

DERLEME

İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücrelerin Elde Edilmesi ve Rejeneratif Tıpta Uygulanabilirliği

Nevra Pelin CESUR, Nelisa TÜRKÖĞLU LAÇIN

Yıldız Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, İstanbul.

ÖZET

2006 yılında Takahashi ve Yamanaka dört transkripsiyon faktörünün (Oct4, Sox2, Klf4 ve c-Myc) fibroblast hücrelerine aktarılması ve bu transkripsiyon faktörlerinin ifadesinin pluripotent kök hücre elde etmek için yeterli olduğunu bildirmiş ve somatik hücrelerin geriye programlanarak elde edilen bu hücreler indüklenmiş pluripotent kök hücreler (İPKH) olarak adlandırılmıştır. Daha sonraki yıllarda transkripsiyon faktörleri ve yeniden programlama şartlarının optimizasyonu ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Bugüne kadar farklı somatik hücrelere transkripsiyon faktörlerinin farklı metotları ile tanıtımı ya da transkripsiyon faktörlerinin farklı kombinasyonlarının kullanımının etkisi araştırma konusu olmuştur. Somatik hücrelerin yeniden programlanması amacı ile birçok farklı vektör sistemi bulunmaktadır. Bu vektör çeşitlerinin İPKH eldesi için verimlilikleri birbirlerinden farklılık göstermektedir. Bu derlemede, kök hücrelerin genel özellikleri ve uygulama alanlarının irdelenmesinin yanı sıra ağırlıklı olarak indüklenmiş pluripotent kök hücrelerinin elde edilmesi üzerinde durulmuştur. Ayrıca İPKH'lerin klinik amaçlı kullanım potansiyellerine de değinilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Kök hücreler. Kök hücre çeşitleri. Rejeneratif tıp. İndüklenmiş pluripotent kök hücreler. İndüklenmiş kök hücre eldesi.

Generation of Induced Pluripotent Stem Cells and Applications in Regenerative Medicine

ABSTRACT

In 2006, Takahashi and Yamanaka reported that the transfer and expression of four transcription factors (Oct4, Sox2, Klf4, and c-Myc) into fibroblast cells were sufficient to obtain cells similar to embryonic stem cells. The cells obtained by reprogramming of somatic cells are called induced pluripotent stem cells (iPSC). In the following years, various studies were carried out for the optimization of transcription factors and reprogramming conditions. Until now, the introduction of transcription factors to different somatic cells or stem cells by various methods or the effect of using different combinations of transcription factors has been the subject of research. There are many different vector systems to reprogramme somatic cells. The efficiencies of the vector types for obtaining iPSC differ from each other. In this review, the general properties of stem cells and their application areas are discussed, as well as the acquisition of induced pluripotent stem cells and their potential for clinical use.

Key Words: Stem cells. Stem cell types. Induced pluripotent stem cells. Regenerative medicine. Generation of induced pluripotent stem cell.

Geliş Tarihi: 28.Eylül.2020

Kabul Tarihi: 18.Ocak.2021

Dr. Nelisa TÜRKÖĞLU LAÇIN
Yıldız Teknik Üniversitesi,
Fen-Edebiyat Fakültesi,
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı,
İstanbul.
Tel: 0532 225 73 68
E-posta: nelisalacin@gmail.com

Yazarların ORCID ID Bilgisi:

Nelisa TÜRKÖĞLU LAÇIN: 0000-0003-3176-0902
Nevra Pelin CESUR: 0000-0003-3979-6053

İnsanoğlu tarih boyunca yaşlanma karşıtı tedavileri geliştirmek, hastalıkların üstesinden gelebilmek, insan ömrünü uzatabilmek için büyük çabalar sarf etmiştir. Günümüzde bu amaç doğrultusunda da genetik mühendisliği, doku mühendisliği ve moleküler biyoloji tekniklerinden yararlanılmaktadır. Son yıllarda oldukça popüler olan kök hücrelerin kullanımı ile tedavi yöntemleri önemli bir yer kazanmıştır^{1,2}. Bunlara ek olarak, bilim adamları laboratuvarında kök hücreleri; yeni ilaçları taramak, gelişimsel büyümeyi incelemek, doğum kusurlarının nedenlerini belirlemek ve model sistemler geliştirmek için kullanılmaktadırlar. Diğer bir yandan kök hücre çalışmalarının kullanımı sayesinde insan vücudunun birçok yenilenme ve onarım mekanizması çözümlenmiş ve aynı zaman da temel toksikoloji ve hatta kanser çalışmaları için in vitro insan hastalık modellerinin oluşturulabileceği gösterilmiştir^{3,4}. Dahası bu tür çalışmalar organ nakli ve terapötik

amaçlı gen terapisi gibi tedavi yaklaşımlarına yeni pencerelerin açılmasına olanak sağlamıştır⁵. Ayrıca Parkinson hastalığı, omurilik yaralanması ya da işitme kaybı gibi tedavi edilmesi zor hastalıklar için kök hücrelerin kullanımı önemli çalışma alanlarıdır^{6,7}.

Kök hücreler, erken embriyonik dönem ve büyüme sırasında vücutta birçok farklı hücre tipine gelişme potansiyeli olan özel hücrelerdir. Tüm kök hücrelerin üç temel özelliğinden bahsedebiliriz: Uzun süreli bölünebilme yeteneği, özelleşmemiş hücreler olması ve özelleşmiş hücre tiplerine dönüşebilmeleridir⁸. Ayrıca birçok dokuda ve yüksek organizasyonlu canlılarda organların fonksiyonel özelliklerinin devamlılığı için önemli role sahiptirler⁹. Bunlara ek olarak kök hücreler farklılaşma potansiyellerine göre sınıflandırılabilirler. Bunlardan ilki olan totipotent kök hücreler vücut içindeki tüm hücre tiplerini oluşturabilen kök hücrelerdir¹⁰. Oosit ve spermin döllenip zigot oluştuktan sonra gelişimin dördüncü gününe kadar olan hücrelerin her biri için bu tür hücre farklılaşma potansiyelinden bahsedilebilir. İnsan embriyosunda, sadece 8 hücreli evreye kadar döllenmiş embriyolar totipotent hücreler olarak kabul edilir^{11,12}. Totipotent kök hücreler plasenta ve embriyoyu oluşturma kabiliyetine sahip olan hücrelerdir. Pluripotent kök hücreler tek başlarına bir organizmayı oluşturamazlar ve plasentayı oluşturma kabiliyetine de sahip değildirler. Ancak vücutta 200 farklı hücre tipine farklılaşma potansiyeline sahiptirler¹⁰. Bu farklılaşma mezodermal, ektodermal ve endodermal kökenli olmak üzere vücuttaki neredeyse tüm özelleşmiş hücre tiplerini kapsamaktadır. Ancak trofoblast oluşturamazlar. Ayrıca ön implantasyonun blastosist aşamasındaki iç hücre kitlesinden türetilen embriyonik kök hücreler in vitro koşullarda çoğaltılabilir ve elde edilen bu hücreler pluripotent özelliğini koruyabilmektedir¹². Multipotent kök hücreler ise yalnızca sınırlı hücre tipine farklılaşabilirler. Örneğin hematopoetik kök hücreler lenfosit ve miyeloid seri hücrelerini oluşturabilirler. Daha sonra bu hücre serileri de makrofajlara, lenfositlere, eritrositlere ve mast hücrelerine özelleşebilmektedirler¹³. Diğer bir kök hücre tipi ise tek bir hücre tipine dönüşebilen öncül hücreler olarak da adlandırılan unipotent kök hücreleridir. Spermatogonial kök hücreler bu grup için verilebilecek en yaygın ve bilinen örnektir¹⁰. Kök hücreler asimetric bölünme ile bölündüğünde oluşan yeni hücrelerden birisi kök hücre yeteneğini oluşturma ve diğeri özel bir işlevi olan başka bir hücre tipine özelleşecek olan progenitor hücreyi oluşturmaktadır¹⁴. Çünkü kök hücreler simetric bölünmenin yanın da genellikle simetric olmayan bölünme sergilemektedir. Bu iki bölünme çeşidinin dengeli olması canlıdaki homeostaz için önemlidir¹⁵. Son yıllarda yapılan çalışmalar ile canlıda rejenerasyonun fazla olduğu deri ve bağırsak epiteli gibi birçok dokudan kök hücreler elde edilmiştir. Bunlara ek olarak insan yağ dokusundan izole edilen kök hücreler için araştırmalar devam etmektedir ve bu dokuların diğeri kök hücre kaynaklarına kıyasla daha fazla kök hücre bulundurduğu bilim insanları tarafından keşfedilmiştir¹⁶.

