil pengekspresan gen pluripoten (Oct-4) dan gen yang khusus kepada sel mesoderma (Brachyury), ektoderma (N-Cadherin) dan endoderma (Sox-17) sepanjang pembezaan fasa pertama sel MEL-1 kepada sel MPC 65
- 4.12 Sel MEL-1 yang dikultur di atas a) matrigel dan b) ECM menunjukkan periferi koloni yang jelas 67
- 4.13 Sel MEL-1 yang dikultur dengan ECM menunjukkan peratusan populasi sel positif terhadap penanda pluripoten yang setanding dengan sel MEL-1 yang dikultur dengan matrigel 68
- 4.14 Sel MEL-1 yang dikultur di atas a) ECM dan b) matrigel berkongsi profil pengekspresan penanda pluripoten yang sama 68
- 4.15 Pengekspresan penanda pluripoten oleh sel MEL-1 yang dikultur di atas a) ECM dan b) matrigel 69
- 4.16 Gel agaros 1.2% ini menunjukkan bahawa sel MEL-1 yang dikultur di atas ECM mengekspres gen yang berkait rapat dengan pengawalaturan sifat pluripoten sel seperti FoxD3, Oct4, Tdgl, Sox2, Nanog, hTERT dan Rex1 69
- 4.17 Analisa RT-PCR terhadap badan embriod (EB) yang terhasil daripada pembezaan sel MEL-1 menunjukkan badan embriod mengandungi sel daripada lapisan mesoderma (Brachyury), ektoderma (Pax6) dan endoderma (Sox-17) 70
- 4.18 Sebaran metafasa apabila diperhatikan bawah mikroskop fasa kontras 70
- 4.19 Kariogram menunjukkan kariotip normal (46 XY) yang mewakili sel MEL-1 yang dikultur di atas ECM selama 61 laluan 71
- 4.20 Kariogram menunjukkan kariotip normal (46 XY) yang mewakili sel MEL-1 yang dikultur di atas matrigel selama 61 laluan 71

4.21	Pewarnaan penuaan β -galaktosidase terhadap sel MEL-1 pada laluan ke-68, sel MPC pada laluan ke-8 dan ke-20	72
4.22	Pengekspresan gen TP53, RB1, hTERT dan Sirt1 oleh sel MEL-1 pada laluan ke -61 berbanding dengan sel MEL-1 pada laluan ke-21	73
4.23	Pengekspresan gen TP53, RB1, hTERT dan Sirt1 oleh sel MPC pada laluan ke -20 berbanding dengan sel MPC pada laluan ke-8. *P<0.05	73
4.24	Hasil elektroforesis gel agaros 1.2% untuk mengesan sebarang kontaminasi mikoplasma pada sel MEL-1 yang dikultur di atas ECM ataupun matrigel	74
4.25	Hasil elektroforesis gel agaros 1.2% untuk mengesan sebarang kontaminasi mikoplasma pada sel NTERA-2 dan MEF yang digunakan pada kajian ini	75
5.1	Klasifikasi cara-cara dan sumber komponen pengkulturan sel hESc yang digunakan oleh para penyelidik seluruh dunia. Pengkulturan sel hESc yang ideal melibatkan medium kultur yang bebas daripada serum, <i>xeno-free</i> dan bebas daripada sel pembekal	77
5.2	Proses pembezaan sel hESc kepada sel MPC	77
5.3	Penyediaan protein ECM daripada sel MPC untuk pengkulturan hESc	82
5.4	Analisa tapak jalan dengan senarai protein ECM yang dikenalpasti dalam campuran ECM yang menyokong pengembangan sel hESc dalam keadaan yang tidak membeza. Analisa tapak jalan dilakukan dengan menggunakan perisian " <i>Ingenuity Pathway Analysis</i> "	87

SENARAI SINGKATAN

Array CGH	Aturan perbandingan hibridisasi genomik
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
bFGF	faktor pertumbuhan fibroblas asas
BM-MSC	Sel stem mesenkima sumsum tulang
BMP4	protein tulang morfogenetik 4
BSA	Albumin serum bovin
cDNA	Pelengkap asid deoksiribonukleik
CO ₂	Karbon dioksida
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfoxida
DNA	Asid deoksiribonukleik
dNTP	Nukleosida trifosfat
DTT	Dithiothreitol
ECM	Matriks ekstrasel
EMT	Peralihan epitelial ke mesenkima
FACS	Pengisihan sel teraktif berpendarfluor
FBS	Serum janin bovin
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FoxD3	<i>Forkhead box D3</i>
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
hESc	Sel stem embrionik manusia
IAA	Iodoasetamida
KO-DMEM	<i>Knock Out DMEM</i>
LC-MS/MS	Kromatografi cecair-spektrometer jisim bertandem
LIF	Faktor perencat leukemia
mESc	Sel stem embrionik tetikus
MgCl ₂	Magnesium klorida
MPC	Sel progenitor mesenkima
MPC-ECM	Matriks ekstrasel dari sel MPC
MSC	Sel stem mesenkima

N-cadherin	Kadherin neural
Oct-4	Faktor transkripsi oktamer terikat 4
Pax6	Protein kotak berpasang 6
PBS	Penimbal salin fosfat
qPCR	Tindak balas berantai polimerasi kuantitatif
RB1	Retinoblastoma-1
Rex1	Protein jejari zink 42
RIN	Nombor integriti RNA
RNA	Asid ribonukleik
RT-PCR	Tindak balas berantai polimerasi transkripsi berbalik
SCID	Tetikus keimmunokurangan
Sirt1	Sirtuin-1
Sox17	SRY (kawasan penentuan sex-Y)-kotak 17
SSEA-3	Antigen peringkat embrionik khusus 3
SSSEA-4	Antigen peringkat embrionik khusus 4
TBST	Penimbal salin Tris/Tween-20
Tdgfl	Faktor pertumbuhan teratokarsinoma 1
TERT	Gen transkripsi pembalikan telomeras
TGF- β	Faktor pertumbuhan transformasi beta
TP53	Protein tumor p53



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 LATAR BELAKANG SEL STEM EMBRIONIK MANUSIA

Sel stem embrionik manusia (hESc) merupakan sel pluripoten yang boleh memperbaharui diri atau mempunyai sifat *self renewal*. Sifat pluripotennya telah dibuktikan secara *in vitro* dan *in vivo*. Sel stem embrionik manusia boleh membeza kepada sel-sel yang terdiri daripada kesemua tiga lapisan germ iaitu ektoderma, mesoderma dan endoderma (Thomson et al. 1998). Sel daripada lapisan ektoderma membentuk tisu kulit, sel stem saraf tanjang, rambut dan kelenjar mama (Pispa & Thesleff 2003). Sel daripada lapisan mesoderma pula membentuk tisu otot rangka, dermis, tisu perantara, sel stem urogenital, darah dan limpa (Fehling et al. 2003). Sel daripada lapisan endoderma pula membentuk tisu organ pernafasan dan pencernaan (Lee & Chung 2011). Penerbitan titisan sel stem embrionik yang pertama adalah daripada embrio tikus (Evans & Kaufman 1981), disusuli dengan penerbitan titisan sel stem embrionik manusia yang pertama daripada jisim sel dalam pada blastosis yang berusia lima hari (Thomson et al. 1998). Blastosis merupakan embrio pada peringkat awal perkembangan manusia yang terdiri daripada 50-150 sel (Thomson et al. 1998).

