

Kök hücrede gen transferi ile istenen bir genin aktivasyonu veya susturulması uygulamalarının rejeneratif tıpta kullanımı

Using a desired gene activation or silencing methodology with gene transferring to stem cell in regenerative medicine

Zehra Dilşad Çoban*, Şefik Güran

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı (Dr. Z. D. Çoban, Prof. Dr. Ş. Güran), Gülhane Askeri Tıp Akademisi, TR-06018 Ankara

Özet

İnsan kök hücresi kendine benzeyen hücreler oluşturabilen ve farklılaşma potansiyeline sahip özellikte hücrelerdir. Embriyonik kök hücreler farklı hücre tiplerine dönüşebildiği için kök hücre biyolojisinde ve rejeneratif tıpta paha biçilmez bir araçtır. Yeni gelişen gen teknolojileri ile ökaryot hücreye gen aktarımı mümkündür. Bu teknolojiler ile hücrede istenilen genlerin aktiflenmesi veya susturulması olasıdır. Uygun ortam sağlandığında normalde kapalı olan bazı genlerin aktif formlarının hücre çekirdeğine aktarılması ile farklılaşmış bir insan hücresinden indüklenmiş pluripotent kök hücreler elde edilmektedir. Bilindiği gibi, “small interference RNA” ve “micro RNA” lar hücrede gen fonksiyonlarını düzenlerler. Bu moleküller ökaryot hücrede gen susturulması amacı ile genellikle viral ve viral olmayan metodlar ile aktararak kullanılırlar. Gen susturulması teknolojisi, embriyonik kök hücre veya indüklenmiş pluripotent kök hücrelerin istenilen yönde örneğin bir nöron, pankreas veya kalp hücresi yönünde farklılaşmasında önemli bir araçtır. Tüm bu gelişmeler bize doku mühendisliği alanında hasta bazlı rejeneratif tıp uygulamalarının yapılabileceğini, kişiye özgü doku ve organ temininin mümkün olabileceğini göstermektedir.

Anahtar sözcükler: Embriyonal kök hücre, indüklenmiş pluripotent kök hücre, si RNA, mi RNA, rejeneratif tıp, gen transferi

Abstract

Human stem cell is a kind of special cell type which has self renewal capacity and differentiation potential. Embryonic stem cells are an invaluable tool for stem cell biology and regenerative medicine as they have the capacity to differentiate into various functional cells. With the new gene technologies improved in recent years, it is possible to transfer a gene into a eukaryote cell. A desired gene can be activated or silenced via these technologies. In an appropriate condition, a differentiated human cell can be transformed into induced pluripotent stem cell by transforming the active form of some genes into the cell nucleus which are normally in inactivated form. As known, small interference RNA and micro RNA's regulate the gene function in the cell. These molecules are generally transfected to eukaryote cells for gene silencing by using viral and non-viral transfection methodologies. Gene silencing technology is an important tool to drive induced pluripotent stem cell into a desired pathway becoming a differentiated neuronal cell, a pancreatic cell or a cardiac cell. These improvements may represent us a possibility of regeneration therapy applications in the future. This technology may provide us tissue and organ requirement in personal based conditions.

Keywords: Embryonal stem cell, induced pluripotent stem cell, si RNA, mi RNA, regenerative medicine, gene transfection

Geliş tarihi/Received: 23 Şubat 2011; **Kabul tarihi/Accepted:** 18 Haziran 2011

***İletişim adresi:**

Dr. Zehra Dilşad Çoban, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, GATA, TR-06018 Ankara.
E posta: dilsadyilmaz_dr@hotmail.com

