

# HEMATOPOETİK KÖK HÜCRENİN MOLEKÜLER BİYOLOJİSİ

Ali Uğur Ural

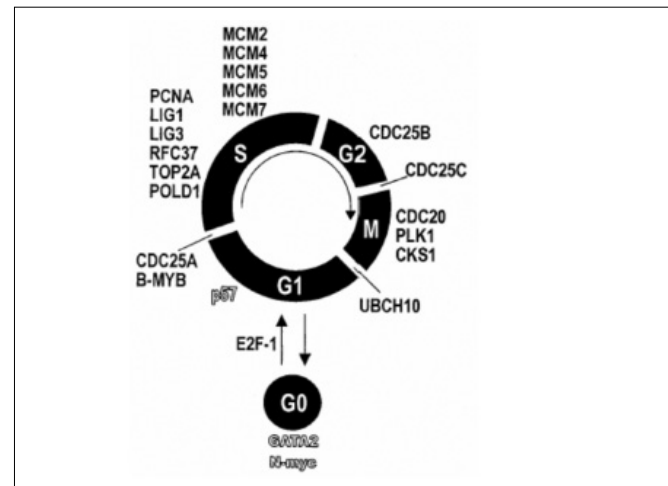
Gülhane Askeri Tıp Akademisi Hematoloji Bilim Dalı, Ankara

**K**emik iliğinde, umbilikal kord kanında bulunan ve *in vivo* engraft olma özelliğine sahip hematopoetik kök hücreler (HKH) ve büyüme faktörleriyle mobilize edilmiş periferik kan (PK) kök- progenitör hücreler progressif olarak daha olgunlaşmış hematopoetik progenitör hücreleri (HPH) oluştururlar. Tüm bunlar da daha olgun kan ve immün hücrelerini ve endotel hücrelerini oluştururlar. İnsanlarda, HKH ve HPH'lerin çoğu CD34 fosfoglikoprotein protein ve mRNA'yı taşırlar. *In vivo* engraft olma özelliğine sahip HKH'ler toplam CD34+ hücre popülasyonunun <<-%1'ini oluştururlar. Bu nedenle CD34+ HKH'ler, erken pluripotent HKH'ler ve çok sayıda çeşitli gelişim basamaklarında committed-HPH'ler gibi heterojen bir hücre grubundan oluşurlar. Toplam CD34+ hücre popülasyonu ile karşılaştırıldığında bu *in vivo* engraft olma özelliğine sahip HKH'ler içinde, **CD34+/CD38-/Lin-** hücreler oldukça zengindir. HPH subpopülasyonu içerisinde rodamin veya Hoecscht boyalarını dışarı pompalama ve CD133 taşıma gibi diğer daha özel markerlar da bulunur. Hematopoiesis, pluripotent CD34+ HKH'lerin kendi kendilerini yenileme, diferansiyasyon ve migrasyonunun dengelenmesi ile karakterizedir. Hematopoiesis esnasında, periferik kanda az miktarda CD34+ hücrelerin bulunması, HKH'lerin kemik iliği (KI) ile diğer organlar arasında sürekli bir hareketini akla getirir. Kemoterapiden sonra kemik iliğinin tekrar yapılanması ve büyüme faktörlerinin uygulanması CD34+ hücrelerin periferik kan içerisine mobilizasyonunu kolaylaştırır. Kemik iliği ve mobilizasyondan sonra periferik kanda bulunan CD34+ hücrelerde transkripsiyon faktörlerinin tanımlanması, CD34+ hücrelerin kendi kendilerini yenileme, diferansiyasyon, mobilizasyon ve migrasyon özelliklerini de ortaya çıkarır.

KI-CD34+ hücrelerinde PK-CD34+ hücrelerinden daha yüksek seviyede ve 9 hücre siklusu geni ile 11 DNA sentez geninin bulunması, KI-CD34+ hücrelerinin daha fazla siklusa girme aktivitesini göstermektedir (Şekil 1). Örneğin, **CDC25A**, siklin E-CDK2'yi aktive ederek G1-S geçişi için gereklidir. **B-MYB** S-fazı girişi için gerekli olan bir transkripsiyon faktörüdür. **Serintreonin kinaz PLK**, geç G2 fazı ve M fazı esnasında önemli rol oynar. **CDC20** M fazı ilerlemesinde etkilidir. Ubiquitin-pro-