Bilim insanlarının bu zamana kadar yaptığı çalışmalarda genellikle fare ve insan hücrelerinden alınan kök hücreler üzerinde araştırmalar yürütülmektedir ve kök hücreleri farklılaşma potansiyellerinden farklı özelliklerine göre de sınıflandırmaktadırlar. Embriyonik veya embriyonik olmayan ya da somatik veya olgun hücreler olarak sınıflandırılmaktadır¹⁷. Embriyonik olmayan kök hücreler; hematopoetik kök hücreler, stromal (mezenkimal) kök hücreler ve organlarda yerleşik diğeri erişkin kök hücreler olmak üzere üç ana başlık altında incelenebilir¹². Özellikle Yamanaka ve ark. bazı özel yetişkin hücrelerin kök hücre benzeri bir durum alabilmeleri için genetik olarak "yeniden programlanmasına" izin verecek koşulları belirleyerek yeni bir dönüm noktası başlattılar. Bu yeni kök hücre tipi *indüklenmiş pluripotent kök hücreler* olarak adlandırılmıştır¹⁸. Bu hücreler kendini yenileyebilme ve vücudun hemen hemen tüm hücrelerine özelleşebilme yeteneğine sahiptir.

Embriyonik Kök Hücreler

Embriyonik kök hücreler özellikle uterus duvarına implantasyon öncesi gelişim aşamasında blastosistin iç hücre kitlesinden izole edilen pluripotent yapı kök hücrelerdir¹⁹. Elde edilen embriyonik kök hücrelerin in-vitro ortamdaki kolonizasyonu şekil 1'de ana hatlarıyla gösterilmiştir;

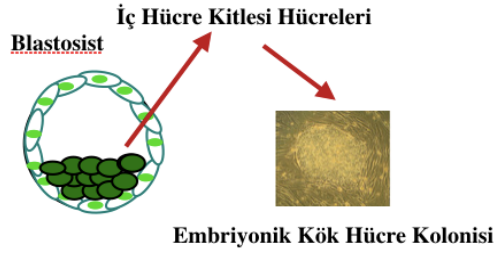


Şekil 1.

Embriyonik gelişimde totipotent ve pluripotent kök hücre kolonizasyonu

İnsanlarda ilk farklılaşma olayı, embriyonik gelişim yaklaşık beş günlük evresinde bir dış hücre katmanının ileride plasentayı oluşturmak üzere iç hücre kitlesinden (İHK) ayrılması ile meydana gelir¹⁹. Eğer İHK normal embriyonik mikro-çevresinden çıkarılırsa ve uygun koşullar altında kültüre edilirse İHK'den türetilen hücreler süresiz olarak çoğalmaya devam edebilirler ve aynı zamanda vücudun herhangi bir hücre tipini oluşturmak için gerekli gelişim potansiyelini devam ettirebilirler. Bu hücrelerin mükemmel bir pluripotent kapasiteye sahip oldukları söylenebilir^{20,21}. Şekil 2'de İHK'deki embriyonik kök hücre kolonileri gösterilmiştir.

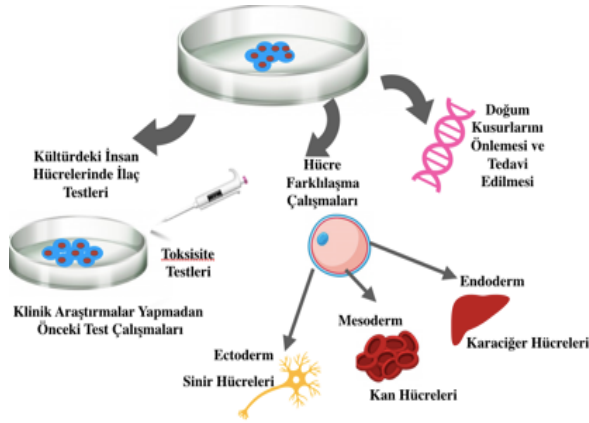
İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreleri



Şekil 2.

Blastosist evresinde embriyonik kök hücreler

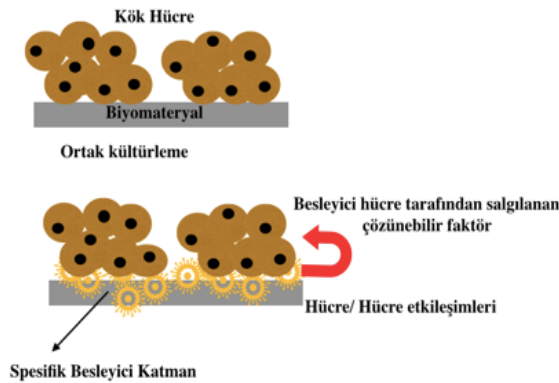
Özellikle insan embriyonik kök hücre elde edilmesi amacı ile döllenmenin bir kültür kabında (petri) gerçekleşmesinin sağlanması için oositlerin ve spermelerin bir araya getirildiği bir işlem olan in vitro fertilizasyon da (İVF) incelenilmektedir²². Aslında, teorik olarak bu hücrelerin birçok alanda kullanımı şekil 3'te özetlendiği şekilde mümkündür.



Şekil 3.

Elde edilen kök hücrelerin kullanım alanları

Embriyonik kök hücrelerin kültürü için orijinal protokol de kültür kabının iç yüzeyi fare embriyonik fibroblast (FEF) hücreleri ile kaplanmaktadır²³. Bu tabaka besleyici katman olarak adlandırılır ve şekil 4'te genel hatlarıyla gösterilmektedir.



Şekil 4.