Giriş

İnsan kök hücreleri (Stem cell) kendine benzeyen hücreler yapabilen (self-renewal) ve farklılaşma (differentiation) potansiyeline sahip olan hücrelerdir. Farklanma durumlarına göre kök hücreler totipotent, pluripotent ve multipotent olarak üç ana grupta incelenir. Totipotent kök hücre grubunda yer alan embriyonal kök hücreler bir canlıyı oluşturabilecek ektodermal, endodermal ve mezodermal germ yapraklarına ait hücreleri oluşturabilirler. Embriyonal dönemden sona gözlenen pluripotent ve multipotent yapıdaki kök hücreler yeni bir canlıyı oluşturabilme yeteneği olmayan kök hücrelerdir. Organizmada rezerv olarak tutulur ve organizmanın gereksinimi olan hücre hatlarının yapımını sağlar. Örneğin bu grup içinde yer alan hematopoetik kök hücreler organizmanın ihtiyacı olan tüm kan hücrelerini yapar. Deneysel ortamda uygun olarak yönlendirildiğinde tamir dokusu oluşturabilir [1-3]. Bu yönü ile kök hücre çalışmaları gelişimsel biyoloji, hücre temelli gen tedavisi ve rejeneratif tıpta kullanım alanı bulmaktadır [4].

Embriyonal kök hücreden yeni bir canlı oluşturulabildiği için tüm dünyada insan embriyonal kök hücre çalışmaları kontrol altına alınmaktadır. Embriyonal dönemde birçok mekanizmanın ve etkilenen genlerin ortak olması nedeni ile bu konuda çalışan bilim adamları genellikle fare veya rat gibi hayvan kökenli çalışmalara yönelmektedir [1].

Bilindiği gibi en iyi embriyonal kök hücre zigottur. Özellikle rejeneratif tıp alanında embriyonal kök hücre elde etme aşamasında erişkin bir bireyin zigotuna erişmek mümkün olmadığı için farklılaşmış hücre modellerinden kök hücre oluşturulmaya çalışılmaktadır. Bu konuda ilk çalışma Takahashi ve ark. [6] tarafından 2006 yılında yapılmıştır. Bu çalışmada fare embriyonik fibroblastları ve erişkin fare kuyruk fibroblastlarında Oct ^{3/4}, Sox 2, Nanog, c-myc ve Klf 4 gibi transkripsiyon faktörleri kullanılarak embriyonal kök hücre benzeri hücreler elde edilmiştir. Elde edilen hücreler bire bir embriyonal kök hücre olmasa da birçok özellikleri açısından embriyonal kök hücreye benzemektedir. Günümüzde bu hücreler indüklenmiş pluripotent kök hücreler (Induced Pluripotent Stem Cell-IPSC) adını almaktadır. Bu çalışmada kök hücre oluşumunda ve devamlılığında (stemness) önemli olan ve erişkin dönemde kapatılan genlerin yerine dışarıdan gen transfeksiyon yöntemleri ile doğrudan nükleer gen transferi yapılarak "IPSC" hücreler elde edilmiştir [5, 6]. Bir yıl sonra erişkin insan hücrelerinden insan IPSC hücresi yine aynı grup tarafından elde edilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda farklılaşma bile bir hücrenin kök hücre haline dönebileceğini deneysel olarak ortaya konmaktadır [7].

