

# Kök Hücrelerin Farklanmasında Rol Alan Hücresel ve Moleküler Mekanizmalar

Alp Can

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Ankara

## Giriş ve Tanımlamalar

Kök hücreleri, uzun süreyle bölünebilme ve kendilerini yenileyebilme kapasitesine sahip, kendilerinden başka hücrelere farklanabilen ve hasarlı dokuya transplante edildiklerinde dokuda işlevsellik kazanabilen hücreler olarak tanımlanmışlardır. Farklı sınıflamalar olmakla birlikte kök hücreleri, embriyonik kök hücreleri ve embriyonik olmayan kök hücreleri olmak üzere iki genel grupta irdelenir.

Embriyonik kök hücreleri, erken dönemdeki memeli embriyonu blastosistindeki iç hücre kitlesinden elde edilen kök hücreleridir. Bu hücrelerin totipotent özelliği farede tam olarak gösterilmiştir (1). Embriyon kök hücreleri Oct-4, SSEA-1, TRA1-60, TRA1-81, telomeraz gibi kök hücrelerini tanımakta kullanılan bazı proteinleri eksprese ederler. Çeşitli büyüme faktörlerinin etkisi bu hücreler üzerinde denenmiş, büyüme faktörleriyle indüksiyon yapıldığında üç embriyonik germ tabakasından (ektoderm, mezoderm ve endoderm) köken alan 11 farklı doku elde edilmiş ve 24 tür hücrede özgün belirteçlerin varlığı izlenmiştir (2). Büyüme faktörleri, etkilerine göre mezodermal hücrelere farklanmayı indükte eden faktörler (aktivin-A, TGF $\beta$ -1); ektodermal ve mezodermal indüksiyon yapan faktörler (retinoik asit, EGF, BMP-4, bFGF) ve tüm germ tabakalarına (NGF, HGF) indüksiyon sağlayan faktörler olmak üzere üç gruba ayrılmıştır (2). Embriyon kök hücreleri, avantajlarına karşın kullanımları etik çekinceler nedeniyle sınırlıdır. Hatta bazı ülkelerdeki çalışmaların sınırları bizim ülkemizde de olduğu gibi yasalarla belirlenmiştir.

Embriyon germ hücreleri ise 5-9 haftalık fetal dokunun gonad kabartısı ve mezanşiminden alınan primordiyal germ hücrelerinin kültürüyle elde edilen hücrelerdir. İç hücre kitlesinden kaynaklanmalarına karşın embriyon kök hücrelerine benzer özellikler taşırlar. Bu hücreler de üç germ tabakasına da farklanabilirler ve pluripotent kök hücrelere özgü belirteçleri taşırlar, ancak bu hücreler embriyon kök hücreleri gibi teratom yaratmazlar (3).

Embriyonun iç hücre kitlesi dışındaki kaynaklardan elde edilen kök hücreleri, embriyonik olmayan kök hücreleri adını alır. Embriyonik olmayan kök hücreleri genel olarak erişkin kök hücreleri ve fetus kök hücreleri olmak üzere iki grupta irdelenir. Erişkin kök hücrelerinden en yaygın çalışılanları hematopoetik ve non-hematopoetik mezanşimal kök hücreleridir. Hematopoetik kökenli erişkin kök hücreleri, kemik iliği, kordon kanı veya periferik kandan elde edilmiştir. Non-hematopoetik mezanşimal kök hücreleri ise kemik iliğinin stroması içinde yer alan uzantılı fibroblast-benzeri hücreler olup üzerinde en çok çalışılan kök hücre türlerinden birisini oluşturur. Bu hücreler, hematopoetik belirteçler olan CD34, CD14, CD45 ve CD133'ü eksprese ederler. Literatürde bu hücrelerin karaciğer, pankreas, çizgili iskelet kası, kalp kası, böbrek, akciğer, merkez sinir sistemi hücrelerine farkedildiği bildirilmiştir (4). Farklanmanın sağlanması *in vitro* kültür ortamlarının kimyasal kompozisyonlarının değiştirilmesiyle başarılı, *in vivo* hücrelerin kullanımıysa özellikle hematopoetik kanserlerin onarımındaki tedavilerinde mümkün olmuştur. Sinir hücresi, kalp kası ve karaciğer hücrelerinin *in vivo* işlevlerinin gösterilmesiyle ilgili bilgilerse çelişkilidir. Yapılan çalışmalarda kordon kanında, kemik iliğine göre daha yüksek oranda CD34+/CD38- hücrelerin olduğu gösterilmiş ve kordon kanı hücrelerinin kemik iliğindeki hücrelere göre daha az farklanmış olabileceği düşüncesi ortaya atılmıştır. Kordon kanındaki CD34+

hücrelerin dendritik hücelere (5), endotel progenitör hücelere (6) ve diğer hematopoetik hücelere farklandığı gösterilmiştir.