Elde edilen kök hücreler için uygun mikro çevrenin sağlanması

Bu katman, hücreler için uygun mikro çevrenin sağlanmasına yardımcı olmaktadır. Besleyici tabaka kök hücreler için gerekli olan bazı önemli molekülleri hücrelere tedarik eder ancak fare hücrelerindeki virüslerin veya diğer yabancı makro moleküllerin de insan hücrelerine bulaşması riski bu ortamda kültürü yapılan kök hücrelerin klinik amaçla kullanımını kısıtlanmaktadır²⁰. Bir embriyonik kök hücre hattını kültüre etme işlemi çok verimli bir işlem değildir. Bu nedenle her bir ön implantasyon aşamasındaki embriyodan hücreler bir kültür kabına yerleştirildiğinde hatlar üretilmez. Ancak eğer hücreler yeterli sayıya ulaşmış ve sağlıklı ise petriyi kaplayacak kadar bölünmüş ve çoğalmışsa hücreler dikkatlice pasajlanarak yeni ve taze kültür kaplarına ekilir. Hücrelerin yeniden kaplanması veya alt kültürlenmesi işlemi birçok kez ve aylarca tekrarlanır. Hücreleri alt kültürlemenin her bir döngüsü pasaj olarak adlandırılır. Hücre kültüründe farklılaşmadan altı veya daha fazla ay boyunca çoğalan bu kök hücreler pluripotent özellik gösterir ve embriyonik kök hücre hattı olarak adlandırılır. İşlemin herhangi bir aşamasında hücreler dondurulabilir¹². İstenilen embriyonik kök hücreler elde edildikten sonra birçok farklı özelleşmiş hücreye farklılaşmaları için manipüle edilebilir. Ayrıca kültürleme sırasında bazı dış faktörlerin kullanılması hücrelerin daha kolay çoğaltılmasını sağlayabilir. Lösemi İnhibitör Faktörü (LIF) bu faktörlerden en önemlilerindedir ve interlekin (IL)-6 tipi sitokin ailesine aittir. Özellikle fare kök hücreleri çalışmalarında kullanılmaktadır²⁴. Bu dış faktör STAT3 proteininin aktivasyonuna neden olmasına rağmen fare kök hücrelerinin nöral hücrelere farklılaşmasını önlemek için yetersizdir. Bu yüzden de kemik morfojenetik proteinlerinin (BMP) ve LIF kombinasyonunun embriyonik kök hücrelerin kendini yenilemesini desteklemek için gerekli olduğu bildirilmiştir²⁵. Bu çalışmalar sırasında bilim insanları insan embriyonik kök hücreleri için büyüme faktörlerini de incelemeye başlamıştır. bFGF (özellikle FGF-2) çoğunlukla fibroblast varlığında insan embriyonik kök hücrelerinin çoğalması ve insan kök hücrelerinin klonal büyümesinin sağlanması için kullanılmaktadır. İn vitro kültür ortamında insan embriyonik kök hücreleri gibi kök hücreler FGF2 ve aktivitin desteğine ihtiyaç duyarlar. Bu sayede teratom oluşumu ve pluripotent özellik gösterirler¹⁰. FGF ailesinde yer alan ligandlar tirozin kinaz aktivitesine sahip dört farklı reseptör üzerinde etkilerini göstererek MAPK, ERK1/2, PI-3K/Akt gibi hücre içi sinyal moleküllerinin aktivitesini sağlar. Pluripotent kabiliyetin devamlılığı FGF reseptörleri ile ligandlarının ifadesi ile gösterilmiştir. Bunun yanında aktivinA'nın da insan embriyonik kök hücrelerinde FGF-2 ekspresyonunun indüklediği gösterilmiştir²⁶. Bu tip in vitro koşullarda kök hücre kültürü sırasında embriyonik kök hücreler pluripotent ve özelleşmemiş hücre özelliklerinin göstergeleri olan CD9, CD24, Oct-4, alkalın fosfat, LIN28, Thy-1, SSEA-3 ve SSEA-4'ü ifade eder²⁷.

Yetişkin Kök Hücreler

Bir doku veya organdaki özelleşmiş hücreler arasında bulunan özelleşmemiş olan hücreler yetişkin kök hücreler olarak adlandırılmaktadır. Aynı zamanda somatik kök hücre olarak da adlandırılırlar. Başlıca rolleri buldukları dokuyu korumak ve onarmaktır. Yetişkin kök hücrelerin en iyi örneği kan hücrelerini oluşturan kemik iliği hücreleri olan hematopoietik kök hücrelerdir². Özellikle yetişkin kök hücrelerin farklılaşması laboratuvarında kontrol edilebilirse bu hücreler transplantasyon tedavilerinin en önemli oyuncularından biri haline gelecektir. Günümüzde bazı bilim adamları yetişkin kök hücrelerin sadece kemik iliğinde değil aynı zamanda beyinde ve hatta kalp gibi komplike organlarda da bulabileceğini göstermektedir. Aslında bu hücrelerin varlığı ile beyinde üç özelleşmiş beyin hücresinden astrositler, oligodendrositler ve nöronları üreten kök hücrelere sahip olabilir düşüncesini ortaya çıkarmıştır²⁸. Bu nedenle bu hücrelerin yerini ve nasıl tespit edilebileceği ile ilgili çalışmalar büyük bir merak konusu haline gelmiştir. Bunun için iki ana yöntem belirlenmiştir. İlk olarak canlı bir dokudaki hücreleri bazı moleküler belirleyiciler ile etiketlemek. İkincisi ise hücreleri canlı bir organizmadan çıkarıp akabinde hücre kültüründe etiketleyerek hücrelerin tekrar birlikte çoğalıp çoğalmadığını tespit etmek için onları başka bir canlıya nakletmektir. Öte yandan yetişkin kök hücrelerin farklılaşma kapasitesini açıklamak için kullanılan terimler vardır. Transdiferansiyasyon buna en güzel örnektir. Terim bazı yetişkin kök hücre tiplerinin hücrelerin öngörülen soyundan beklenen dokular dışındaki organlarda veya dokularda görülen farklı hücre tiplerine farklılaşabileceği anlamını taşır. Örnek olarak kalp kası hücrelerinin kanı oluşturabilecek hücrelere farklılaşması verilebilir²⁹.

İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler

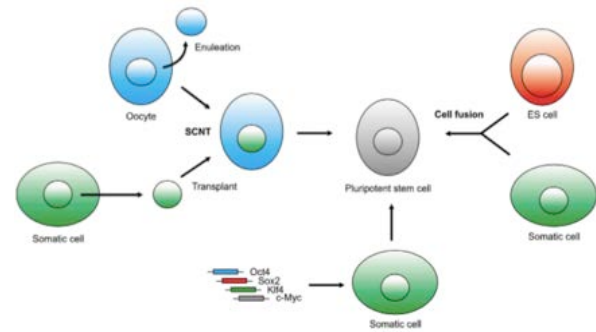
İndüklenmiş pluripotent hücreler (İPKH), somatik hücrelerden özellikle farelerde karaciğer, pankreas hücresi ve nöral progenitör hücrelerden insanda ise dermal fibroblast, periferik kan hücreleri, keratinosit, üriner epitel hücresi, karaciğer, mide epitel hücreleri, mezenkimal hücreler, B ve T hücreleri, nöral kök hücreleri, pankreas hücreleri, progenitör kan hücreleri, kordon kanı hücrelerinin genetik olarak yeniden programlanması ile elde edilmiştir³⁰. İPKH eldesinde amaç; hastalıkların tedavisinde, yeni ilaçların testinde, doku mühendisliğini çalışmalarında ve kişiselleştirilmiş tedavilerde kullanılmak için pluripotent kapasite de hücreleri elde etmektir. Özellikle embriyonik kök hücrelere alternatif olması, blastosistlerin bazı işlemlere maruz kalmasını ve insan uterusuna ihtiyacı ortadan kaldırmaktadır. Bu yöntemler hemen hemen tüm ülkelerde etik sorunlar doğurmaktadır. Bizim ülkemizde de 2006 yılında Sağlık Bakanlığı tarafından embriyonik kök hücre çalışmaları durdurulmuştur. Bu nedenle bilim adamları yeni çözümler aramaya

başlamışlardır³¹. İPKH'lerin elde edilebilmesi ve çalışılması bu anlamda büyük bir çığır açmıştır. Pluripotent kök hücre eldesi için öncelikle fare hücreleri ile 2006'da akabinde 2007'de insan somatik hücreleri bilim adamları tarafından çalışılmıştır¹⁸. Fare indüklenmiş pluripotent hücrelerindeki çalışmalar, aynı zaman da pluripotent kök hücrelerin önemli özelliklerini açığa çıkarmıştır. Bu kök hücreler kök hücre belirteçlerini içermekte, üç germ katmanında tümör oluşumu göstermekte, fare embriyosuna enjekte edildiğinde birçok farklı dokuyu oluşturabilme ve ayrıca insan indüklenmiş kök hücrelerinin karakteristik özelliklerini göstermektedirler.

İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre Eldesi

Yeniden programlama; özelleşmiş bir hücrenin çekirdeğinde sabit bir değişiklik meydana getirmeyi içeren ve daha sonra hücre mitoz yoluyla bölündükçe pluripotent kapasitesini muhafaza edip çoğaltılabilmesine imkan veren önemli bir tekniktir. Bu çekirdek değişiklikleri hücreler için pluripotent yeteneğinin yeniden kazanılmasını sağlayan ve indüklenmiş kök hücrelerinin oluşturulmasında önemli bir tekniktir. Bunun yanı sıra temel olarak üç yöntemle yeniden programlanmış hücre elde edilmektedir²⁹.

- Somatik hücre nükleer transferi (SCNT),
 - Değiştirilmiş nükleer transfer (ANT),
 - Somatik hücreleri ek hücrelerle kaynatma yöntemi.
- Şekil-5'te bu temel yaklaşımlar özetlenmektedir.



Şekil 5.

İPKH elde edilmesinde farklı yaklaşımlar¹⁰

Somatik Hücre Nükleer Transfer Yöntemi

Nükleer transfer yöntemi diploit çekirdeğin transferini belirtir veya somatik hücrenin enükle oositli bir oosit olduğunu söyleyebiliriz³². Elde edilen hücreye embriyolara büyüme kabiliyeti gösterebilen yeniden yapılandırılmış hücre denir³³. Bu transfer elektriksel bir tepki tarafından indüklenen serbest kalsiyum konsantrasyonu veya hücreler arası alanda kimyasal uyarıcı tarafından yapılan bir tür uyarıdır¹⁰. Elde edilen embriyoların ön implantasyon aşaması uygun bir kültür ortamında devam etmektedir ve geliştirilen embriyolar transfer edilebilmektedir. Bu yöntem ilk kurbağalarda denenmiştir³⁴. Hem terapötik hem de üreme amaçlı

İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreleri

kullanılacak klon üretimi için özellikle önemlidir³⁵. Terapötik klonlama, rejeneratif tıpta nükleer transferin potansiyel kullanımı anlamına gelir³⁶. Bu prosedürü gerçekleştirmenin amacı klonlanmış bir embriyodan pluripotent hücreler elde etmektir. Bu hücreler genetik olarak donör organizma ile eşittir. Bu nedenle terapilerde, hastalık ya da ilaç araştırmalarında uygulanabilen hastaya özgü pluripotent hücreler yaratma kabiliyeti sağlarlar.

Hücre Füzyonuna Bağlı Yeniden Programlama

Somatik hücreler; embriyonik kök hücreler, embriyonik germ ve embriyonal karsinoma gibi pluripotent kök hücreler ile birleştikten sonra bir pluripotent durumu elde edebilmektedir. İlginçtir ki Tada ve arkadaşları somatik hücrelerin etiketli genlerinin metilasyon modelinin embriyonik hücreler ile füzyonundan sonra değişmediğini ancak embriyonik germ hücreleri ile füzyonundan sonra değiştiğini bildirmiştir³⁷. Bu sonuçlar, embriyonik germ hücrelerinin ayrıca metilasyon değişikliği ve hücreler üzerinde asetilasyon etkinliğini içerdiğini göstermektedir. Bunlara ek olarak hibrit hücreler, bazı pluripotent özellikler göstermektedir, bunlar; dokuya özgü genlerin inaktivasyonu, pluripotent özellik ile ilişkili genlerin yeniden aktivasyonu, üçlü germ tabakasında farklılaşma yeteneği, belirli bir epigenetik profil metilasyon kalıplarıdır¹⁰.

Son zamanlarda Butan ve arkadaşları DNA metilasyon aktivitesinde rol alan hücre füzyonunda aktivasyon ile indüklenen sitidin deaminaz'ın (AID) yeniden programlama teknolojisinde kullanıldığını varsaydılar¹⁸. İnsan fibroblastlarının OCT4 ve NANOG promotör bölgesinin fare embriyonik kök hücrelerinin füzyonundan sonra replikasyon ve hücre bölünmesi olmadan demetilasyon gösterdiğini, AID'nin aktif bir DNA demetilaz olarak işlev görebileceğini gösterdiler. Ancak AID rolünün tam anlamıyla açıklanamadığı söylenebilir³⁸. Daha önce de belirtildiği gibi füzyon hibritleri pluripotent özellikler gösterir ancak hücreler pluripotent füzyon partner hücreleri ile aynı değildir. Füzyon kaynaklı yeniden programlamanın çok etkili olmasına rağmen (yaklaşık %95) sonuçta ortaya çıkan hibrit hücreler tetraploidideleri ve pluripotent füzyon ortağı hücrelerinden harici genlerin varlığından dolayı terapötik potansiyel için uygun gözükmemektedir. Bilim adamları bu eksiklik modellerinin çoğunlukla oluşturulmuş dış genlerden kaynaklandığını varsaymaktadır¹⁰.

Transkripsiyon Faktörü Transdüksiyonu

Günümüzde transdüksiyon yöntemi bilim adamları tarafından önerilen indüklenmiş pluripotent hücreleri elde etmek amacı ile kullanılan en popüler yöntemdir. Bu transdüksiyon modelleri somatik hücrelere embriyonik hücrelerdeki özellikle pluripotensiden sorumlu transkripsiyon faktörlerinin tanıtılması ile uyarılmış pluripotent hücrelerin oluşturulmasını kapsar. Bu