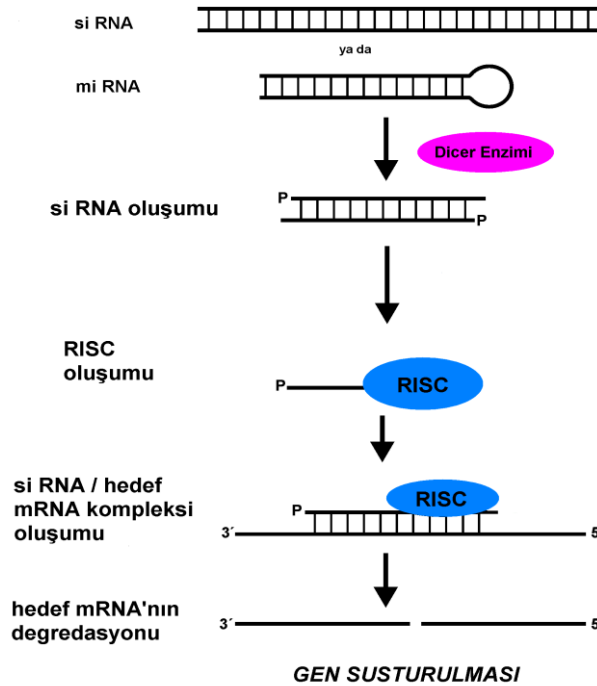
Aslında bilindiği gibi teratoma insan organizmasında ektoderm, endoderm ve mezodermi oluşturabilen yapıdır. Bu durum teratomun köken aldığı hücre yapısını embriyonal kök hücre benzeri yapıya değiştirdiğinin kanıtıdır. Günümüzde kanserin ya köken aldığı hücreyi kök hücre formatına dönüştürerek ya da doğrudan kök hücre yapısından geliştiği ileri sürülmektedir. Kanser kök hücresi diğer normal kök hücreden farklı olarak kontrolsüz bir çoğalma ile kanseri oluşturmaktadır [8, 9]. "IPSC" çalışmaları kanser kök hücresinden farklı olarak kontrollü bir şekilde organizmadaki farklılaşmış bir hücreden kök hücre oluşturma çabalarına öncüdür. Gelecekte "IPSC" çalışmaları ile kişinin gereksinimi olan organ yapılmasının önü açılabilir. Hastalık mekanizmaları, ilaç etkileşimleri ve toksisitesini daha iyi anlayabileceğimiz deneysel bazlı çalışmalar IPSC teknolojisi ile mümkün olabilecektir [7].

Tıpta devrim yaratabilecek bir buluş olan IPSC teknolojisi günümüzde gelişmiş viral gen transfeksiyon deneyleri sonucunda hücre içine Oct ^{3/4}, Sox 2, Nanog, c-myc ve Klf 4 genlerinin aktarılması ile mümkün olmuştur. Gen aktarımında retroviral vektörler kullanılmış, hücre nükleusuna transfer olan genlerin fonksiyon göstermesi sonucu erişkin hücre embriyonel kök hücre benzeri özellik kazanmıştır [2, 6]. Ancak yine de bu çalışmalar ön çalışma niteliğindedir. "IPSC" lerin elde edilmesi alanında önemli olan Oct ^{3/4} Sox 2, Nanog, c-myc, Klf 4 genler aynı zamanda kök hücrenin farklılaşmadan devamlılığını sağlayan genlerdir. Bu genler farklılaşma evresinde kapatılarak hücre

farklanması sağlanır ve buna bağlı farklı doku ve organ gelişimi sağlanır. Bu nedenle hücre farklanmasında önemli olan bu genlerin kontrol edilmesi, gen ekspresyonunun sağlanması veya durdurulması hücre fonksiyonlarının kontrolü veya bir rejeneratif tıp uygulaması için çok önemlidir [6]. Günümüzde “IPSC” lerinin oluşumunda aktive edilen c-myc onkogeni kanser oluşumunu tetiklemesi yönünden önemli bir tehlikedir. “IPSC” oluşması aşamasında hücreye aktarılan c-myc geni normalde erişkinde protoonkogen halinde inaktif bir formda bulunmakta olup, bu genin aktivasyonu ile tanımlanmış birçok kanser vardır [10]. Günümüzde çalışmalar c-myc geni aktarımı olmadan “IPSC” elde etme üzerine yoğunlaşmakta, farklı genlerin aktive edilmesi veya susturulması (gene silencing) ile hücre bazda olan değişiklikler takip edilerek hücre fonksiyonları anlaşılmasına çalışılmaktadır [7].

