

Hematopoitik Kök Hücrenin Moleküler Biyolojisi

Dr. Meral BEKSAÇ

Ankara Tıp Fakültesi, Hematoloji Bilim Dalı, Ankara

Kök hücre, kendini yenileyebilme ve farklılaşabilme özelliklerini birlikte taşıyan hücreler olarak tanımlanmaktadır. Böylece olgun hücrelerde rastlanılmayan asimetrik bölünme gösterebilmektedirler. Oysa bu davranış özelliğinin biyolojisi, mekanizmaları, sorumlu genler, kök hücre kompartmanını oluşturan hücrelerin genetik ve moleküler özellikleri halen araştırma aşamasındadır. Son zamanlarda asimetrik bölünmeyi düzenleyen genlerin tanınmaya başlanması, kök hücre havuzu içinde istirahatte olan ve uyarılmış hücre gruplarının tanınması, lösemi ve hatta solid tümörlerin gelişiminde kök hücreden gelişebileceklerinin gösterilmesi çok önemli gelişmelerdir. Bu bilgilerin ortaya çıkması ve gelişmeler, normal farklılaşma fizyolojisi dışında kök hücre plastisitesi, rejeneratif klonlama ve hatta karsinogenezin daha iyi anlaşılmasını sağlayabilecek niteliktedir.

Plan

1. Farklı dokulardan elde edilen hematopoitik kök hücrelerin genetik profilleri
2. Kök hücre proliferasyon ve farklılaşmasında rol oynayan genler
3. Embriyonik ve erişkin kaynaklı kök hücrelerin genetik profili
4. Kanser/Lösemilerde gözlenen hematopoitik kök hücre fenotip/genotipi

1. Farklı Dokulardan Elde Edilen Hematopoitik Kök Hücrelerin Genetik Profilleri

Hematopoitik kök hücreyi (HKH) tanımak için kullanılan en iyi bilinen belirleyici CD34'dür.

Ancak bu özelliği taşıyan hücreler arasında istirahatteki kök hücreler ile bir miktar farklılaşma gösteren kök hücreler birlikte yer almaktadır. HKH içerisinde CD34+CD38- niteliği taşıyanlar erken aşamaya ait farklılaşma göstermemiş hücrelerdir. Erken kök hücreleri saflaştırmak için ilave olarak Thy-1(CD90), HLA-DR, CD133, c-kit(CD117) veya Rhodamin-123^{sayıf} gibi diğer fenotipik özellikler de kullanılmaktadır. Ancak bu fenotipik özelliklerin farklılaşma potansiyeli ve proliferasyon durumu ile ilişkisi henüz tam aydınlatılmış değildir. Kök hücre araştırmalarında bir standart oluşturması açısından CD34+/CD38-/lin- olan CD34+ hücrelerin %1-10 unu oluşturan, olgunlaşmamış erken HKH havuzu, CD34+/CD38+/lin++ olan hematopoitik progenitör hücrelerden (HPH) ayrı olarak incelenmesi tercih edilmektedir.

Farklı hematopoitik dokularda bulunan HKH'lerin transplantasyon başarısı hem deneysel hem de klinik olarak çok iyi irdelenmiş bir konudur. Farklı dokularda bulunan kök hücrelerin proliferatif kapasitelerinin, buna ikincil olarak telomer uzunluklarının farkının gösterilmesi genetik farklılıkları olacağını düşündürmektedir. Nitekim 2004 Temmuzunda yayınlanan Georgantas ve ark.nın araştırmasında insan kordon kanı, kemik iliği ve mobilize edilmiş periferik kök hücrelerinde HKH ve HPH gruplarında gen ekspresyon profilini incelediler. Böylece ilk kez farklı dokulardaki erken dönem ve farklılaşmaya başlamış HKH llerde artmış veya baskılanmış genler gösterilmiş oldu. Bu araştırmada erken HKH'lerde incelenen 45102 genden 4746 sının tüm dokulardaki kök hücreler için ortak olduğu, mobilize çevre kanının fazla olarak 254, kemik iliğinin 394, kordon kanının ise 3686 gen içerdiği gözlenmiştir. Ortak