Non-hematopoetik mezankimal kök hücelerin farkanma kapasitesinin olduğunun gösterilmesi büyük ilgiyle karşılanmıştır. Kemik iliği yerleşimli mezanşimal kök hüceleri (MKH) ilk olarak 1980'lerde farelerde çalışılmıştır. Bu hücelerin kendileri gibi mezoderm kökenli olan adiposit, osteoblast ve kondrosite farklandığı görülmüştür (7). Ancak son yıllardaki yayınlarda bu hücelerin nöroektoderm ve endoderm kökenli hücelere de farkanmasının rapor edilmiş olması (8), bu hüceleri multipotent kök hücesi sınıfına sokmaktadır. Bu hücelerin embriyonik kök hücelere göre en büyük avantajları daha kolay elde edilebilir olmaları ve teratom benzeri tümör gelişimi göstermemeleridir. Ancak hematopoetik hücelerin farkanması sırasında ortaya çıkan hücesel belirteçler, non-hematopoetik MKH'de bu denli iyi ifade edilememiştir. Buna rağmen, CD73 (SH3, SH4), CD54, CD105 (SH2), CD39, CD49e gibi belirteçlerin non-hematopoetik mezanşimal kök hücelerinde eksprese edildiği bildirilmiştir. Bu belirteçlerden bazıları hücre-hücre adezyonunda görev alan proteinlerdir (CD54= ICAM-1, CD 49e=  $\alpha$ 5-integrin vb.).

### **Mezanşimal Kök Hücelerin (MKH) *In vitro* Farkanma Ölçütleri**

Multipotent MKH'ların kültür ortamlarında kolayca çoğaltılabilmeleri ve çok sayıda doku serisine farkanabilmeleri, bu hücelerin özellikle doku onarımı veya gen tedavileri gibi klinik uygulamalardaki önemini ortaya koymuştur. Bizim laboratuvarımız da dâhil olmak üzere birçok laboratuvar, MKH veya MHK-benzeri hücelerin özellikle mezanşimal seri hücelere dönüşebildiğini göstermiştir. Ancak bu önemli hücesel değişimlerin çok karmaşık olduğu, farkanma amacıyla kullanılan organik ve inorganik maddelerin farkanmayı başlatabilecek ve sürdürebilecek moleküler mekanizmaları uyarabilmeleri kontrollü olarak sınanmalıdır. *In vitro* ortamlardaki farkanmanın moleküler mekanizmaları bile henüz yeni anlaşılır hale gelmiştir. Bu bölümde üzerinde daha fazla veri elde edilmiş olan osteoblast, kondroblast ve adipositlerin farkanmasındaki çalışmalar özetlenecektir.

MKH, kemik matriksi sentezleyebildikleri için osteoblastlara farkanmada yaygın olarak kullanılan bir kök hücesi kaynağıdır. Askorbik asit,  $\beta$ -gliserofosfat ve deksametazon desteğiyle MKH'lar iki-üç hafta içinde osteoblastlara dönüşür (9). Her ne kadar bu uyarıcılar *in vitro* ortamda farkanma için yeterli gibi görünse de bu hücelerin *in vivo* ortamlarda osteoblasta farkanması sürecinde maruz kaldığı fizyolojik sinyalleri yansıtmaktan çok uzaktır. Son çalışmalarda kemik morfogenetik proteininin (BMP) rolü üzerinde durulmuş, ancak gerek insan gerekse hayvan kaynaklı hücelerin osteogenezisi üzerindeki rollerine ilişkin birbiriyle çelişen sonuçlar bildirilmiştir. Söz gelimi BMP'nin ileri derecede türe özgü değişimler gösterdiği gözlenmiştir. BMP kemiricilerde osteogenetik işaretlerin ileri derecede artışına neden olurken insan kemik iliği MKH üzerinde benzer etkiyi gösterememiştir. BMP 100 ng/ml gibi yüksek dozlarda bile alkalın fosfataz ve kalsiyum birikimi etkisi ortaya çıkmamakta (10), hatta bunun tersine osteoprogenitör hücelerin ileri farkanmasını inhibe eden bir transkripsiyon faktörü olan Msx-2'nin ekspresyonunu artırmaktadır. Öyle gözükmektedir ki, MKH farkanmasındaki küçük konsantrasyon değişimleri hücre yapısına yansımaktadır. Buna bir başka örnek de osteojenik farkanmanın inhibitörü olan Wnt sinyalinin kemik iliği ve trabeküler kemik kaynaklı MKH'de etkisini gösterdiği, ancak alternatif koşullarda bu inhibitör etkisinin söz konusu olmadığıdır. Bunun yanı sıra bir Wnt inhibitörü olan Dickkopf-1 de osteojenik farkanmayı inhibe etmektedir. Bugüne değin 19 adet Wnt ligandının, en az 4 mekanizmanın ve Wnt koreseptörünün en az 10 adet izoformunun tanımlanmış olması

hücresinin fenotipinde veya kültür koşullarında meydana gelebilecek küçük değişimlerin etkisinin ne denli farklı olabileceğini göstermektedir.