Günümüzde ökaryot hücreye viral vektör ile gen aktarımının yanında viral olmayan gen aktarımı çalışmaları hız kazanmıştır. Viral olmayan gen aktarımında daha küçük moleküllerin hücre içine gönderilmesi amaçlanır. Bu amaçla ilk kullanılan yöntemlerden olan elektroporasyon günümüzde daha da geliştirilerek “nucleofection” teknolojisi adı altında yaygın kullanım alanı bulmuştur. “Nucleofection” yönteminde ise elektroporasyon ile istenilen geni taşıyan plazmid vektör ökaryot hücreye aktarılır. Bir diğer yöntem ise lipozom ile gen transferinin yapılmasıdır. Lipozom bilindiği gibi fosfolipid çift sıralı yapı olup, hücre membranını oluşturan asıl yapı benzeridir. Lipozom kökenli yöntem ve “nucleofection” yöntemi ökaryot hücrede gen kontrolü ve gen sessizleştirilmesinde rolü olan small interference RNA-si RNA veya micro RNA-mi RNA’ ların aktarılmasında sıklıkla kullanılmaktadır [11]. Viral vektörler özellikle hızla bölünen hücreleri tercih ettiğinden dolayı kanser hücreleri ile olan gen tedavi uygulamalarında kullanım alanı bulmuştur. “nucleofection” yöntemi ise özellikle bölünmeyen (örneğin nöral hücreler) gen aktarımında önemli avantajlar sağlamaktadır [12, 13].

Günümüzde istenilen genlerin aktive edilmesi kadar, hedeflenen bazı genlerin aktivasyonlarının engellenmesi de önemlidir. Embriyogenez aşamasında embriyonal kök hücrenin başka hücre tiplerine farklanmasını sağlayan mekanizma “IPSC” oluşumunda etkin genlerinin susturulması ile başlar [6]. Yukarıda tanımlanan ökaryot hücreye gen aktarım teknolojisi ile özellikle si RNA veya mi RNA’ ların hücreye aktarılması ile belli genlerin susturulması embriyonal kök hücrelerinin istenilen yöne farklanmasının önünü açmıştır (Şekil 1). Rejeneratif tıpta günümüzde miyokard enfarktüsü gelişmiş bir kalp dokusunun tamirinde bu bölgeye uygulanan kök hücrelerin tanımlanan genlerinin kapatılması veya aktive edilmesi ile uygun büyüme faktörlerinin bulunduğu ortamda bir tamir dokusu veya kılcal damarlanma (angiogenesis) oluşturulabilmektedir [14]. Embriyonik kök hücreler uygun ortamlarda transkripsiyon faktörlerinin yardımı ile farklanması yönlendirilerek birçok farklı hücre grubuna dönüştürülebilirler. Böylece embriyonal kök hücre in vitro ortamda nöron, pankreas, karaciğer, kalp hücrelerine dönüştürülerek tedavi stratejileri için model oluşturulabilir. Aynı zamanda insan embriyonik kanser hücrelerinden elde edilen embriyonik kök hücreler de embriyogenezin anlaşılması çalışmalarında kullanılmaktadır [15]. Çalışılmak istenen genlerin susturulması ancak son yıllarda bulunan mi RNA ve si RNA’ lar ile gündeme gelmiştir. Bilindiği gibi bu küçük RNA molekülleri hücrede m RNA’ ya bağlanarak degradasyonunu sağlar. Bu da hücrede o genin bir yönden etkisizleştirilmesi anlamına gelir (Şekil 1) [16, 17]. Si RNA molekülleri hücreye aktarıldığında kısa sürede hücre tarafından algılanarak etkisiz hale getirilebilmektedir. Bu nedenle si RNA molekülü ile gen sessizleşmesi halen kısa sürelerle mümkün olmaktadır (Şekil 1). Özellikle 30 baz çifti üzerinde olan moleküllerin “interferon response”- interferon cevabı ile baskılandığı bilinmektedir. Bu nedenle ilk çalışmalar 30 baz çiftinin altında olan moleküller kullanılmıştır. Günümüzde bu sorun degradasyona daha dayanıklı si RNA molekülleri oluşturularak çözülmeye çalışılmaktadır [18].



Şekil 1. Hücreye aktarılan si RNA veya mi RNA' nın hedef m RNA üzerinden gen susturulmasındaki rolü.