olan genlerin sınıflandırılması sonucunda büyük kısmının henüz tanımlanmamış genlerden oluştuğu görülmektedir. Aynı çalışmada erken dönem HKH'lerde geç dönem HPH lere oranla artmış olan gen ekspresyonlarına bakıldığında artış gösteren genlerde her doku için ortak olan sayısı ancak 81 gen bulunmuştur. Dokuya özgü farklı genlerde ise kemik iliği en çok gen ekspresyon artışı göstermektedir (n:926), onu kordon kanı (n: 575) ve ardından mobilize çevre kanı (n:314) izlemektedir. Burada erken aşamadaki HKH'lerde daha yüksek ekspresyon gösteren genlerin sinyal ileti, transkripsiyon, DNA yapı genleri olduğu gözlenmiştir. Yine önemli bir oranda tiplendirilmeyen genler de bulunmaktadır. Erken ve geç aşamadaki HKH'ler kıyaslandığında erken kök hücrelerde azalmış olarak eksprese edilen gen sayısı bakımından en çok azalmış gene kemik iliğinde (n: 769), daha sonra kordon kanında (n:489) ve en az mobilize çevre kanında (n:230) rastlanılmaktadır. Burada farklılaşma ile artan gen ekspresyonlarının sinyal ileti yolu, hücre döngüsü, protein biyosentezi, transkripsiyon, DNA yapısı ve tamir genleri sınıfında olduğu görülmektedir. Yine burada da çok büyük oranda sınıflandırılmamış gene rastlanılmaktadır.

Bu çalışmada daha önce HKH'leri CD38 ve lin ekspresyonuna göre ayırmadan yapılan çalışmalarda saptanan hematopoezde rol oynayan, KIT, FLT3, GATA-2, GATA-3, p27, HoxA5 ve HoxA2 ile kök hücreye ait belirleyiciler olarak kabul edilen CD34 ve MDR2 genlerinin erken HKH'lerde saptandığı ancak CD38 ve myeloperoksidaz geninin eksprese edilmediği görülmüştür. Bu bulgu hücre ayrıştırmasında kullanılan akım sitometrik yöntemin etkinliğini de kanıtlamaktadır.

Benzer şekilde hem insan hem de farelerde microarray ile gen ekspresyon profilini inceleyen araştırmaların metaanalizi yapıldığında erken HKH'lerde artmış ekspresyon gözlenen genler HLF, HERMES, CD110(MPL), ROBO4, HOXB6, GATA3, SOCS-2, SPTBN1, MDS1, KLF4, TRAIL, GBP2, DKFZP434J214, CEBPB dir. Bunların işlevsel önemi zamanla ortaya çıkacaktır.

2. Kök Hücre Proliferasyon ve Farklılaşmasında Rol Oynayan Genler

Hematopoietik kök hücre havuzu içinde genellikle istirahatte olan, bölünme ve farklılaşma gibi asimetric çoğalma özelliklerini birlikte barındıran bir grup hücre ile çoğalma özelliği daha fazla olan ve daha ziyade farklılaşmaya yatkın olan bir başka