transkripsiyon faktörleri 2006'da Takahashi ve Yamanaka tarafından çalışılmıştır. İlk olarak 24 gen tanıtılmıştır. Ancak birkaç yıl sonra, dördünün (Oct-4, Sox-2, Klf ve c-Myc) esas olarak indüklenmiş pluripotent hücrelerinin oluşumu için yeterli olduğunu ileri sürülmüştür^{39,40}. Oct3/4 veya diğer bir ismiyle Pou5f1 döllenen yumurtada ilk olarak belirlenen genlerdir^{41,42,43}. Blastosistlerin oluşumu için çok önemlidir. Ayrıca bu transkripsiyon faktörünün eksprese edilen oranı hücrenin kaderinde önemli rol oynamaktadır. Oct3/4 ekspresyon oranına göre hücre ya pluripotent seviyede kalır ya da ilkel endoderm ve mezodermin oluşumu ile farklılaşmaya başlar⁴⁴. Oct3/4'ün yanı sıra indüklenmiş pluripotent hücrelerin tespiti için çok önemli olan diğer bir protein DNA'nın küçük oluklarına bağlanan Sox2'dir. Embriyonik kök hücrelerin kendini yenilemesi için gereklidir^{45,46}. Erken embriyonik dönemde germ hücreleri ve epiblastlarda eksprese edilir. Özellikle uv, radyasyon, çeşitli kimyasal ve hatta dış faktörler gibi istenmeyen bir faktör tarafından bastırılırsa blastosistlerin oluşumunda bazı eksikliklere neden olur. Ek olarak hücrelerin pluripotent kapasitesini uyarıcı Oct3/4 ekspresyonunu düzenler. Öte yandan Klf4 hücre bölünmesinden sorumludur ve ekspresyonun da herhangi bir soruna maruz kalırsa hücrelerin G1-S fazında kalmasını sağlar⁴⁷. Bundan dolayı 'G' fazı kontrol noktalarında etkilidir. Aynı zamanda embriyonik kök hücrelerin kendi kendilerini yenileyebilme özellikleri için de gereklidir. Ayrıca Klf'nin p53'ü doğrudan bastırıldığı ve p53 proteininin embriyonik kök hücre farklılaşmaları sırasında NANOG'u baskıladığı gösterilmiştir⁴⁸. Bu nedenle Klf4, NANOG ve diğer embriyonik kök hücrelerine özgü genlerin p53 represyonuyla aktivasyona da katkıda bulunduğu söylenebilir. P53 geni vücutta bir tür tümör baskılayıcı genidir ve bu nedenle Klf-4 fonksiyonu tümör oluşumunda önemli rol oynar⁴⁹. Son olarak c-Myc tümör oluşumuna neden olan bir proteindir. Özellikle farelerde teratoma oluşumunu uyarır. Genellikle Klf-4 ve c-Myc transkripsiyon faktörleri onkogen olarak bilinirler⁵⁰. Bu iki genin tümör oluşum eğilimi nedeniyle Yu ve ark. Yamanaka ve Takahashi'nin çalışmalarından bir yıl sonra Lin28 ve NANOG olan diğer iki önemli transkripsiyon faktörünü İPKH elde edilmesinde kullanılmasını önerdi⁴⁰. Ayrıca c-Myc hücrelerin kromozomal yapısının düzenlenmesi için gereklidir. Bu kök hücre biyolojisinin hücrelerin pluripotent özelliğini anlayabilme de önemli olduğunu göstermektedir. Ayrıca histon asetil-transferaz (HAT) kompleksleri ile birleşir⁵¹. Böylece Oct3/4 ve Sox2'nin kendi hedef lokasyonlarına bağlanmasına izin verir^{52,53}. Önceden bilinen dört ana transkripsiyon faktörünün (Oct4, Sox2, Klf4 ve c-Myc) retroviral transfeksiyonu fare embriyonik fibroblastlarını (MEFC'ler) embriyonik kök hücre benzeri hücrelere dönüştürebilir. Bu indüklenmiş pluripotent hücreler üç germ katmanının hepsine farklılaşabilir ve fare embriyonik kök hücreleri gibi kimeralara katkıda bulunabilir. Yeniden prog-

ramlama için transkripsiyon faktörlerinin transdüksiyonu ile ilgili endişeler bu mekanizmanın verimliliğinden kaynaklanmaktadır. Bu nedenle birçok grup G9a histon metiltransferaz, histon deasetilaz, MEK ve GSK3 sinyallenmesini inhibe eden transkripsiyon faktörlerini ve küçük kimyasal molekülleri birleştirerek İPKH'leri somatik hücrelerden türetme verimliliğini arttırmaya çalışmıştır. Bu çalışmalar temel transkripsiyonel ağır kromatin yeniden modellenmesi ve sinyal yolları ile yakından ilişkili olduğunu göstermektedir^{54,55}.

Retroviral vektörler moleküler biyoloji, genetik ve ayrıca klonlama çalışmalarında da yaygın olarak kullanılan yüksek verimlilikte çalışan viral vektörlerdir. Daha önceki çalışmalarda bir retroviral vektör olan Moloney Murin Lösemi virüsü (MMLV) ve transgenleri genellikle embriyonik kök hücrelerde susturulmuş olan 5' MMLV LTR paramotorları tarafından tetiklenmiştir. Aslında yeniden programlama faktörleri İPKH'lerine yeniden programlandıktan sonra DNA metilasyonu ile susturulmuştur. Bununla birlikte, MMLV LTR paramotoru sıklıkla kendiliğinden tekrar aktif hale getirilmiş ve daha sonra İPKH kaynaklı kimerik farelerde tümör oluşumuna neden olan İPKH'lerinin farklılaşması üzerine c-Myc ekspresyonunu tetiklemiştir⁵⁶. Bu kimerik farelerde tümör oluşumuna neden olduğu anlamına gelmektedir⁵⁷. Ayrıca viral genlerin rastgele yerleştirilmeleri konakçı genlerin aktivasyonu veya inaktivasyonu gibi temel genetik modifikasyona neden olabilmektedir. Dolayısı ile de bazı mutasyonlara ve tümör oluşumuna neden olabilmektedir¹¹. Bu nedenle bu sorunları çözmek için birçok çalışma yapılmıştır. Özellikle dışsal gen içermeyen İPKH yetişkin fare hepatositlerinden ve fare embriyonik fibroblastlarından (MEF'ler) adeno viral transfeksiyon ve plazmid transfeksiyonu ile üretilebilmesi amaçlanmıştır⁵⁸. Bu deneyler dört programlama faktörünün geçici ifadesinin somatik hücrelere pluripotent özelliği yeniden kazandırabilmek için önemlidir⁵⁹. Tablo I'de görüldüğü gibi yeniden programlama prosedürünü yürütmek için çok çeşitli taşıyıcı vektörler bulunmaktadır. Somatik hücreler ayrıca Sendai virüsü ve tek polikistronik vektörler ile yeniden programlanmıştır. Ancak kromozoma entegre olmayan vektör sistemleri tarafından yeniden programlama verimliliği retroviral vektör sistemine göre çok daha düşüktür^{60,61}.

Bu dezavantajı önlemek için birkaç grup entegrasyon bağımlı gen taşıyıcı vektörleri loxP bölgesi ile birleştirmiş ve daha sonra Cre rekombinazın geçici ekspresyonu ile konakçı genomdan çıkarılabilmektedir⁶. Tablo I'de indüklenmiş pluripotent hücrelerin yeniden programlanması için transdüksiyon stratejisine yönelik vektörler gösterilmiştir. Dışsal gen içermeyen İPKH üretmek için başka bir yaklaşım transpozitlerin ekspresyonu ile konakçı genomundan çıkarılabilecek mobil genetik materyal olan piggyBac transpozonlarını kullanmaktır⁶².

Tablo I. İPKH elde edilmesi için kullanılan vektör sistemleri ve verimlilikleri

Tür	Vektör Sistemi	Verimlilik	Yıl
Fare	Retrovirus	10 ⁻⁴	2006
Entegre olmamış vektör			
Fare	Adenovirüs	10 ⁻⁶ -10 ⁻⁴	2008
İnsan	Adenovirüs	2x10 ⁻⁶	2009
İnsan	Sendai Virüs	10 ⁻³ -10 ⁻²	2009
Fare	Plasmid	10 ⁻⁶ -2x10 ⁻⁵	2008
İnsan	Episomal Vektör	10 ⁻⁶ -2x10 ⁻⁵	2009
İnsan	Episomal Plasmid Vektör	1x10 ⁻³ -3x10 ⁻⁴	2011
İnsan	Mini dairesel vektör	5x10 ⁻³	2010
Fare	Liposomal magnetofesyon	4x10 ⁻⁴	2012
Entegrasyon sonrası delesyon			
İnsan	Retroviral transfeksiyon+ Cre Vektör	-	2012
Fare/İnsan	Piggy Back Transposon	3x10 ⁻⁴	2009
Fare/İnsan	Piggy Back Transposon	-	2009
DNA'sız Vektör Sistemi			
Fare	Füzyon Protein Transdüksiyonu	6x10 ⁻³	2009
İnsan	Füzyon Protein Transdüksiyonu	10 ⁻⁴	2009
Fare/İnsan	mRNA Transdüksiyonu	1x10 ⁻³	210
Kimyasal İndüksiyon			
Fare	Küçük Molekül Bileşenleri	2x10 ⁻³	2013