tein ligaz (**UBCH10**), M fazı çıkışında gereklidir. DNA sentez ve replikasyonunda gerekli olan genlerin ekspresyonu, böylece hücre siklusunun S fazında da gereklidir ve KI-CD34+ hücrelerinde yüksek olarak bulunmuştur. **Ligaz 1**, prolifere olan hücrenin nükleer antijeni ile etkileşerek DNA replikasyonuna aracılık eder ve KI-CD34+ hücrelerinde daha yüksek bulunmuştur. Minikromozom idame proteinleri (**MCM**) DNA replikasyonunda rol almaktadırlar. MCM genlerinin aktivasyonunu sağlayarak hücre siklusunun progresyonuna katkıda bulunan **E2F-1** de KI-CD34+ hücrelerde yüksek oranda eksprese olur. Böylece, E2F-1 transkripsiyon faktörünün artması, HKH ve HPH'lerin proliferasyonunu başlatan bir tetik olabilir. Hücre siklusu inhibitörü **p57**, KI-CD34+ hücrelerde düşük ekspresyonda bulunmuştur. Bu bilgilere göre, KI-CD34+ hücrelerinin daha hızlı siklusa girdiği, oysa PK-CD34+ hücrelerin G0 fazında durdukları düşünülebilir.

Proapoptotik genlerden **kaspas 3, 4 ve 8**, PK-CD34+ hücrelerde yüksek oranda eksprese olurken, antiapoptotik **sitoplazmik antiproteinaz 2** daha düşük oranda eksprese olur. Bu da, PK-CD34+ hücrelerin KI-CD34+ hücrelerle kıyaslandığında daha fazla apoptotik aktiviteleri olduğunu göstermektedir.



Şekil 1. HKH'de hücre siklusu ile alakalı olarak eksprese olan genler.

Ekspresyonu artan genler koyu, azalanlar ise içi boş olarak gösterilmiştir (3. kaynaktan alınmıştır)

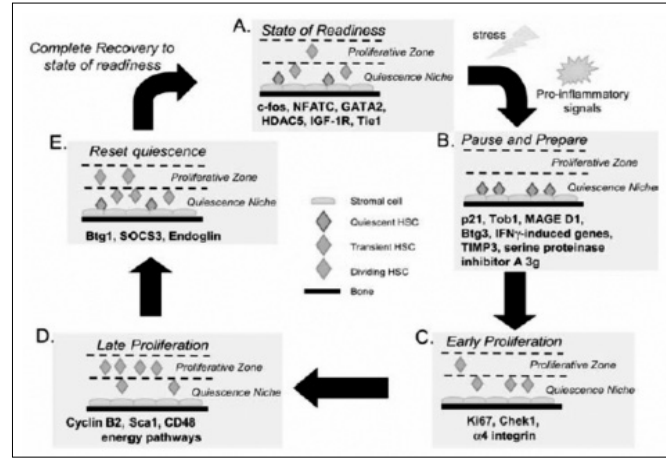
Transkripsiyonla alakalı genlerden **GATA2** ve **N-myc**, PK-CD34+ hücrelerde daha fazla eksprese olmaktadır. GATA2, diferansiyasyonu bloke edip kendi-kendine yenilenmeye zemin hazırlayan ve erken hematopoesiste rol oynayan önemli transkripsiyon faktörüdür. N-myc ekspresyonu da hücreleri belirli bir dönemde tutar, down-regüle olması hücreyi diferansiyasyona götürür. Bu iki faktörün PK-CD34+ hücrelerde ekspresyonunun fazla olması, bu hücrelerde gelişim basamağına bakmaksızın diferansiyasyon bloğunu göstermektedir.

CXC kemokin reseptör 4 (**CXCR4**), KI-CD34+ hücrelerde daha yüksek oranda bulunmuştur. CXCR4'ün ligandı olan stromal hücreden türeyen faktör 1 (**SDF1**), KI stroma hücrelerinde eksprese edilir. CXCR4 ve SDF1 etkileşimi KI'de hematopoetik progenitorların adezyon ve diferansiyasyonunda önemlidir. Adezyondan sorumlu olan **CD44**, PK-CD34+ hücrelerde 2-kat daha yüksek oranda eksprese olmaktadır.

Trombin reseptörü **PAR1**, **IL-1β**, PK-CD34+ hücrelerde daha yüksek oranda bulunur, bu reseptör monosit kemotaksisi ve fagositoziste önemli rol oynar.