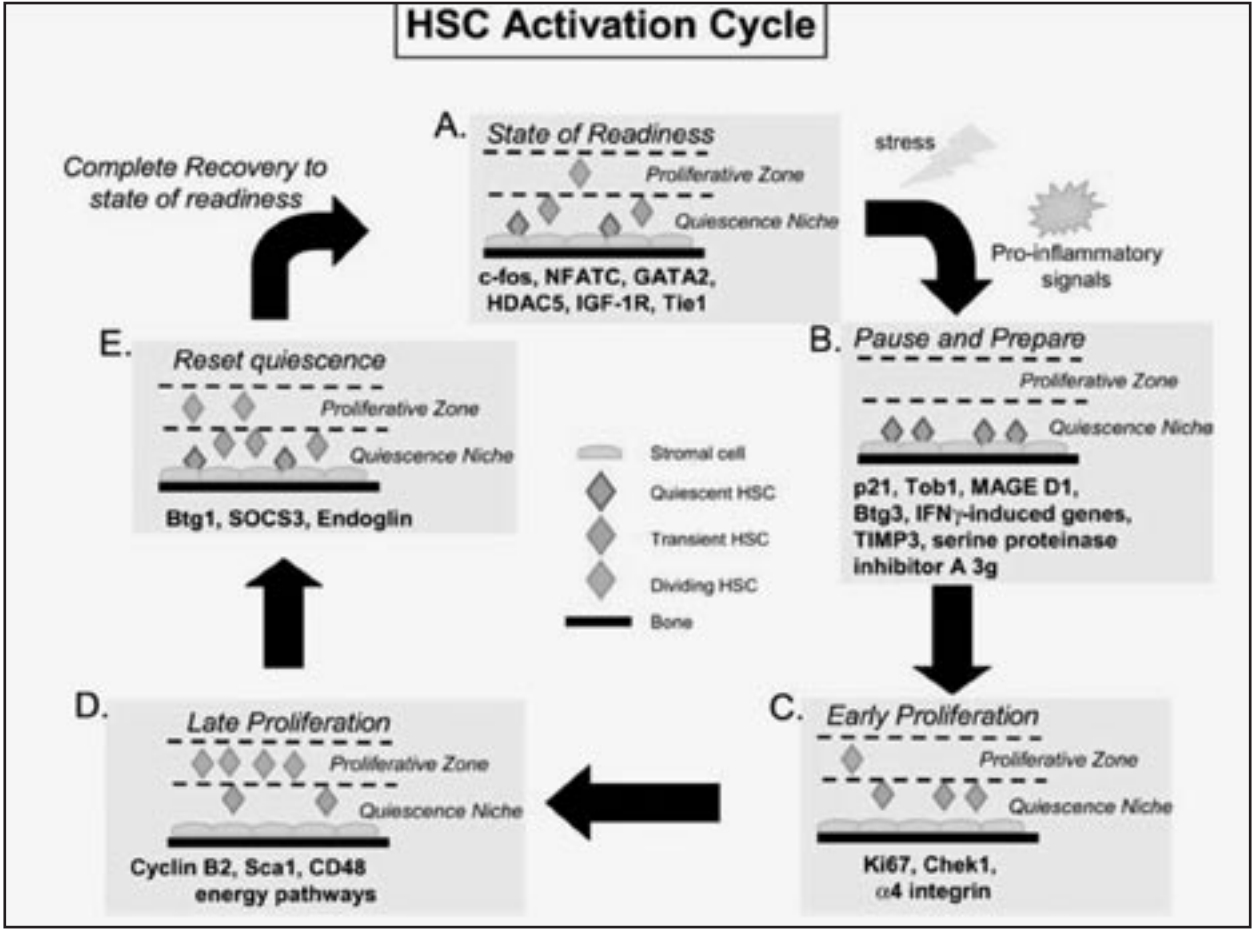
populasyon daha bulunmaktadır. Bu iki hücre grubu da CD34+/CD38- özelliğindedir. Ağustos 2004 de Wagner ve ark tarafından Blood da yayınlanan bir çalışmada kordon kanından elde edilen HKH'ler yavaş ve hızlı bölünen fraksiyonlara ayrıldıktan sonra bu hücrelerin gen ekspresyon profilleri incelenmiş ve CD34+/CD38+ hücrelerle de karşılaştırılmış. Yavaş bölünen hücrelerde artmış olan genlere bakıldığında CD133, ERG, Siklin G2, MDR1, osteopontin, CLQR1, IFI16, JAK3, FZD6, HOXA9 öne çıkmaktadır. Yavaş bölünen hücrelerde azalan gen ekspresyonları ise CD36, cadherin1 tip, hemoglobin gibi genlerdir. Hücrelerin CD34+/CD3- olanlarında CD34+/CD38+ lere göre ekspresyonu artmış olan genler ise endomucin, ras ilişkin protein, osteopontin, sperm ilişkin antijen 9, ankirin g gibi genlerdir. Buna karşılık azalmış olan genler ise CD38, IL-7R, CD24, Ki67, CD36, HGF, PCNA, Siklin B2, miyeloperoksidaz, hyaluronan (rhamm) reseptör sayılabilir. Görüldüğü üzere bu sayılan genlerin azalması veya kazanılması yavaş bölünen ve ilkel hücrelerden hızlı bölünen ve farklılaşabilen hücrelere transformasyonu sağlamaktadır. Bölünme özellikleri ile immunfenotipik özellikler birlikte değerlendirildiğinde yavaş bölünen ve CD34+/CD38- hücrelerde artan genler osteopontin, MDR1, SH3 bağlayıcı protein, mn1 gibi 15 genidir. Buna karşılık farklılaşma gösteren ve CD34+/CD38+ hücrelerde artan genler ise CD36, HDC, Kell kan grup proteini, ve GATA1 gibi 12 adet genidir.