MZK'nin *in vitro* kondrogenetik farklandırılması, TGF (transforme edici büyüme faktörü)'nin varlığında mikro kütlelerin oluşumu ile karakterizedir. TGFβ'nin kondrogenezdeki görevi hücre dışı sinyallerle düzenlenen kinaz 1, p38, protein kinaz A, protein kinaz C ve Jun kinaz gibi çeşitli protein kinazları uyarmaktır. TGFβ ile uyarılan protein kinazlar Wnt ekspresyonunu uyararak bir hücre-hücre yapışma molekülü olan N-cadherin sentezinin artışına neden olurlar (11). N-cadherin, gelişmekte olan embriyonda ve *in vitro* kondrogenezin erken dönemlerinde yer alan mezanşim dokusundaki hücresele yoğunlaşmanın ve hücre topluluklarının oluşması için gereklidir. TGFβ MKH'lerin kondrogenezinde BMP6 ile sinerjik bir ilişkiye girerek onun etkisini de artırır.

*In vitro* adipojenik farklanma, klasik olarak tek tabaka halinde ekspansiyon edilen MKH'lerin deksametazon, izobutil ksantin (IBMX) ve indometazin'den oluşan bir hormon kokteyliyle başarılır. IBMX bir fosfodiesteraz inhibitörü olup cAMP'nin 5'AMP'ye dönüşümünü engelleyerek protein kinaz A'nın artışını sağlar. Protein kinaz A'nın artışı, hormona duyarlı lipaz (HSL)'in düzenleyici molekülü olan perilipin'in artışı üzerinden HSL'nin artışına neden olur. HSL, trigliseridleri gliserole ve serbest yağ asitlerine çevirir. İndometazin, adipogenezde rol aldığı iyi bilinen bir transkripsiyon faktörü olan peroksizom proliferasyonunu aktive eden reseptör (PPAR) α/γ'nın bir ligandıdır. Hücrelerin adipogenezise gidebilmesi için Wnt sinyalinin baskılanması gerekir, bu da bir çekirdek zarı reseptörü olan PPARγ'nın proteazomlar tarafından β-catenin molekülünün parçalanmasını artırmasıyla gerçekleşir (12). Adipogenezin ilerlemesi için doğal Wnt sinyalinin baskılanması, osteogenezde de etki gösterir, çünkü PPARγ'nın aktivasyonu osteogenezisi inhibe eder. Bu nedenle, "aktive olmuş PPARγ ile Wnt'in doğal sinyal etkisi MKH'in kemik mi yoksa yağ hücresi mi olacağını belirlemede ince bir dengenin varlığını gerektirir" sonucu çıkarılabilir.

### **Mezanşimal Kök Hücrelerin (MKH) *In vivo* Farklanma Özellikleri**

1970'lerde Friedenstein'in öncülüğündeki çalışmalarla MKH'in *ex vivo* olarak büyütülebildiği ve *in vivo* implantasyondan sonra farklanma özelliklerini korudukları gösterilmiştir. İrradasyonda tutulan farelere yapılan MKH implantasyonundan sonra, hücrelerin kemik, kıkırdak ve akciğerlerdeki varlığı gösterilerek bu hücrelerin fibroblastları veya fibroblast-benzeri hücreleri ürettiği gösterilmiştir. Farklanan bu fibroblastlar daha sonra akciğer, kıkırdak, uzun kemikler, kuyruk ve deriden tekrar izole edilirler. İnsan MKH koyun uterusuna transplante edilerek yerleştiği bölgeye göre kondrosit, adiposit, myosit, kardiyomyosit ve kemik iliği stroma hücrelerinin oluşumuna katkıda bulunduğu gösterilmiştir (13). İnsan hücrelerinin koyundaki immünolojik tepkiye karşın birçok dokuda 13 ay gibi bir süre boyunca varlığını sürdürdüğü görülmüştür. Böylece ilk kez insan kaynaklı MKH'in farklı hücrelere dönüşebilme yeteneklerinin yanında özgün immünolojik özelliklerinin olabileceği savı ortaya atılmıştır. Her geçen gün daha fazla sayıda ve farklı dokunun onarımında MKH'lerin kullanıldığına ilişkin raporlar yayınlanmaktadır. Son olarak böbrek, akciğer ve kalp bunlara katılmıştır.