Minat para penyelidik dalam penyelidikan sel hESc meningkat memandangkan sel hESc berkebolehan untuk memperbaharui diri dan boleh dirangsang untuk membeza kepada sel-sel matang yang diinginkan. Contohnya, sel jantung yang boleh dihasilkan daripada pembezaan sel stem embrionik berpotensi menggantikan sel jantung yang mengalami nekrosis atau fibrosis akibat penginfarkan miokardium.

Walau bagaimanapun, pada masa kini, tiada terdapat terapi sel terhadap manusia dilaksanakan lagi disebabkan oleh masalah keselamatan sel hESc tersebut yang membimbangkan. Transplantasi sel matang yang tercemar dengan sel hESc yang pluripoten boleh menyebabkan pembentukan tisu teratoma di dalam badan penerima graft. Agensi pengawalan seperti FDA di Amerika Syarikat memainkan peranan yang penting dalam memastikan terapi sel adalah selamat sebelum sesuatu percubaan terapi klinikal terhadap manusia diluluskan. Percubaan terapi klinikal yang pertama hanya diluluskan oleh FDA setelah syarikat GERON berjaya membentangkan hasil kajian pre-klinikal yang dilakukan terhadap tikus dan sebarang pembentukan *cyst* telah dikaji dengan teliti dan dipastikan bukan teratoma.

Secara umumnya, sel stem boleh dibahagikan kepada beberapa kategori iaitu totipoten, pluripoten dan multipoten (Can 2008). Sel stem embrionik merupakan sel yang pluripoten manakala sel stem dewasa merupakan sel yang multipoten. Sifat atau ciri sifat pluripoten sel stem embrionik adalah didefinisikan sebagai keupayaannya untuk membeza kepada sel lebih matang yang menunjukkan ciri ketiga-tiga lapisan germa, iaitu ektoderma, mesoderma dan endoderma (Thomson et al. 1998). Walau bagaimanapun, tidak seperti sel stem totipoten, sel stem pluripoten tidak boleh membentuk organisma yang lengkap disebabkan oleh ketidak-upayaan sel tersebut untuk membeza kepada sel-sel yang membentuk plasenta yang menyokong perkembangan embrio (Beddington & Robertson 1989). Justeru, penyelidikan sel stem embrionik tidak akan menghasilkan klon manusia. Multipotensi pula didefinisikan sebagai keupayaan sel untuk membeza kepada sel-sel yang menunjukkan atau mempunyai ciri-ciri yang berkait rapat. Misalnya, sel stem mesenkima, merupakan salah satu contoh sel stem dewasa, yang berupaya membeza kepada sel yang membentuk tisu perantara seperti kondrosit, osteosit dan adiposit. Walau bagaimanapun, sel stem mesenkima tidak boleh membeza kepada sel darah merah yang berasal daripada sel stem hematopoietik (Pittenger et al. 1999).

Oleh kerana keupayaan sel stem embrionik membentuk kesemua jenis sel yang membentuk badan manusia, ianya berpotensi untuk digunakan dalam aplikasi klinikal seperti transplantasi sel kardiomyosit bagi pesakit yang mengalami penginfarkan miokardium manakala transplantasi sel pankreas boleh dilakukan bagi pesakit

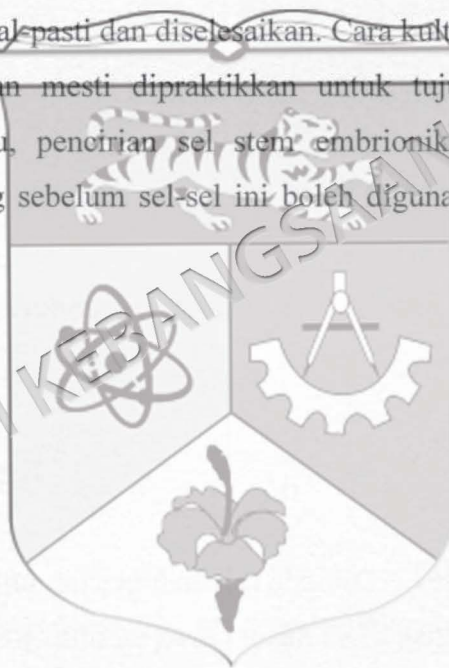
diabetes. Percubaan klinikal manusia yang pertama telah diluluskan oleh FDA untuk mengkaji keberkesanan dan keselamatan sel oligodendrosit yang terhasil daripada sel hESc setelah ditransplantasikan ke dalam badan pesakit yang mengalami kecederaan saraf tunjang (Alper 2009). Laporan awal percubaan klinikal kedua yang diluluskan oleh FDA telah menunjukkan hasil yang menggalakkan di mana sel epitelium pigmen retina dari sel hESc berjaya ditransplantasikan kepada pesakit yang mengalami penyakit distrofi macular Stargardt's (Schwartz et al. 2012).

Sel stem embrionik boleh didorong secara *in vitro* untuk membeza kepada sel-sel yang tertentu yang berpotensi untuk digunakan bagi terapi sel. Walau bagaimanapun, ia masih suatu cabaran bagi para penyelidik untuk mendorong pembezaan sel hESc kepada hanya satu jenis sel yang spesifik dan homogenus. Pembezaan kepada populasi sel yang heterogen adalah suatu masalah penting dan juga merupakan penghalang utama penggunaan sel-sel tersebut dalam rawatan terapi sel (Ponsaerts et al. 2004). Selain itu, kehadiran sel-sel hESc yang tidak membeza bersama dengan sel-sel matang boleh menyebabkan pembentukan teratoma selepas sel-sel tersebut ditransplantasi kepada pesakit (Nussbaum et al. 2007). Oleh yang demikian, pencirian sel stem embrionik dan derivatifnya mesti dilakukan secara menyeluruh yang merangkumi morfologi, profil pertumbuhan, pengekspresan gen dan protein sel. Ini adalah bagi memastikan sel stem embrionik kekal menunjukkan ciri-ciri yang pluripoten selepas disubkulturkan manakala sel yang matang tidak mempamerkan sifat yang pluripoten (Adewumi et al. 2007). Di samping itu, pencirian sel yang terbeza daripada sel stem embrionik haruslah dilakukan dengan teliti bagi mengelakkan berlakunya kontaminasi sel stem embrionik dalam populasi sel yang membeza untuk tujuan transplantasi. Kontaminasi sel stem embrionik dalam populasi sel-sel matang yang bakal digunakan untuk transplantasi, boleh mengakibatkan penumbuhan sel teratoma pada penerima transplantasi sel tersebut.