2009'da iki grup DNA'sız (protein temelli) İPKH'lerin Shen Ding ve Kim'in yöntemleri olan rekombinant proteinler kullanılarak dört yeniden programlama faktörü ile fare ve insan fibroblastlarından elde edildiğini göstermiştir⁶³. Başka bir yaklaşım ise proteinlerin somatik hücrelerden transdüksiyonunda nükleik asit kullanmadan yeniden programlama faktörlerini kodlayan sentetik mRNA'ların somatik hücrelere aktarılması ile İPKH üretilmesinin daha verimli ve güvenli bir yol olması üzerine Rossi Grubu tarafından çalışılmıştır⁶⁴. Sentetik mRNA'lar insandaki interferon aracılı doğal bağışıklık tepkisi nedeniyle sitotoksositeye neden olabilir. Dışsal gen tek iplikli RNA'nın (ssRNA) memeli hücrelerinde interferon ve NF-κB'ye bağlı yollar yoluyla antiviral savunmayı aktive ettiği bilinmektedir. Aynı zamanda bu sentetik mRNA düşük transkripsiyon etkinliği ve verilen mRNA'nın kararsızlığı gibi bazı negatif etkilere neden olabilmektedir⁶⁵. Bunlara ek olarak son zamanlarda yapılan çalışmalar ile viral olmayan vektör sistemleri kullanılarak da İPKH eldesinin mümkün olduğu gösterilmiştir. Varlı ve ark. lipid bazlı bir nano-taşıyıcı sistemi dizayn ederek ilk kez fare fibroblast hücrelerini yeniden programlanması amacı ile kullanmışlardır⁶⁶.

İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre Karakterizasyonu

Tanımlama prosedürü ayrıca karakterizasyon olarak da adlandırılabilir ve aslında İPKH'lerin pluripotent özelliğe sahip olan embriyonik kök hücreler ile benzerliğini göstermek amaçlanmaktadır. İlk belirleme yöntemi olarak elde edilen hücreler mikroskopla incelenmesidir. Embriyonik kök hücreler uzun süreli büyüme ve kendini yenileme özelliklerine sahip olmalıdır. Bu nedenle bilim adamları hücrenin sağlıklı görüldüğünü ve farklılaşmadığını görmek için kültürleri mikroskopla inceler. İndüklenmiş pluripotent hücrelerin morfolojisi mikroskop altındaki embriyonik kök hücrelerle benzerdir¹¹.

İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreleri

Mikroskop görüntülerinin incelenmesinin yanında bilim insanları genellikle NANOG, Sox2, Klf4, c-Myc, LIN28 ve Oct3/4 olan farklılaşmamış hücrelerinin sahip olduğu transkripsiyon faktörlerinin varlığını araştırabilmektedir⁶⁷. Bu yöntemde yeniden programlama ile değiştirilen hücrelerin PCR sonuçları karşılaştırılabilir⁶⁸. Diğer taraftan da farklılaşmamış hücrelerin hücre yüzey belirteçleri incelenebilmektedir. Ayrıca SCID farelerine cilt altı implantasyon uygulaması ile teratom oluşumu da takip edilmektedir. Mikroskop altında kromozom incelemesi G fazının tanımlanması için başka bir seçenek de olabilir⁶⁹. Hücreler metafaz anında durdurulur ve ışık mikroskobu altında incelendikten sonra Giemsa ile boyanır. Böylece karyotip incelenmesi yapılabilmektedir. Ayrıca DNA parmak izi olan ve DNA metilasyonunun analizi olan indüklenmiş pluripotent hücreler için genomik karakterizasyonlar da kullanılabilir. Son olarak pluripotent kapasitesi incelenebilir⁷⁰. Bu yolla kültürlerde hücrelerin kendiliğinden farklılaşması incelemek, hücrelerin üç germ tabakasını elde etmesini incelemek ve enjeksiyon prosedürü ile fare teratoma tümör oluşumunun incelenmesi gibi özellikler İPKH'lerin karakterizasyonu için kullanılan en temel metotlardır. Bu metotların birkaç tanesinin bir arada kullanımı elde edilen hücrelerin kimlik tespiti için kullanılabilir.

Pluripotent kök hücreleri elde ettiğimizi bu yöntemler ile onayladıktan sonra bu hücreler birçok farklı özelleşmiş hücre tipini elde etmek amacı ile kullanılabilirler. Şekil 6 bize kısa bir özet niteliği taşımaktadır.



Şekil 6.

Kök hücrelerden türetilen somatik hücre çeşitleri

İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücrelerin Rejenaratif Tıptaki Yeri

Bilindiği üzere İPKH'ler insan kan, keratinosit ve dermal fibroblast hücrelerinden yüksek verimlilikle elde edilebilmektedir^{71,72,73}. Ayrıca İPKH'lerin elde edilmesi ile embriyonik kök hücreler ile ilgili yaşanan kaynak sıkıntısı ve etik sorunların da önüne geçilmesi

amaçlanmaktadır. Bu kolay erişim özelliklerinden dolayı İPKH'ler özellikle hastalık modelleme, ilaç taramaları için kullanılmakta ve ayrıca gelecekte klinik tedavide olog hücre naklinin en önemli potansiyeli olarak görülmektedir. Çoğu durumda İPKH'lerin hastalıkla ilgili hücre tipine in vitro farklılaşması bildirilmiştir ve literatürde hastaya özgü İPKH'lerin belirli hastalık özellikleri sergilediğini öne süren birçok çalışma bulunmuştur. Örneğin spinal müsküler atrofi (SMA) hastalarından türetilen İPKH'lerin in vitro farklılaşması bu hastalık sırasında görülen motor nöronların gelişimsel kaybını yansıtabilen progresif motor nöron kaybını göstermiştir. Sergilenmekte olan bu in vitro çalışmalar ile İPKH teknolojisini kullanarak hastalık modellemesinin gerçekte uygulanabilir olabileceğine dair kanıtlar elde edilmiştir⁷⁴. Bazı eksikliklerin neden olduğu çeşitli hastalık türleri İPKH'ler kullanılarak incelenmiştir. Park ve arkadaşları hastalık modelleri ve ilaç keşfi çalışmaları için Adenozin deaminaz eksikliğine bağlı şiddetli immün yetmezlik (ADA-SCID), Shwachman-Bodian-Diamond sendromu (SBDS), Gaucher hastalığı (GD) tip III gibi çeşitli hastalıkları kaynağını insan vücudu olan İPKH'ler kullanarak anlamaya çalışmışlardır. Çalışmalarını dermal fibroblastlar veya kemik iliğinden türetilmiş mezenkimal kök hücreleri kullanarak ve dört veya üç (c-Myc transkripsiyon faktörü hariç) transkripsiyon faktörünün transdüksiyonu yoluyla insan İPKH'lerinin üretimi için kullanmışlardır. Çalışmalarından ADA-SCID, SBDS ve Gaucher hastalığı tip III'ün otozomal resesif olan konjenital bozukluklar gibi klasik bir Mendel Kalıtım tarzında kalıtsal olduğu göstermişlerdir. Yapılan çalışmada hastalıkların normal hematopoez ve immünojenik fonksiyon için hayati öneme sahip genlerdeki nokta mutasyonlardan kaynaklandığı gösterilmiştir^{75,76}. Başka bir açıdan terapötik rejenerasyon için İPKH'lerin transplantasyonu ile ilgili olarak şimdiye kadar ki en ilgi çekici çalışma İPKH'lerden türetilen hematopoietik hücrelerin orak hücreli aneminin insanlaştırılmış fare modelinde kan hücresi fenotipini azaltabilmesi olmuştur. Çalışma da İPKH'ler insan hemoglobin sekansında bir mutasyon taşıyan transgenik bir fareden türetilmiştir ve ardından homolog rekombinasyon yoluyla genetik olarak düzeltilmiştir. Düzeltilmiş İPKH'lerin hematopoietik progenitörlere in vitro farklılaşması ve ardından orijinal transgenik farelere transplantasyonu normal hemoglobin seviyelerinin restorasyonunu geliştirmiş bir fenotip ile sonuçlanmıştır⁷⁷. Diğer organlar için de benzer nakil temelli yaklaşımlar bildirilmiştir. Örneğin fare İPKH'lerinden türetilen kısmen saflaştırılmış dopaminerjik nöronlar Parkinson hastalığının sıçan modelinde klinik semptomlarını iyileştirmeyi başarmıştır⁷⁸. Benzer şekilde insan İPKH'lerinden türetilmiş hücrelerin deneysel olarak yaralanan kemirgen kalbine transplantasyonu sonucunda da kardiyak kasılma fonksiyonunda bir dereceye kadar kısa vadeli fonksiyonel iyileşme göstermiştir⁷⁹. Moad ve arkadaşları ise insan prostat