HKH'ler içerisinde **CD34+/CD38-/Lin-** hücre grubu, *in vivo* engraft olma özelliğine sahipken, **CD34+/[CD38/Lin]++** hücreler ise, *in vivo* engraft olan grupta bulunmazlar ancak, daha sonraki HPH'lerde bol bulunurlar. CD34+/CD38-/Lin- hücrelerde hematopoesisten sorumlu **KIT**, **FLT3**, **GATA2**, **GATA3**, **p57**, **HoxA5** ve **HoxA9** yanında bu hücrelerin belirteçlerinden olan **CD34** ve **MDR2** genleri de bulunur. Bunun yanında, HKH'lerde açık kromatin yapısı vardır, çünkü bu hücreler normalde hematopoetik olmayan hücre tiplerinde eksprese olan birçok geni zayıf da olsa eksprese ederler. Bu da HKH'lerin multipotent ve muhtemelen trans-diferansiyasyon kapasitesini açıklayabilir. HKH'lerde bulunan hematopoetik olmayan genlerden; nöronlarla birlikte olanlar **ANA/BTG3**, **GIF/TIEG** ve **SMN1**; endotelle birlikte olanlar **ANG-1** ve **PROCR/EPCR**; karaciğerle birlikte olanlar **CYP2-C38**, **CPT1** ve **aldo-keto redüktaz**; kasla birlikte olanlar **MEF2** ve **NRAP** bulunmuştur. KI ve PK-CD34+ hücrelerden daha primitif hücreleri bulundurduğu farz edilen kordon kanı-CD34+ hücreler daha fazla gen eksprese ederler.

Farelerde uzun-sürelili grup oluşturabilen kök hücreler (**LT-HKH**), kök hücre havuzu eksilmeksizin diferansiyasyon kapasitesine sahiptirler, böylece bir kök hücre kavramını karşılayabilirler; kendi kendilerini yenileyebilme ve daha uygun hücre tiplerine farklılaşabilme. LT-HKH, kemik iliğinde bulunur ve aslında altı gelişim seçenekleri vardır: dinlenmede kalma, diferansiyasyon olma, kendi kendini yenileme, hareket etme, yaşlanma veya apoptoza uğrama. HKH'nin bu akıbeti, HKH'nin intrinsik mekanizmaları veya KI mikroçevresi tarafından belirlenir. Hematopoesiste sadece LT-HKH'ler ömür boyunca kendi kendini yenileyebilme kapasitesine sahiptir.



Şekil 2. HKH'nin aktivasyonuna göre eksprese olan genler (2. kaynaktan alınmıştır)

ler ve KI naklinde işlem gören gruptur. HKH grubunda kendi kendini yenileyebilme işleminden sorumlu faktörler; **HoxB4**, **Bmi1**, **Wnt/β-katenin** sinyal yolağı ve **Notch**. Erişkin fare kemik iliğinde **lineage-/c-kit+/Sca1+** (KLS) fraksiyonunda izole edilen hücrelerden LT-HKH (Thy1.1<sup>lo</sup>/Flk2- KLS olarak bilindir), kısa süreli **ST-HKH** (Thy1.1<sup>lo</sup>/Flk2<sup>+</sup> KLS) ve multipotent progenitorlar (**MPP**) (Thy1.1-/Flk2<sup>+</sup> KLS) vardır. Her üç grubun da benzer multilineage özellikleri vardır, kendi kendilerini yenileme ve proliferatif kapasitelerine göre ayrılırlar. LT-HKH'ler host'un ömür boyu hematopoezini sağlamadan sorumludur. LT-HKH önce ST-HKH'ye ve sonra MPP'lara diferansiyasyonla kendi kendilerini yenileme kapasiteleri progressif olarak azalır, proliferatif aktiviteleri ise artar.

Adezyon moleküllerinden hücre-hücre etkileşiminde rol oynayan **VCAM1** ve HKH'nin KI'ne homing'inden sorumlu **ESAM1**, LT-HKH'lerde ekspresyonu fazladır. LT-HKH'lerde adezyon moleküllerinin fazla olmasının aksine, MPP hücreleri **IL10ra**, **IL1r1**, **IL17r**, **Mpeg1**, **Blnk**, **Notch1**, **Ccr5** ve **Igh6** gibi immün cevap ve komokin aktivasyonundan sorumlu reseptörleri bulundurmaz.