Sel stem dewasa mempunyai kelebihan di mana ianya boleh didapati daripada sumber-sumber yang sedia ada seperti sumsum tulang, tisu lemak dan darah berbanding dengan sel stem embrionik yang hanya boleh didapati daripada embrio berusia pada hari kelima. Oleh itu, kajian yang melibatkan sel stem dewasa terutamanya sel stem mesenkima berkembang dengan cepatnya dan transplantasi sel

autologous tisu pengantara daripada sel MSC telah mencapai tahap ujian percubaan kinikal pada manusia (Giordano et al. 2007). Walau bagaimanapun, sel stem dewasa juga mempunyai beberapa limitasi di mana ianya hanya boleh didapati dengan prosedur yang invasif, seperti melalui perolehan biopsi, penyedutan lipid (*liposuction*) dan lain-lainnya. Di samping itu, sel stem dewasa yang diperolehi daripada seseorang yang lanjut usianya, kurang berkebolehan untuk menunjukkan pertumbuhan dan pembezaan yang baik secara *in vitro* (Coipeau et al. 2009). Limitasi sel stem dewasa ini menjadikan ianya kurang berpotensi dalam aplikasi kinikal.

Justeru, sel stem embrionik membawa potensi yang amat besar dalam terapi penggantian sel. Walau bagaimanapun, isu-isu keselamatan penggunaan sel stem embrionik haruslah dikenalpasti dan diselesaikan. Cara kultur yang selamat dan bebas daripada derivatif haiwan mesti dipraktikkan untuk tujuan rawatan terapi yang selamat. Di samping itu, pencirian sel stem embrionik dan derivatifnya secara menyeluruh amat penting sebelum sel-sel ini boleh digunakan bagi apa jua aplikasi kinikal.



1.2 OBJEKTIF KAJIAN

1.2.1 Objektif Utama

Mengkaji proses pembezaan, kestabilan kromosom dan ekspresi gen sel stem embrionik dan sel derivatif mesenkimanya.

1.2.2 Objektif Spesifik

1. Mengkaji kestabilan kromosom sel hESc MEL-1 yang dikultur dengan matriks ekstrasel sel progenitor mesenkima
2. Mengkaji proses penuaan sel progenitor mesenkima yang diterbitkan daripada sel hESc MEL-1.
3. Mengkaji profil ekspresi gen yang mengawalatur kestabilan kromosom dan penuaan sel hESc selepas pembezaan kepada sel progenitor mesenkima dan selepas pengkulturan jangka panjang.

1.3 HIPOTESIS KAJIAN

1. Sel hESc yang dikultur dengan matrigel atau ECM kekal dengan kariotip yang normal walaupun selepas pengkulturan pada jangka masa panjang.
2. Sel hESc yang dikultur dengan matrigel atau ECM mengekspres gen yang mengawalatur kestabilan dan penuaan sel dengan konsisten sepanjang pengkulturan sel hESc dijalankan.

RUJUKAN

- Adewumi, O., Aflatoonian, B., Ahrlund-Richter, L., Amit, M., Andrews, P. W., Beighton, G., Bello, P. A., Benvenisty, N., Berry, L. S., Bevan, S., Blum, B., Brooking, J., Chen, K. G., Choo, A. B., Churchill, G. A., Corbel, M., Damjanov, I., Draper, J. S., Dvorak, P., Emanuelsson, K., Fleck, R. A., Ford, A., Gertow, K., Gertsenstein, M., Gokhale, P. J., Hamilton, R. S., Hampl, A., Healy, L. E., Hovatta, O., Hyllner, J., Imreh, M. P., Itskovitz-Eldor, J., Jackson, J., Johnson, J. L., Jones, M., Kee, K., King, B. L., Knowles, B. B., Lako, M., Lebrin, F., Mallon, B. S., Manning, D., Mayshar, Y., McKay, R. D., Michalska, A. E., Mikkola, M., Mileikovsky, M., Minger, S. L., Moore, H. D., Mummery, C. L., Nagy, A., Nakatsuji, N., O'Brien, C. M., Oh, S. K., Olsson, C., Otonkoski, T., Park, K. Y., Passier, R., Patel, H., Patel, M., Pedersen, R., Pera, M. F., Piekarczyk, M. S., Pera, R. A., Reubinoff, B. E., Robins, A. J., Rossant, J., Rugg-Gunn, P., Schulz, T. C., Semb, H., Sherrer, E. S., Siemen, H., Stacey, G. N., Stojkovic, M., Suemori, H., Szatkiewicz, J., Turetsky, P., Tuuri, T., Van Den Brink, S., Vintersten, K., Vuoristo, S., Ward, D., Weaver, T. A., Young, L. A. & Zhang, W. 2007. Characterization of Human Embryonic Stem Cell Lines by the International Stem Cell Initiative. *Nat Biotechnol* 25(7): 803-816.
- Allsopp, R. C., Vaziri, H., Patterson, C., Goldstein, S., Younglai, E. V., Futcher, A. B., Greider, C. W. & Harley, C. B. 1992. Telomere Length Predicts Replicative Capacity of Human Fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(21): 10114-10118.
- Alper, J. 2009. Gerop Gets Green Light for Human Trial of Es Cell-Derived Product. *Nat Biotechnol* 27(3): 213-214.
- Amit, M., Carpenter, M. K., Inokuma, M. S., Chiu, C. P., Harris, C. P., Waknitz, M. A., Itskovitz-Eldor, J. & Thomson, J. A. 2000. Clonally Derived Human Embryonic Stem Cell Lines Maintain Pluripotency and Proliferative Potential for Prolonged Periods of Culture. *Dev Biol* 227(2): 271-278.
- Amit, M. & Itskovitzeldor, J. 2006. Feeder Free Culture of Human Embryonic Stem Cells. *Methods in Enzymology* Volume 420: 37-49.
- Amit, M., Shariki, C., Margulets, V. & Itskovitz-Eldor, J. 2004. Feeder Layer- and Serum-Free Culture of Human Embryonic Stem Cells. *Biology of Reproduction* 70(3): 837-845.
- Barberi, T., Willis, L. M., Socci, N. D. & Studer, L. 2005. Derivation of Multipotent Mesenchymal Precursors from Human Embryonic Stem Cells. *PLoS Med* 2(6): e161.
- Beddington, R. S. & Robertson, E. J. 1989. An Assessment of the Developmental Potential of Embryonic Stem Cells in the Midgestation Mouse Embryo. *Development* 105(4): 733-737.