ve idrar yolu hücrelerini İPKH eldesi için ve ayrıca bu hücrelerinin farklılaşmalarını düzenleyen mekanizmaları incelemek için kullanılmışlardır. Çalışmalarda kullanılan hücreler farklı yaş aralıkların da bulunan erkek ve kadın hastalardan alınan biyopsi örneklerinden sağlanmıştır. Çalışmalarıyla mesane, prostat ve üreter stromal fibroblastlarının, pluripotent özellik kazandırmak üzere yeniden programlanması amaçlanmıştır. Daha sonra transdüksiyona tabi tutulan stromal hücrelerin homojenliği hücre belirteçleri kullanılarak gerçek zamanlı ters transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile doğrulanmıştır. Doğrulama; CD24 epiteli, CD45 hematopoietik, von Willebrand faktör endoteli, CD146 endotelyal, a-düz kas aktin [SMA] stromal düz kası ve Thy-1 hücre yüzey antijeni [CD90] gibi belirteçler kullanılarak saptanmıştır. Prostat kaynaklı İPKH'lerden prostat dokusunun başarılı bir şekilde oluştuğu gözlemlenmiştir. Mesane ve üreter kaynaklı İPKH'ler de karakteristik EKH morfolojisi, ilgili belirteçlerin ekspresyonu ve üç germ tabakasının da üretilmesi gözlemlenerek pluripotent özelliklerin kazandırıldığı böylece tespit edilmiştir. Geleneksel cilt hücrelerinden türetilen İPKH'lerin aksine, prostat kaynaklı İPKH'ler, androjen reseptörü ve prostata özgü antijen indüksiyonu ile karakterize edilen prostat epiteline özgü farklılaşma oluşturma konusunda başarılı sonuçlar göstermiştir. Benzer sonuçlar üreter kaynaklı İPKH'ler için de belirtilmiştir. Ürotelyal spesifik belirteçlerin ekspresyonunda da gösterildiği gibi mesane farklılaşması ciltten türetilen İPKH'ler ile karşılaştırıldığında daha etkili olduğu gösterilmiştir. Aslında yapılan çalışmalar ile aynı zamanda deri fibroblastlarından türetilen İPKH'lere kıyasla; insan prostatı ve idrar yolu dokusu kendi ana organ soylarına geri farklılaştırılabilen İPKH'leri oluşturmak için kullanılabilmesi anlaşılmıştır. Özellikle de prostat kaynaklı İPKH'ler ve üreter kaynaklı İPKH'lerin nesli normal ve hastalıklı prostat ve mesane biyolojisi çalışmaları için önemli bir potansiyel sunabileceği ve uygun bir erişime hazır model sağlayabileceğini göstermiştir.⁷⁶ Kazuki ve arkadaşları ise bir insan Duchhene Musküler Distrofi (DMD) hastasından alınan İPKH'lerdeki genetik eksikliği düzeltmeye odaklanmışlardır. Tam Distrofin (DYS) dizisinin ifadesi için İnsan Yapay Kromozomu (İYK) kullandılar. Bunu İPKH'lerin oluşturulması için DMD hastasından alınan fibroblastları kullandılar. İYK, Mikro-hücre aracılı kromozom transferi (MMCT) kullanılmasıyla *DYS-İYK* (İYK'de tam genomik distrofin dizisi) aktarımı ile İPKH'lerde bulunan Distrofin genindeki silinme veya mutasyonun düzeltilmesi için kullanılmıştır⁸⁰. İPKH'ler ayrıca hepatositlerin işlev kaybının neden olduğu rahatsızlıklar için hepatosit eldesi amacı ile kullanılabilir. İPKH'ler çeşitli karaciğer problemleri için hepatosit üretimi için umut vaad edicidir. İPKH'ler aynı zamanda farklı dokuların onarımı için çeşitli hücrelerin üretimi için de kullanılabilir. Örneğin kalp kapakçıkları, damarlar ve iskemik

dokuların onarımı için kardiyovasküler hücrelerin elde edilmesi amacıyla kullanılabilir. Ancak bu uygulamalar da tedavi sonrası olumsuz etkiler ya da büyük miktarlarda saf ve kaliteli hücreler oluşturmak için protokollerin standardizasyonu gibi sınırlamalar karşımıza çıkmaktadır. Bu engeller bir kez aşıldıktan sonra İPKH'lerin kardiyovasküler hücreleri oluşturmak ve ilgili hastalıkların incelenmesi için uygun zemin hazırlanacağı düşünülmektedir⁸¹. Başka bir açıdan İPKH'ler birçok hücre ölümünden kaynaklanan çeşitli dejeneratif hastalıkların gen terapisi ile tedavisini de mümkün kılmıştır. Özellikle de gözün retina dejenerasyonunun görme bozukluğuna neden olduğu bilinen Retinitis pigmentosa (RP) hastalığının tedavisini de İPKH'lerin kullanılması karşımıza çıkmaktadır. İnsan kaynaklı fibroblast hücrelerin, lentiviral vektör transdüksiyonu yardımıyla İPKH eldesi için kullanılmıştır. Bunların çubuk foto reseptör hücrelerine farklılaştığı gösterilmiştir. Yapılan çalışma ile retina pigmentli epitelde farklılaşmasının Retinal Pigmentoza ve Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyonu (AMD) hastaları tedavisi için faydalı olduğu gösterilmiştir⁸². Kısaca hücresel pluripotent özelliklerin ve yeniden programlanmanın moleküler mekanizmalarının anlaşılmasında birtakım ilerlemeler kaydedilmesi gerekmesine rağmen İPKH teknolojisi kullanılarak yeni tedavi yaklaşımlarının ve ilaçların keşfedilebilmesi olasılığı, hastalık modellerinin oluşturulması ve temel/klinik çalışmaların hız kazanması sağlanmaktadır.

Sonuç

Sonuç olarak günümüzde kök hücre çalışmaları embriyonik kök hücrelerinin eldesinin zor ve meşakkatli oluşu aynı zamanda etik konulardan kaynaklanan sorunlardan dolayı yönünü İPKH'lerin elde edilmesine çevirmiştir. İndüklenmiş pluripotent kök hücreler hücresel tedaviler ve kişiye özel tedaviler için iyi bir kaynak olarak popülerliğini korumaktadır. Bu hücrelerin eldesi için birçok farklı yöntem denenmiş ve denenmeye de devam etmektedir. Ayrıca çeşitli genetik hastalık modeline sahip hücrelerden indüklenmiş pluripotent hücrelerin eldesi ve fonksiyonel verimliliklerinin artırılması başlıca çalışmalar arasında yerini almıştır. Bu konu ile ilgili çalışmaların hız kesmeden devam edeceği ve bilim insanlarının azminin bizlere umut olacağı aşikardır.