Sonuç olarak hücre moleküler biyolojisinin anlaşılması ve gen transfer metodlarının gelişmesi ile ökaryot hücreye istenilen genler aktarılabilen ve bu yolla genlerin aktivasyonu ve susturulması sağlanmaktadır. Farklı hücre tiplerine dönüşebilen kök hücrelerin bu şekilde kontrol edilmesi, yönlendirilmesi sonucunda rejeneratif tıpta yeni uygulama alanları karşımıza çıkmaktadır. Her yıl milyonlarca kişinin iyileşmeyen kronik yaralardan veya organ yetmezliklerinden kaybedildikleri göz önüne alındığında kişiye özgün yara tamirinin veya organ yapımının gerçekleştirilmesinin ne kadar önemli sonuçları olacağı açıktır [19-21].

Kaynaklar

1. Verfaillie CM, Pera MF, Lansdorp PM. Stem cells: hype and reality. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2002; 369-91.
2. Ogawa M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. Blood 1993; 81: 2844-53.
3. Banerjee P, Crawford L, Samuelson E, Feuer G. Hematopoietic stem cells and retroviral infection. Retrovirology 2010; 7: 8.
4. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science 1998; 282: 1145-7.
5. Stewart R, Yang C, Anyfantis G, Przyborski S, Hole N, Strachan T, Stojkovic M, Keith WN, Armstrong L, Lako M. Silencing of the expression of pluripotent driven-reporter genes stably transfected into human pluripotent cells. Regen Med 2008; 3: 505-22.
6. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell 2006; 126: 663-76
7. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell 2007; 131: 861-72.

8. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414: 105-11.
9. Pardal R, Clarke MF, Morrison SJ. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 895-902.
10. Haim S, Mitelman F. *Cancer Cytogenetics, chromosomal and molecular genetic aberrations of the tumor cells*. Wiley Blackwell Publications. 3 th ed. New Jersey 2009.
11. Takada T, Nemoto K, Yamashita A, Kato M, Kondo Y, Torii R. Efficient gene silencing and cell differentiation using siRNA in mouse and monkey ES cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 331: 1039-44.
12. Mancheño-Corvo P, Martín-Duque P. Viral gene therapy. *Clin Transl Oncol* 2006; 8: 858-67.
13. Ko BS, Chang TC, Shyue SK, Chen YC, Liou JY. An efficient transfection method for mouse embryonic stem cells. *Gene Therapy* 2009; 16: 154-8.
14. Güran Ş. Kalp yetmezliğinde anjiyogenezis ve gen tedavisi. *Gülhane Tıp Dergisi* 2004; 46: 84-7.
15. Lakshmipathy U, Pelacho B, Sudo K, Linehan JL, Coucouvanis E, Kaufman DS, Verfaillie CM. Efficient transfection of embryonic and adult stem cells. *Stem Cells* 2004; 22: 531-43.
16. Matin MM, Walsh JR, Gokhale PJ, Draper JS, Bahrami AR, Morton I, Moore HD, Andrews PW. Specific knockdown of Oct4 and beta2-microglobulin expression by RNA interference in human embryonic stem cells and embryonic carcinoma cells. *Stem Cells* 2004; 22: 659-68.
17. Hyslop L, Stojkovic M, Armstrong L, Walter T, Stojkovic P, Przyborski S, Herbert M, Murdoch A, Strachan T, Lako M. Downregulation of NANOG induces differentiation of human embryonic stem cells to extraembryonic lineages. *Stem Cells* 2005; 23: 1035-43.
18. Velkey JM, O'Shea KS. Oct4 RNA interference induces trophectoderm differentiation in mouse embryonic stem cells. *Genesis* 2003; 37: 18-24.
19. Prakash S, Khan A, Paul A. Nanoscaffold based stem cell regeneration therapy: recent advancement and future potential. *Expert Opin Biol Ther* 2010; 10: 1649-61.
20. Hemmat S, Lieberman DM, Most SP. An introduction to stem cell biology. *Facial Plast Surg* 2010; 26: 343-9.
21. Poss KD. Advances in understanding tissue regenerative capacity and mechanisms in animals. *Nat Rev Genet* 2010; 11: 710-22.