- Biancotti, J. C., Narwani, K., Buehler, N., Mandefro, B., Golan-Lev, T., Yanuka, O., Clark, A., Hill, D., Benvenisty, N. & Lavon, N. 2010. Human Embryonic Stem Cells as Models for Aneuploid Chromosomal Syndromes. *Stem Cells* 28(9): 1530-1540.
- Blackburn, E. H. 2001. Switching and Signaling at the Telomere. *Cell* 106(6): 661-673.
- Bonab, M. M., Alimoghaddam, K., Talebian, F., Ghaffari, S. H., Ghavamzadeh, A. & Nikbin, B. 2006. Aging of Mesenchymal Stem Cell in Vitro. *BMC Cell Biol* 7: 14.
- Boyd, N. L., Robbins, K. R., Dhara, S. K., West, F. D. & Stice, S. L. 2009. Human Embryonic Stem Cell-Derived Mesoderm-Like Epithelium Transitions to Mesenchymal Progenitor Cells. *Tissue Eng Part A* 15(8): 1897-1907.
- Brivanlou, A. H., Gage, F. H., Jaenisch, R., Jessell, T., Melton, D. & Rossant, J. 2003. Stem Cells: Setting Standards for Human Embryonic Stem Cells. *Science* 300(5621): 913-916.
- Buzzard, J. J., Gough, N. M., Crook, J. M. & Colman, A. 2004. Karyotype of Human Es Cells During Extended Culture. *Nat Biotechnol* 22(4): 381-382; author reply 382.
- Caisander, G., Park, H., Frej, K., Lindqvist, J., Bergh, C., Lundin, K. & Hanson, C. 2006. Chromosomal Integrity Maintained in Five Human Embryonic Stem Cell Lines after Prolonged in Vitro Culture. *Chromosome Res* 14(2): 131-137.
- Can, A. 2008. A Concise Review on the Classification and Nomenclature of Stem Cells. *Turkish Journal of Hematology* 25(2): 57-59.
- Chen, X. D., Dusevich, V., Feng, J. Q., Manolagas, S. C. & Ilka, R. L. 2007. Extracellular Matrix Made by Bone Marrow Cells Facilitates Expansion of Marrow-Derived Mesenchymal Progenitor Cells and Prevents Their Differentiation into Osteoblasts. *Journal of Bone and Mineral Research* 22(12): 1943-1956.
- Cheng, J., Dutra, A., Takesono, A., Garrett-Beal, L. & Schwartzberg, P. L. 2004. Improved Generation of C57bl/6j Mouse Embryonic Stem Cells in a Defined Serum-Free Media. *Genesis* 39(2): 100-104.
- Cheng, L., Hammond, H., Ye, Z., Zhan, X. & Dravid, G. 2003. Human Adult Marrow Cells Support Prolonged Expansion of Human Embryonic Stem Cells in Culture. *Stem Cells* 21(2): 131-142.
- Chiquet-Ehrismann, R., Kalla, P., Pearson, C. A., Beck, K. & Chiquet, M. 1988. Tenascin Interferes with Fibronectin Action. *Cell* 53(3): 383-390.

- Cobo, F., Navarro, J. M., Herrera, M. I., Vivo, A., Porcel, D., Hernández, C., Jurado, M., García-Castro, J. & Menendez, P. 2008. Electron Microscopy Reveals the Presence of Viruses in Mouse Embryonic Fibroblasts but Neither in Human Embryonic Fibroblasts nor in Human Mesenchymal Cells Used for Hesc Maintenance toward an Implementation of Microbiological Quality Assurance Program in Stem Cell Banks. *Cloning and Stem Cells* 10(1): 65-73.
- Coe, B. P., Ylstra, B., Carvalho, B., Meijer, G. A., Macaulay, C. & Lam, W. L. 2007. Resolving the Resolution of Array Cgh. *Genomics* 89(5): 647-653.
- Coipeau, P., Rosset, P., Langonne, A., Gaillard, J., Delorme, B., Rico, A., Domenech, J., Charbord, P. & Sensebe, L. 2009. Impaired Differentiation Potential of Human Trabecular Bone Mesenchymal Stromal Cells from Elderly Patients. *Cytotherapy* 11(5): 584-594.
- Colgin, L. M., Baran, K., Baumann, P., Cech, T. R. & Reddel, R. R. 2003. Human Pot1 Facilitates Telomere Elongation by Telomerase. *Curr Biol* 13(11): 942-946.
- Collins, K. & Mitchell, J. R. 2002. Telomerase in the Human Organism. *Oncogene* 21(4): 564-579.
- Costa, M., Sourris, K., Hatzistavrou, T., Elefanti, A. G. & Stanley, E. G. 2008. Expansion of Human Embryonic Stem Cells in Vitro. *Curr Protoc Stem Cell Biol* Chapter 1: Unit 1C 1.1-1C 1.7.
- De Bonis, M. L., Ortega, S. & Blasco, M. A. 2014. Sirt1 Is Necessary for Proficient Telomere Elongation and Genomic Stability of Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports* 2(5): 690-706.
- De Coppi, P., Bartsch, G., Jr., Siddiqui, M. M., Xu, T., Santos, C. C., Perin, L., Mostoslavsky, G., Serre, A. C., Snyder, E. Y., Yoo, J. J., Furth, M. E., Soker, S. & Atala, A. 2007. Isolation of Amniotic Stem Cell Lines with Potential for Therapy. *Nat Biotechnol* 25(1): 100-106.
- Derycke, L. D. M. & Bracke, M. E. 2004. N-Cadherin in the Spotlight of Cell-Cell Adhesion, Differentiation, Invasion and Signalling. *International Journal of Developmental Biology* 48(5-6): 463-476.
- Dimaras, H., Khetan, V., Halliday, W., Orlic, M., Prigoda, N. L., Piovesan, B., Marrano, P., Corson, T. W., Eagle, R. C., Jr., Squire, J. A. & Gallie, B. L. 2008. Loss of Rb1 Induces Non-Proliferative Retinoma: Increasing Genomic Instability Correlates with Progression to Retinoblastoma. *Hum Mol Genet* 17(10): 1363-1372.
- Draper, J. S., Pigott, C., Thomson, J. A. & Andrews, P. W. 2002. Surface Antigens of Human Embryonic Stem Cells: Changes Upon Differentiation in Culture. *J Anat* 200(Pt 3): 249-258.