### **Mezanşimal Kök Hücrelerin Klinik Kullanımları**

MKH ve MKH-benzeri hücrelerin multipotent olmaları ve kültür koşullarında kolayca çoğaltılabilmeleri nedeniyle özellikle doku onarımlarındaki ve gen tedavilerindeki potansiyelleri göz önüne alınarak önemleri artmıştır. O nedenle, şu aralar, birçok klinik tarafından bir dizi hastalıkta denenmektedirler. Özellikle, osteogenezis imperfecta (14), metakromatik lökodistrofi ve Hurler sendromlu hastalarda (15) klinik

uygulamada ümit vaad edici sonuçlar ortaya çıkmıştır. Son yıllarda, allojenik MKH infüzyonları ve alıcı uyumluluğu çok tartışılır olmuştur. MKH'in en belirgin özelliklerinden birisi, alıcıda inflamasyonu ve immünolojik yanıtları baskılamasıdır. *In vitro* testlerde MKH'nin karışık lenfosit tepkime testlerinde allojenik yanıt göstermediği ve sitotoksik T-hücreleri ve doğal öldürücü hücreler tarafından ortadan kaldırılmadığı saptanmıştır. MKH'in bu bağışıklık düzenleyici özellikleri bu hücrelerin HLA tip-II reseptörleri olmamasıyla ve sitokin salgılaması olmamasıyla açıklanabilir (16). Buna karşın, allojenik tranplante edilen MKH'in farklılıktan sonra *in vivo* koşullarda varlıklarını sürdürebilmeleri konusundaki bilgiler henüz yeterli değildir. Bugün en çok çalışılan alanlardan birisi de budur.

Öyle gözükmektedir ki, yetişkin kök hücreler, özellikle insan kaynaklı MKH, onarımsal tıpta ve gen tedavilerinde giderek daha önemli hale gelecektir. İlginç olan birçok hücrel ve moleküler mekanizma ortaya kondukça MKH'in klinik kullanımları daha yaygın ve daha güvenli hale gelecektir.

## Kaynaklar

1. Toyooka Y et al. Embryonic stem cells can form germ cells *in vitro*. Proc Natl Acad USA 30; 11457-62, 2003.
2. Schuldiner M et al. Effect of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci USA 97: 11307-12, 2000.
3. Pera Martin F, Reubinoff B. Human Embryonic Stem Cells. J Cell Science 113, 5-10, 2000.
4. Poulosom R et al. Adult stem cell plasticity. J Pathol 197: 441-456, 2002.
5. Ryu KH et al. In vitro generation of functional dendritic cells from human umbilical cord blood CD 34+ cells by a 2-step culture method. 80: 281-6, 2004.
6. Aoki M et al. Stem Cells. Derivation of functional endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood mononuclear cells isolated by anovel cell filtraion device. Stem Cells 22: 94-102, 2004.
7. Minguell J et al. Mesenchymal Stem Cells. Exp Biol Med 226: 507-520, 2001.
8. MF Pittenger et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 284: 143-147, 1999.
9. Colter DC et al. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. Proc Natl Acad Sci USA 96 7294-7299, 2000.
10. Diefenderfer DL et al BMP responsiveness in human mesenchymal stem cells. Connect Tissue Res 44 (S1) 305-311, 2003.
11. Tuli R et al, Transforming growth factor-beta-mediated chondrogenesis of human mesenchymal progenitor involves N-cadherin and mitogen-activated protein kinase and signaling cross-talk. J Biol Chem 278: 41227-41236, 2003.
12. Liu J ve Farmer SR. Regulating the balance between peroxisome proliferator-activated receptor gamma and beta-catenin signaling during adipogenesis. A glycogen synthase kinase 3beta phosphorylation-defective mutant of beta-catenin inhibits expression of a subset of adipogenic genes. J Biol Chem 279:45020-45027, 2004.
13. Liechty KW et al. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after utero transplantation in sheep. Nat. Med. 6: 1282-1286, 2000.
14. Horwitz EM et al. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: implications for cell therapy of bone. Proc Natl Acad Sci USA 99: 8932-8937, 2002.
15. Koc ON et al. Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH). Bone Marrow Transplant 30:215-222, 2002.
16. Angoulvant D et al. Human mesenchymal stem cells suppress induction of cytotoxic response to alloantigens. Biorheology 41: 469- 476, 2004.