Yavaş bölünen hücreler ayrıca rhodamine tutulumu ve morfolojik özellikler açısından da farklılık göstermekte ve farklılaşma potansiyeli yüksek hücrelerden ayrılmaktadır.

Benzer bir çalışma bu yıl Ekim ayında Baylor grubu tarafından farelerde 5-FU modelinde araştırılmış ve aşağıdaki şekilde resmedilen bir modelde HKH'lerin istirahatte ve proliferasyon öncesi hazırlık ve daha sonra proliferasyonda ortaya çıkan değişimler özetlenmiştir. Bu olağanüstü araştırmanın sonuçlarının insana uyarlanabilmesi için benzer deneylerin insan HKH'lerinde de gerçekleştirilmesi gereklidir. Zira fare ve insan HKH'lerinde bazı gen ekspresyon farklılıkları bilinmektedir.

3. Embriyonik ve Erişkin Kaynaklı Kök Hücrelerin Genetik Profili

Erişkin ve fetal dokulardan elde edilen hematopoietik kök hücrelerin gen ekspresyonları incelenirken doğal olarak embriyonik kök hücrelerin



de analiz gereksinimi ortaya çıktı ve mümkün oldu. Haziran 2004 de yine Blood da yayınlanan bir araştırmada embriyonik kök hücre dizilerinden elde edilen HKH'lerin CD34+/CD38- olanlarında microarray ile gen ekspresyon profili incelenerek erişkin kemik iliği HKH aynı kompartmanı ile benzerlik ve farklılıkları rapor edildi.

Bu araştırmada arka plana göre en az 3 kat artmış ekspresyona sahip 1692 genin kemik iliği(Kİ) HKH'lerinde, 1494 ünün de embriyonik(ES) HKH'lerde bulunduğu bildirildi. Bu genlerin ayrıntılı incelenmesinde her iki kaynak için ortak olan 791 gene karşılık 803 genin sadece ES-HKH'lerde artmış olarak ifade edildiği görüldü. *Flt3* geninin ES-HKH'lerde belirgin olarak azalmasına karşılık Kİ-HKH'lerde bulunduğu, embriyonik epsilon-globin geninin ES-HKH'lerde bulunmasına karşılık beta-globin geninin sadece Kİ-HKH'lerinde saptandığı görüldü. Yine aralarındaki önemli bir farklılık ta major histokompatibilite kompleks gen ekspresyonunda gözlemlendi: Kİ-HKH'lerde hem Class-I ve II genlerine yüksek düzeyde rastlanır-

ken ES-HKH'lerde ihmal edilebilecek düzeyde ifade edildikleri görüldü. Daha önceki araştırmalarda da benzer bulgular saptanmış olup tek istisna klasik olmayan Class-I genlerden HLA-G geninin bazı preimplantasyon dokularında gösterilmesidir. *Flt-3* ile miyeloperoksidaz ve *CD14* genelrinin yarı-nicel PCR ile analizinde ES-HKH'lerin bu gen ekspresyonuna rastlanırken Kİ-HKH'lerde bu gen ifadesinin olmadığı gözlemlenmiştir.

5. Kanser/lösemilerde Gözlenen Hematopoietik Kök Hücre Fenotip/genotipi

Klonal olmakla birlikte primer tümörlerin çoğunun belirgin oranda heterojen hücrelerden oluştuğu bilinmektedir. Tek hücre klonundan kaynaklanan tümörlerin nasıl olup ta çok sayıda farklı hücre oluşturabildiği tartışmalı bir konudur. Benzer bir durum kök hücreler için de geçerlidir. Normal kök hücreler üç ana özelliğe sahiptir: kendini yenileyebilme, çoğalma ve farklılaşma. Böylece çok az sayıdaki kök hücre çok sayıda olgun hücreye dönüşebilme potansiyeli taşımak-

tadır. Son yıllarda ortaya çıkan sonuçlar kanser patogenezinde kök hücrelerin rolünü kanıtlamaktadır. Böylece kanser kök hücre kavramı ortaya çıkmaktadır. Bu konuda üzerinde en çok çalışılan lösemik kök hücrelerdir(LKH). Bir olasılık mutasyonun HKH'yi hedef alarak LKH ye dönüşüme yol açmasıdır. Diğer olasılık ise daha farklılaşmış hücrelerde ortaya çıkan mutasyonların bu hücrelere kök hücre nitelikleri kazandırmasıdır. Patogenez ne olursa olsun LKH nin saptanması kanser tedavisi için yeni bir hedefi oluşturacaktır.