- Draper, J. S., Smith, K., Gokhale, P., Moore, H. D., Maltby, E., Johnson, J., Meisner, L., Zwaka, T. P., Thomson, J. A. & Andrews, P. W. 2004. Recurrent Gain of Chromosomes 17q and 12 in Cultured Human Embryonic Stem Cells. *Nat Biotechnol* 22(1): 53-54.
- Eastham, A. M., Spencer, H., Soncin, F., Ritson, S., Merry, C. L. R., Stern, P. L. & Ward, C. M. 2007. Epithelial-Mesenchymal Transition Events During Human Embryonic Stem Cell Differentiation. *Cancer Research* 67(23): 11254-11262.
- Eiselleova, L., Peterkova, I., Neradil, J., Slaninova, I., Hampl, A. & Dvorak, P. 2008. Comparative Study of Mouse and Human Feeder Cells for Human Embryonic Stem Cells. *Int J Dev Biol* 52(4): 353-363.
- Evans, M. J. & Kaufman, M. H. 1981. Establishment in Culture of Pluripotential Cells from Mouse Embryos. *Nature* 292(5819): 154-156.
- Fehling, H. J., Lacaud, G., Kubo, A., Kennedy, M., Robertson, S., Keller, G. & Kouskoff, V. 2003. Tracking Mesoderm Induction and Its Specification to the Hemangioblast During Embryonic Stem Cell Differentiation. *Development* 130(17): 4217-4227.
- Fenderson, B. A., Andrews, P. W., Nudelman, E., Clausen, H. & Hakomori, S. 1987. Glycolipid Core Structure Switching from Globo- to Lacto- and Ganglio-Series During Retinoic Acid-Induced Differentiation of Tera-2-Derived Human Embryonal Carcinoma Cells. *Dev Biol* 122(1): 21-34.
- Forghani, N., Kadivar, M., Yagmeci, P., Kargar, S. & Ghazizadeh, L. 2009. Effects of Rat Mesenchymal Stem Cells as a Feeder Layer in Isolation and Culture of Mouse Embryonic Stem Cells. *Koomesh* 10(3): 161-169+124.
- Friedenstein, A. J., Chailakhjan, R. K. & Lalykina, K. S. 1970. The Development of Fibroblast Colonies in Monolayer Cultures of Guinea-Pig Bone Marrow and Spleen Cells. *Cell Tissue Kinet* 3(4): 393-403.
- Friedrich, U., Griese, E., Schwab, M., Fritz, P., Thon, K. & Klotz, U. 2000. Telomere Length in Different Tissues of Elderly Patients. *Mech Ageing Dev* 119(3): 89-99.
- Gang, E. J., Bosnakovski, D., Figueiredo, C. A., Visser, J. W. & Perlingeiro, R. C. 2007. Ssea-4 Identifies Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow. *Blood* 109(4): 1743-1751.
- Genbacev, O., Krtolica, A., Zdravkovic, T., Brunette, E., Powell, S., Nath, A., Caceres, E., McMaster, M., McDonagh, S., Li, Y., Mandalam, R., Lebkowski, J. & Fisher, S. J. 2005. Serum-Free Derivation of Human Embryonic Stem Cell Lines on Human Placental Fibroblast Feeders. *Fertil Steril* 83(5): 1517-1529.

- Ginis, I., Luo, Y., Miura, T., Thies, S., Brandenberger, R., Gerecht-Nir, S., Amit, M., Hoke, A., Carpenter, M. K., Itskovitz-Eldor, J. & Rao, M. S. 2004. Differences between Human and Mouse Embryonic Stem Cells. *Dev Biol* 269(2): 360-380.
- Giordano, A., Galderisi, U. & Marino, I. R. 2007. From the Laboratory Bench to the Patient's Bedside: An Update on Clinical Trials with Mesenchymal Stem Cells. *J Cell Physiol* 211(1): 27-35.
- Gropp, M., Shilo, V., Vainer, G., Gov, M., Gil, Y., Khaner, H., Matzrafi, L., Idelson, M., Kopolovic, J., Zak, N. B. & Reubinoff, B. E. 2012. Standardization of the Teratoma Assay for Analysis of Pluripotency of Human Es Cells and Biosafety of Their Differentiated Progeny. *PLoS One* 7(9): e45532.
- Hamilton, B., Dong, Y., Shindo, M., Liu, W., Odell, I., Ruvkun, G. & Lee, S. S. 2005. A Systematic Rnai Screen for Longevity Genes in *C. Elegans*. *Genes Dev* 19(13): 1544-1555.
- Hanahan, D. & Weinberg, R. A. 2000. The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100(1): 57-70.
- Harley, C. B., Futcher, A. B. & Greider, C. W. 1990. Telomeres Shorten During Ageing of Human Fibroblasts. *Nature* 345(6274): 458-460.
- Hass, R., Kasper, C., Bohm, S. & Jacobs, R. 2011. Different Populations and Sources of Human Mesenchymal Stem Cells (Msc): A Comparison of Adult and Neonatal Tissue-Derived Msc. *Cell Communication and Signaling* 12.
- Hematti, P. 2011. Human Embryonic Stem Cell-Derived Mesenchymal Progenitors: An Overview. *Methods Mol Biol* 690:163-174.
- Henderson, J. K., Draper, J. S., Baillie, H. S., Fishel, S., Thomson, J. A., Moore, H. & Andrews, P. W. 2002. Preimplantation Human Embryos and Embryonic Stem Cells Show Comparable Expression of Stage-Specific Embryonic Antigens. *Stem Cells* 20(4): 329-337.
- Hiyama, E. & Hiyama, K. 2007. Telomere and Telomerase in Stem Cells. *Br J Cancer* 96(7): 1020-1024.
- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B. & Harris, C. C. 1991. P53 Mutations in Human Cancers. *Science* 253(5015): 49-53.
- Hovatta, O., Mikkola, M., Gertow, K., Stromberg, A. M., Inzunza, J., Hreinsson, J., Rozell, B., Blennow, E., Andang, M. & Ahrlund-Richter, L. 2003. A Culture System Using Human Foreskin Fibroblasts as Feeder Cells Allows Production of Human Embryonic Stem Cells. *Hum Reprod* 18(7): 1404-1409.
- Hu, B., Guo, Y., Chen, C., Li, Q., Niu, X., Guo, S., Zhang, A., Wang, Y. & Deng, Z. 2014. Repression of Sirt1 Promotes the Differentiation of Mouse Induced

Pluripotent Stem Cells into Neural Stem Cells. *Cell Mol Neurobiol* 34(6): 905-912.

Huang, Y., Liang, P., Liu, D., Huang, J. & Songyang, Z. 2014. Telomere Regulation in Pluripotent Stem Cells. *Protein Cell* 5(3): 194-202.

Inzunza, J., Sahlen, S., Holmberg, K., Stromberg, A. M., Teerijoki, H., Blennow, E., Hovatta, O. & Malmgren, H. 2004. Comparative Genomic Hybridization and Karyotyping of Human Embryonic Stem Cells Reveals the Occurrence of an Isodicentric X Chromosome after Long-Term Cultivation. *Mol Hum Reprod* 10(6): 461-466.