LT-HKH'nin dinlenmede kalması, bu hücreleri DNA hasarına yol açabilecek toksik metabolitler ve serbest oksijen radikallerinden korur. Dinlenmeye ilave olarak **p53**, **Ches1**, **Sesn1**, **katalaz** ve **Abcg2** gibi hücre koruyucu transkripsiyon faktörlerinin LT-HKH'lerde ekspresyonunun artması bu hücrelerin bütünlüğünün sağlanmasında önemlidir. Abcg2 ve diğer ATP-bağlayan kaset transporterleri kanser hücrelerinin çoklu ilaç direnci ile birlikte bulunmuştur.

Henüz aktive olmamış HKH'lerin çoğu KI mikroçevresinde dinlenme halinde bulunurlar ve metabolizma ve yaşlılıkla alakalı **IGF-1R** ve **Tie1** gibi genleri eksprese ederler. Bu reseptörler de hücrenin birçok mitojenik stimulusa cevap vermesini sağlar (Şekil 2A). Ayrıca **c-fos** ve **GATA-2** gibi HKH'lerin hızlıca aktivasyonunu sağlayabilen transkripsiyon faktörlerini de içerir.



Aktivasyondan hemen sonra (mesela 5FU gibi) hücreler bir superdinlenme aralığına girerler, buna **Tob1**, **p21**, **Btg3** gibi antiproliferatif genler aracılık ederler (Şekil 2B). Bu noktada en az altı tane IF-γ'nın indüklediği genlerin regülasyonunun artması, HKH'lerin proinflamatuvar sinyallere cevabını akla getirir.

Üçüncü günde başlayan proliferasyonun erken fazında, HKH'ler hücre bölünmesine şartlanırlar, bu durumda DNA replikasyon ve tamirden sorumlu maksimal genlerin ekspresyonu gözlenir (Şekil 2C). Altıncı günde proliferasyonun geç fazında enerji üretiminde sorumlu olan genlerin ekspresyonlarının artması HKH'de metabolik aktivitede bir artış olduğunu gösterir (Şekil 2D). Üçüncü günde **α4-integrinin** up-regülasyonunu, altıncı günde dramatik bir azalma takip eder. α4-integrinin bloke edilmesi veya down-regülasyonu mobilizasyonu artırır. **c-Kit** down-regülasyonu da HKH mobilizasyonu ile birlikte bulunmuştur.

Dinlenmenin tekrar sağlanabilmesi için, siklusda bulunan hücre sayısı azalır ve HKH'ler **Btg1** gibi özel antiproliferatif genleri ve **JAK/STAT** sinyal ileti yolağının birçok komponentini içermeye başlar (Şekil 2E). **SOCS3** ve **STAT3**'ün çeşitli hematopoetik hücre tiplerinde proliferasyonun ve diferansiyasyonun negatif ve pozitif regülasyonunda sorumlu olduğu gösterilmiştir.

#### KAYNAKLAR

1. Forsberg EC, Prohaska SS, Katzman S, Heffner GC, Stuart JM, Weissman IL. Differential expression of novel potential regulators in hematopoietic stem cells. *PLoS Genet.* 2005;1:281-294
2. Venezia TA, Merchant AA, Ramos CA, Whitehouse NL, Young AS, Shaw CA, Goodell MA. Molecular signatures of proliferation and quiescence in hematopoietic stem cells. *PLoS Biol.* 2004;2:1640-1651
3. Steidl U, Kronenwett R, Rohr UP, Fenk R, Kliszewski S, Maercker C, Neubert P, Aivado M, Koch J, Modlich O, Bojar H, Gattermann N, Haas R. Gene expression profiling identifies significant differences between the molecular phenotypes of bone marrow-derived and circulating human CD34+ hematopoietic stem cells. *Blood.* 2002;99:2037-44
4. Georgantas RW 3rd, Tanadve V, Malehorn M, Heimfeld S, Chen C, Carr L, Martinez-Murillo F, Riggins G, Kowalski J, Civin CI. Microarray and serial analysis of gene expression analyses identify known and novel transcripts overexpressed in hematopoietic stem cells. *Cancer Res.* 2004;64:4434-41.
5. Bonde J, Hess DA, Nolte JA. Recent advances in hematopoietic stem cell biology. *Curr Opin Hematol.* 2004;11:392-8.
6. Majka M, Kucia M, Ratajczak MZ. Stem cell biology - a never ending quest for understanding. *Acta Biochim Pol.* 2005;52: 353-8.
7. French SW, Hoyer KK, Shen RR, Teitell MA. Transdifferentiation and nuclear reprogramming in hematopoietic development and neoplasia. *Immunol Rev.* 2002;187:22-39