Bu konuda en çok araştırılan AML örneğinde Bonnet ve ark CD34+/CD38- hücreleri ve kendilerini yenileme özelliklerini göstermiştir. Hatta önemli bir özellik olarak bu hücreler genellikle istirahatte buldukları için kemoterapi etkisinden kolaylıkla kurtulmaktadır. Bu hücrelerin oranına yaşlı olgularda daha sık rastlanmakta ve kötü prognoza yol açmaktadır. Ayrıca KML de bu LKH lerin imatinib mesilat tedavisine de dirençli olduğu gösterilmiştir.

Son zamanlarda p16 genlerden Bmi-1 hem normal hem de lösemik KH lerin kendini yenilemesi için gerekli bir gen olduğunu göstermiştir. Bu gen üzerinden ayrıca p16 ve p19Arf genleri de kullanılmaktadır. Benzer olarak normal HKH lerin kendisini yenilemede en önemli yolak olan Wnt/Catenin genleri kanserlerde de etkin genlerdir. Ayrıca JunB gen ifadesinde artış kök hücre sayısında artışa ve bir çeşit kök hücre miyeloproliferatif hastalığına yol açabilmektedir. NF-kB yoluğ birçok kanserde olduğu gibi LKH çoğalmasında rol oynamaktadır. Bu yoluğın inhibisyonu normal HKH ye etki etmezken LKH lerde apoptozise yol açmaktadır.

Benzer çalışmalar solid tümörlerde de gerçekleştirilmiş ve meme kanserinde pasajla aktarılabilen

len immatür kök hücre niteliklerine sahip tipler gösterilmiştir. Bazı medulloblastomalarda CD133+ hücrelerin varlığı ve bunların kanser kök hücresi diye tanımlanan özellikler sergilediği bildirilmiştir.

Kanser tedavisinde klasik ilaçların bu KKH veya LKH leri ortadan kaldıramadığı bir gerçektir. Bu hücrelerin tanımlanması ve yeni ilaçlar ile hedeflenmiş tedavisi beklenen gelişmelerdir.

Kaynaklar

1. RW.Georgantas, V.Tanadve, M.Malehorn, S.Heimfeld ve ark. Microarray and serial analysis of gene expression analyses identify known and novel transcripts overexpressed in hematopoietic stem cells. *Cancer Research* 2004,64:4434-4441.
2. U.Steidl, R.Kronenwett,UP Rohr, R.Fenk ve ark. Gene expression profiling identifies significant differences between the molecular phenotypes of bone marrow derived and circulating human CD34+ hematopoietic stem cells. *Blood* 2002, 99: 2037-2044.
3. W.Wagner, A.Ansorge, U.Wrkner, U.Wirkstein ve ark.Molecular evidence for stem cell function of the slow dividing fraction among human hematopoietic progenitor cells by genome-wide analysis. *Blood* 2004,104:675-682.
4. Shi-Jiang Lu, Fei Li, L.Vida, G.R.Honig. CD34+CD38- hematopoietic precursors derived from human embryonic stem cells exhibit an embryonic gene expression pattern. *Blood* 2004,103: 4134-4141.
5. M.Ramallo-Santos, S.Yoon, Y.Matsuzak, ve ark. Stemness:transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells. *Science* 2002,298:597-600.
6. TA.Venezia, AA.Merchant, CA Ramos, NL Whitehouse ve ark.Molecular signatures of proliferation and quiescence hematopoietic stem cells.*PloS Biology* 2004,2(10):1-12.
7. C.Jordan.Cancer stem cell biology: from leukemia to solid tumors. *Current opin cell biol* 2004,16:708-712.