Itskovitz-Eldor, J., Schuldiner, M., Karsenti, D., Eden, A., Yanuka, O., Amit, M., Soreq, H. & Benvenisty, N. 2000. Differentiation of Human Embryonic Stem Cells into Embryoid Bodies Compromising the Three Embryonic Germ Layers. *Mol Med* 6(2): 88-95.

Jin, H. J., Bae, Y. K., Kim, M., Kwon, S. J., Jeon, H. B., Choi, S. J., Kim, S. W., Yang, Y. S., Oh, W. & Chang, J. W. 2013. Comparative Analysis of Human Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Adipose Tissue, and Umbilical Cord Blood as Sources of Cell Therapy. *Int J Mol Sci* 14(9): 17986-18001.

Jung, Y., Bauer, G. & Nolte, J. A. 2012. Concise Review: Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Mesenchymal Stem Cells: Progress toward Safe Clinical Products. *Stem Cells* 30(1): 42-47.

Karabekian, Z., Gillum, N. D., Wong, E. W. & Sarvazyan, N. 2009. Effects of N-Cadherin Overexpression on the Adhesion Properties of Embryonic Stem Cells. *Cell Adh Migr* 3(3): 305-310.

Katsara, O., Mahaira, L. G., Iliopoulou, E. G., Moustaki, A., Antsaklis, A., Loutradis, D., Stefanidis, K., Baxevas, C. N., Papamichail, M. & Perez, S. A. 2011. Effects of Donor Age, Gender, and in Vitro Cellular Aging on the Phenotypic, Functional, and Molecular Characteristics of Mouse Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Dev* 20(9): 1549-1561.

Khoo, T. S., Hamidah Hussin, N., Then, S. M. & Jamal, R. 2013. Autogenic Feeder Free System from Differentiated Mesenchymal Progenitor Cells, Maintains Pluripotency of the Mel-1 Human Embryonic Stem Cells. *Differentiation* 85(3): 110-118.

Kibschull, M., Mileikovsky, M., Michael, I. P., Lye, S. J. & Nagy, A. 2011. Human Embryonic Fibroblasts Support Single Cell Enzymatic Expansion of Human Embryonic Stem Cells in Xeno-Free Cultures. *Stem Cell Res* 6(1): 70-82.

Kim, J. B., Islam, S., Kim, Y. J., Prudoff, R. S., Sass, K. M., Wheelock, M. J. & Johnson, K. R. 2000. N-Cadherin Extracellular Repeat 4 Mediates Epithelial to Mesenchymal Transition and Increased Motility. *J Cell Biol* 151(6): 1193-1206.

- Kim, N. W., Piatyszek, M. A., Prowse, K. R., Harley, C. B., West, M. D., Ho, P. L., Coviello, G. M., Wright, W. E., Weinrich, S. L. & Shay, J. W. 1994. Specific Association of Human Telomerase Activity with Immortal Cells and Cancer. *Science* 266(5193): 2011-2015.
- Krizhanovsky, V., Xue, W., Zender, L., Yon, M., Hernando, E. & Lowe, S. W. 2008. Implications of Cellular Senescence in Tissue Damage Response, Tumor Suppression, and Stem Cell Biology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 73: 513-522.
- Krizhanovsky, V., Yon, M., Dickins, R. A., Hearn, S., Simon, J., Miething, C., Yee, H., Zender, L. & Lowe, S. W. 2008. Senescence of Activated Stellate Cells Limits Liver Fibrosis. *Cell* 134(4): 657-667.
- Lee, D. H. & Chung, H. M. 2011. Differentiation into Endoderm Lineage: Pancreatic Differentiation from Embryonic Stem Cells. *Int J Stem Cells* 4(1): 35-42.
- Lee, J. B., Lee, J. E., Park, J. H., Kim, S. J., Kim, M. K., Roh, S. I. & Yoon, H. S. 2005. Establishment and Maintenance of Human Embryonic Stem Cell Lines on Human Feeder Cells Derived from Uterine Endometrium under Serum-Free Condition. *Biol Reprod* 72(1): 42-49.
- Lee, S. T., Yun, J. I., Jo, Y. S., Mochizuki, M., Van Der Vlies, A. J., Kontos, S., Ihm, J. E., Lim, J. M. & Hubbell, J. A. 2010. Engineering Integrin Signaling for Promoting Embryonic Stem Cell Self-Renewal in a Precisely Defined Niche. *Biomaterials* 31(6): 1219-1226.
- Lee, Y. L., Peng, Q., Fong, S. W., Chen, A. C., Lee, K. F., Ng, E. H., Nagy, A. & Yeung, W. S. 2012. Sirtuin 1 Facilitates Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic Fibroblasts through the Mir-34a and P53 Pathways. *PLoS One* 7(9): e45633.
- Lefort, N., Feyeux, M., Bas, C., Feraud, O., Benaïeur-Griscelli, A., Tachdjian, G., Peschanski, M. & Perrier, A. L. 2008. Human Embryonic Stem Cells Reveal Recurrent Genomic Instability at 20q11.21. *Nat Biotechnol* 26(12): 1364-1366.
- Lei, T., Jacob, S., Ajil-Zaraa, I., Dubuisson, J. B., Irion, O., Jaconi, M. & Feki, A. 2007. Xeno-Free Derivation and Culture of Human Embryonic Stem Cells: Current Status, Problems and Challenges. *Cell Res* 17(8): 682-688.
- Lian, Q., Lye, E., Suan Yeo, K., Khia Way Tan, E., Salto-Tellez, M., Liu, T. M., Palanisamy, N., El Oakley, R. M., Lee, E. H., Lim, B. & Lim, S. K. 2007. Derivation of Clinically Compliant Mscs from Cd105+, Cd24- Differentiated Human Escs. *Stem Cells* 25(2): 425-436.

- Loser, P., Schirm, J., Guhr, A., Wobus, A. M. & Kurtz, A. 2010. Human Embryonic Stem Cell Lines and Their Use in International Research. *Stem Cells* 28(2): 240-246.
- Ludwig, T. E., Levenstein, M. E., Jones, J. M., Berggren, W. T., Mitchen, E. R., Frane, J. L., Crandall, L. J., Daigh, C. A., Conard, K. R., Piekarczyk, M. S., Llanas, R. A. & Thomson, J. A. 2006. Derivation of Human Embryonic Stem Cells in Defined Conditions. *Nat Biotechnol* 24(2): 185-187.
- Manning, A. L., Benes, C. & Dyson, N. J. 2014. Whole Chromosome Instability Resulting from the Synergistic Effects of Prb and P53 Inactivation. *Oncogene* 33(19): 2487-2494.
- Martin, M. J., Muotri, A., Gage, F. & Varki, A. 2005. Human Embryonic Stem Cells Express an Immunogenic Nonhuman Sialic Acid. *Nat Med* 11(2): 228-232.
- Mckay, T. R., Camarasa, M. V., Iskender, B., Ye, J., Bates, N., Miller, D., Fitzsimmons, J. C., Foxler, D., Mee, M., Sharp, T. V., Aplin, J., Brison, D. R. & Kimber, S. J. 2011. Human Feeder Cell Line for Derivation and Culture of Hesc/Hipsc. *Stem Cell Res* 7(2): 154-162.
- Meng, G., Liu, S., Li, X., Krawetz, R. & Rancourt, D. E. 2010. Extracellular Matrix Isolated from Foreskin Fibroblasts Supports Long-Term Xeno-Free Human Embryonic Stem Cell Culture. *Stem Cells Dev* 19(4): 547-556.
- Miskon, A., Mahara, A., Uyama, H. & Yamaoka, T. 2010. A Suspension Induction for Myocardial Differentiation of Rat Mesenchymal Stem Cells on Various Extracellular Matrix Proteins. *Tissue Eng Part C Methods* 16(5): 979-987.
- Nagano, K., Yoshida, Y. & Isobe, T. 2008. Cell Surface Biomarkers of Embryonic Stem Cells. *Proteomics* 8(19): 4025-4035.
- Nussbaum, J., Minami, E., Laflamme, M. A., Virag, J. A., Ware, C. B., Masino, A., Muskheli, V., Pabon, L., Reinecke, H. & Murry, C. E. 2007. Transplantation of Undifferentiated Murine Embryonic Stem Cells in the Heart: Teratoma Formation and Immune Response. *FASEB J* 21(7): 1345-1357.
- Oh, S. K., Kim, H. S., Park, Y. B., Seol, H. W., Kim, Y. Y., Cho, M. S., Ku, S. Y., Choi, Y. M., Kim, D. W. & Moon, S. Y. 2005. Methods for Expansion of Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells* 23(5): 605-609.
- Olivier, E. N. & Bouhassira, E. E. 2011. Differentiation of Human Embryonic Stem Cells into Mesenchymal Stem Cells by the "Raclure" Method. *Methods Mol Biol* 690: 183-193.
- Olivier, E. N., Rybicki, A. C. & Bouhassira, E. E. 2006. Differentiation of Human Embryonic Stem Cells into Bipotent Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells* 24(8): 1914-1922.

- Oshimori, N. & Fuchs, E. 2012. The Harmonies Played by Tgf-Beta in Stem Cell Biology. *Cell Stem Cell* 11(6): 751-764.
- Pal, R., Mandal, A., Rao, H. S., Rao, M. S. & Khanna, A. 2007. A Panel of Tests to Standardize the Characterization of Human Embryonic Stem Cells. *Regen Med* 2(2): 179-192.
- Pan, Q., Fouraschen, S. M., De Ruiter, P. E., Dinjens, W. N., Kwekkeboom, J., Tilanus, H. W. & Van Der Laan, L. J. 2014. Detection of Spontaneous Tumorigenic Transformation During Culture Expansion of Human Mesenchymal Stromal Cells. *Exp Biol Med (Maywood)* 239(1): 105-115.
- Park, S. P., Lee, Y. J., Lee, K. S., Ah Shin, H., Cho, H. Y., Chung, K. S., Kim, E. Y. & Lim, J. H. 2004. Establishment of Human Embryonic Stem Cell Lines from Frozen-Thawed Blastocysts Using Sto Cell Feeder Layers. *Hum Reprod* 19(3): 676-684.
- Pispa, J. & Thesleff, I. 2003. Mechanisms of Ectodermal Organogenesis. *Dev Biol* 262(2): 195-205.
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S. & Marshak, D. R. 1999. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science* 284(5411): 143-147.
- Plaia, T. W., Josephson, R., Liu, Y., Zeng, X., Ording, C., Toumadje, A., Brimble, S. N., Sherrer, E. S., Uhl, E. W., Freed, W. J., Schultz, T. C., Maitra, A., Rao, M. S. & Auerbach, J. M. 2006. Characterization of a New Nih-Registered Variant Human Embryonic Stem Cell Line, Bg01v: A Tool for Human Embryonic Stem Cell Research. *Stem Cells* 24(3): 531-546.
- Ponsaerts, P., Van Tendeloo, V. F., Jorens, P. G., Berneman, Z. N. & Van Bockstaele, D. R. 2004. Current Challenges in Human Embryonic Stem Cell Research: Directed Differentiation and Transplantation Tolerance. *J Biol Regul Homeost Agents* 18(3-4): 347-351.
- Prowse, A. B., Mcquade, L. R., Bryant, K. J., Marcal, H. & Gray, P. P. 2007. Identification of Potential Pluripotency Determinants for Human Embryonic Stem Cells Following Proteomic Analysis of Human and Mouse Fibroblast Conditioned Media. *J Proteome Res* 6(9): 3796-3807.
- Prowse, A. B. J., Doran, M. R., Cooper-White, J. J., Chong, F., Munro, T. P., Fitzpatrick, J., Chung, T.-L., Haylock, D. N., Gray, P. P. & Wolvetang, E. J. 2010. Long Term Culture of Human Embryonic Stem Cells on Recombinant Vitronectin in Ascorbate Free Media. *Biomaterials* 31(32): 8281-8288.
- Ren, J., Jin, P., Sabatino, M., Balakumaran, A., Feng, J., Kuznetsov, S. A., Klein, H. G., Robey, P. G. & Stroncek, D. F. 2011. Global Transcriptome Analysis of Human Bone Marrow Stromal Cells (Bmsc) Reveals Proliferative, Mobile and

Interactive Cells That Produce Abundant Extracellular Matrix Proteins, Some of Which May Affect Bmsc Potency. *Cytotherapy* 13(6): 661-674.

Richards, M., Fong, C. Y., Chan, W. K., Wong, P. C. & Bongso, A. 2002. Human Feeders Support Prolonged Undifferentiated Growth of Human Inner Cell Masses and Embryonic Stem Cells. *Nat Biotechnol* 20(9): 933-936.

Richards, M., Tan, S., Fong, C. Y., Biswas, A., Chan, W. K. & Bongso, A. 2003. Comparative Evaluation of Various Human Feeders for Prolonged Undifferentiated Growth of Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells* 21(5): 546-556.

Rodaway, A., Takeda, H., Koshida, S., Broadbent, J., Price, B., Smith, J. C., Patient, R. & Holder, N. 1999. Induction of the Mesendoderm in the Zebrafish Germ Ring by Yolk Cell-Derived Tgf-Beta Family Signals and Discrimination of Mesoderm and Endoderm by Fgf. *Development* 126(14): 3067-3078.

Rosler, E. S., Fisk, G. J., Ares, X., Irving, J., Miura, T., Rao, M. S. & Carpenter, M. K. 2004. Long-Term Culture of Human Embryonic Stem Cells in Feeder-Free Conditions. *Dev Dyn* 229(2): 259-274.

Satoh, A., Brace, C. S., Rensing, N., Cliften, P., Wozniak, D. F., Herzog, E. D., Yamada, K. A. & Imai, S. 2013. Sirt1 Extends Life Span and Delays Aging in Mice through the Regulation of Nk2 Homeobox 1 in the Dmh and Lh. *Cell Metab* 18(3): 416-430.

Schnerch, A., Cerdan, C. & Bhatia, M. 2010. Distinguishing between Mouse and Human Pluripotent Stem Cell Regulation: The Best Laid Plans of Mice and Men. *Stem Cells* 28(3): 419-430.

Schwartz, S. D., Hubschman, J. P., Heilwell, G., Franco-Cardenas, V., Pan, C. K., Ostrick, R. M., Mickunas, E., Gay, R., Klimanskaya, I. & Lanza, R. 2012. Embryonic Stem Cell Trials for Macular Degeneration: A Preliminary Report. *Lancet* 379(9817): 713-720.

Sethe, S., Scutt, A. & Stolzing, A. 2006. Aging of Mesenchymal Stem Cells. *Ageing Res Rev* 5(1): 91-116.

Shay, J. W. & Wright, W. E. 2000. Hayflick, His Limit, and Cellular Ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1(1): 72-76.

Sheridan, S. D., Surampudi, V. & Rao, R. R. 2012. Analysis of Embryoid Bodies Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells as a Means to Assess Pluripotency. *Stem Cells Int* 2012: 738910.

Shetty, P., Cooper, K. & Viswanathan, C. 2010. Comparison of Proliferative and Multilineage Differentiation Potentials of Cord Matrix, Cord Blood, and Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Asian J Transfus Sci* 4(1): 14-24.

- Spits, C., Mateizel, I., Geens, M., Mertzaniidou, A., Staessen, C., Vandesselde, Y., Van Der Elst, J., Liebaers, I. & Sermon, K. 2008. Recurrent Chromosomal Abnormalities in Human Embryonic Stem Cells. *Nature Biotechnology* 26(12): 1361-1363.
- Stavropoulos, M. E., Mengarelli, I. & Barberi, T. 2009. Differentiation of Multipotent Mesenchymal Precursors and Skeletal Myoblasts from Human Embryonic Stem Cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol* Chapter 1: Unit 1F 8.
- Stojkovic, P., Lako, M., Przyborski, S., Stewart, R., Armstrong, L., Evans, J., Zhang, X. & Stojkovic, M. 2005. Human-Serum Matrix Supports Undifferentiated Growth of Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells* 23(7): 895-902.
- Takashima, Y., Era, T., Nakao, K., Kondo, S., Kasuga, M., Smith, A. G. & Nishikawa, S. 2007. Neuroepithelial Cells Supply an Initial Transient Wave of Msc Differentiation. *Cell* 129(7): 1377-1388.
- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S. & Jones, J. M. 1998. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science* 282(5691): 1145-1147.
- Trivedi, P. & Hematti, P. 2007. Simultaneous Generation of Cd34+ Primitive Hematopoietic Cells and Cd73+ Mesenchymal Stem Cells from Human Embryonic Stem Cells Cocultured with Murine Op9 Stromal Cells. *Exp Hematol* 35(1): 146-154.
- Trivedi, P. & Hematti, P. 2008. Derivation and Immunological Characterization of Mesenchymal Stromal Cells from Human Embryonic Stem Cells. *Exp Hematol* 36(3): 350-359.
- Vodyanik, M. A., Yu, J., Zhang, X., Tian, S., Stewart, R., Thomson, J. A. & Slukvin, Ii. 2010. A Mesoderm-Derived Precursor for Mesenchymal Stem and Endothelial Cells. *Cell Stem Cell* 7(6): 718-729.
- Vogel, W., Grünebach, F., Messam, C. A., Kanz, L., Brugger, W. & Bühring, H. J. 2003. Heterogeneity among Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells and Neural Progenitor Cells. *Haematologica* 88(2): 126-133.
- Wagner, W., Horn, P., Castoldi, M., Diehlmann, A., Bork, S., Saffrich, R., Benes, V., Blake, J., Pfister, S., Eckstein, V. & Ho, A. D. 2008. Replicative Senescence of Mesenchymal Stem Cells: A Continuous and Organized Process. *PLoS One* 3(5): e2213.
- Watabe, T. & Miyazono, K. 2009. Roles of Tgf-Beta Family Signaling in Stem Cell Renewal and Differentiation. *Cell Res* 19(1): 103-115.
- Watanabe, K., Ueno, M., Kamiya, D., Nishiyama, A., Matsumura, M., Wataya, T., Takahashi, J. B., Nishikawa, S., Nishikawa, S. I., Mugeruma, K. & Sasai, Y.

2007. A Rock Inhibitor Permits Survival of Dissociated Human Embryonic Stem Cells. *Nature Biotechnology* 25(6): 681-686.
- Weissbein, U., Benvenisty, N. & Ben-David, U. 2014. Quality Control: Genome Maintenance in Pluripotent Stem Cells. *J Cell Biol* 204(2): 153-163.
- Wislet-Gendebien, S., Hans, G., Leprince, P., Rigo, J. M., Moonen, G. & Rogister, B. 2005. Plasticity of Cultured Mesenchymal Stem Cells: Switch from Nestin-Positive to Excitable Neuron-Like Phenotype. *Stem Cells* 23(3): 392-402.
- Xu, C., Inokuma, M. S., Denham, J., Golds, K., Kundu, P., Gold, J. D. & Carpenter, M. K. 2001. Feeder-Free Growth of Undifferentiated Human Embryonic Stem Cells. *Nat Biotechnol* 19(10): 971-974.
- Xu, R. H., Peck, R. M., Li, D. S., Feng, X., Ludwig, T. & Thomson, J. A. 2005. Basic Fgf and Suppression of Bmp Signaling Sustain Undifferentiated Proliferation of Human Es Cells. *Nat Methods* 2(3): 185-190.
- Ying, Q. L., Nichols, J., Chambers, I. & Smith, A. 2003. Bmp-Induction of Id Proteins Suppresses Differentiation and Sustains Embryonic Stem Cell Self-Renewal in Collaboration with Stat3. *Cell* 115(3): 281-292.
- Zhao, Z., Pan, X., Liu, L. & Liu, N. 2014. Telomere Length Maintenance, Shortening, and Lengthening. *J Cell Physiol* 229(10): 1323-1329.