Kaynaklar

1. El-Badri N, Ghoneim MA. Mesenchymal stem cell therapy in diabetes mellitus: Progress and challenges. *J Nucleic Acids*. 2013. doi:10.1155/2013/194858
2. Pileggi A. Mesenchymal stem cells for the treatment of diabetes. *Diabetes*. 2012. doi:10.2337/db12-0355
3. Deshmukh RS, Kovács KA, Dinnyés A. Drug discovery models and toxicity testing using embryonic and induced pluripotent

İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreleri

- stem-cell-derived cardiac and neuronal cells. *Stem Cells Int.* 2012. doi:10.1155/2012/379569
4. Spitalieri P, Talarico VR, Murdocca M, Novelli G, Sangiuolo F. Human induced pluripotent stem cells for monogenic disease modelling and therapy. *World J Stem Cells.* 2016. doi:10.4252/wjsc.v8.i4.118
 5. Amabile G, Meissner A. Induced pluripotent stem cells: current progress and potential for regenerative medicine. *Trends Mol Med.* 2009. doi:10.1016/j.molmed.2008.12.003
 6. Soldner F, Hockemeyer D, Beard C, et al. Parkinson's Disease Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells Free of Viral Reprogramming Factors. *Cell.* 2009. doi:10.1016/j.cell.2009.02.013
 7. Bunge MB. Novel combination strategies to repair the injured mammalian spinal cord. *J Spinal Cord Med.* 2008. doi:10.1080/10790268.2008.11760720
 8. Thomson JA. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science (80-).* 1998;282(5391):1145-1147. doi:10.1126/science.282.5391.1145
 9. Cheung TH, Rando TA. Molecular regulation of stem cell quiescence. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013. doi:10.1038/nrm3591
 10. Kim JS, Choi HW, Choi S, Do JT. Reprogrammed pluripotent stem cells from somatic cells. *Int J Stem Cells.* 2011;4(1):1-8. doi:10.15283/ijsc.2011.4.1.1
 11. Avçılar H, Saraymen B, Özturan OÖ, Köker MY. Embriyonik Kök Hücreler ve İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler. *Asthma Allergy Immunol.* 2017. doi:10.21911/aai.22
 12. Ateş U. Kök hücreyi tanıyalım. *FNG Bilim Tıp Transplant Derg.* 2016. doi:10.5606/fng.transplantasyon.2016.004
 13. Kansu Emin. Kök hücre biyolojisi ve plastisitesinde güncel kavramlar. *Hacettepe Med J.* 2005.
 14. Martin-Rendon E, Watt SM. Exploitation of stem cell plasticity. *Transfus Med.* 2003. doi:10.1111/j.1365-3148.2003.00462.x
 15. Santoro A, Vlachou T, Carminati M, Pelicci PG, Mapelli M. Molecular mechanisms of asymmetric divisions in mammary stem cells. *EMBO Rep.* 2016. doi:10.15252/embr.201643021
 16. Kıvanç M, Öztürk Ş, Gökalp S, Özdemir İ, Tuğlu İ. Adipoz Kaynaklı Kök Hücreler ve Uygulama Alanları. *Cukurova Med J.* 2015. doi:10.17826/cutf.44976
 17. Erdal Y, Seçkin UD. Klinik çalışmalar açısından güncel mezenkimal kök hücre uygulamaları. *İstanbul Bilim Üniversitesi Florence Nightingale Transplant Derg.* 2017.
 18. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell.* 2006. doi:10.1016/j.cell.2006.07.024
 19. Doss MX, Koehler CI, Gissel C, Hescheler J, Sachinidis A. Embryonic stem cells: A promising tool for cell replacement therapy. *J Cell Mol Med.* 2004. doi:10.1111/j.1582-4934.2004.tb00471.x
 20. Keller G. Embryonic stem cell differentiation: Emergence of a new era in biology and medicine. *Genes Dev.* 2005. doi:10.1101/gad.1303605
 21. Gardner RL, Brook FA. Reflections on the biology of embryonic stem (ES) cells. *Int J Dev Biol.* 1997;41(2):235-243. doi:10.1387/ijdb.9184330
 22. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature.* 1981. doi:10.1038/292154a0
 23. Shen H, Zhang L, Liu M, Zhang Z. Biomedical applications of graphene. *Theranostics.* 2012;2(3):283-294. doi:10.7150/thno.3642
 24. Nichols J, Evans EP, Smith AG. Establishment of germ-line-competent embryonic stem (ES) cells using Differentiation Inhibiting Activity. *Development.* 1990.
 25. Dahéron L, Opitz SL, Zachres H, et al. LIF/STAT3 signaling fails to maintain self-renewal of human embryonic stem cells. *Stem Cells.* 2004;22(5):770-778.
 26. Xiao L, Yuan X, Sharkis SJ. Activin A Maintains Self-Renewal and Regulates Fibroblast Growth Factor, Wnt, and Bone Morphogenic Protein Pathways in Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells.* 2006. doi:10.1634/stemcells.2005-0299
 27. Thomson JA, Itskovitz-eldor J, Shapiro SS, et al. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature.* 2013. doi:10.1101/gad.1811609
 28. Canals I, Ginisty A, Quist E, et al. Rapid and efficient induction of functional astrocytes from human pluripotent stem cells. *Nat Methods.* 2018. doi:10.1038/s41592-018-0103-2
 29. Papatoutian A, Wold BJ, Wagner RA. Evidence for developmentally programmed transdifferentiation in mouse esophageal muscle. *Science (80-).* 1995. doi:10.1126/science.270.5243.1818
 30. González F, Boué S, Belmonte JCI. Methods for making induced pluripotent stem cells: Reprogramming à la carte. *Nat Rev Genet.* 2011. doi:10.1038/nrg2937
 31. Can A. A concise review on the classification and nomenclature of stem cells. *Turkish J Hematol.* 2008.
 32. Pralong D, Mroziak K, Occhiodoro F, et al. A novel method for somatic cell nuclear transfer to mouse embryonic stem cells. *Cloning Stem Cells.* 2005;7(4):265-271.
 33. Fulka J, Loi P, Fulka H, Ptak G, Nagai T. Nucleus transfer in mammals: Noninvasive approaches for the preparation of cytoplasts. *Trends Biotechnol.* 2004. doi:10.1016/j.tibtech.2004.04.002
 34. Briggs R, King TJ. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs' eggs. *Proc Natl Acad Sci.* 1952. doi:10.1073/pnas.38.5.455
 35. Wernig M, Meissner A, Foreman R, et al. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature.* 2007. doi:10.1038/nature05944
 36. Seyalioğlu İ, Şenel Eraslan B, Hot İ, Demircan YT, Çetin G. Klonlamaya Genetik, Etik ve Hukuksal Açından Yaklaşım. *Adli Tıp Derg.* 2007.
 37. Tada S, Tada T, Lefebvre L, Barton SC, Surani MA. Embryonic germ cells induce epigenetic reprogramming of somatic nucleus in hybrid cells. *EMBO J.* 1997. doi:10.1093/emboj/16.21.6510
 38. Bhutani N, Brady JJ, Damian M, Sacco A, Corbel SY, Blau HM. Reprogramming towards pluripotency requires AID-dependent DNA demethylation. *Nature.* 2010. doi:10.1038/nature08752
 39. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell.* 2007. doi:10.1016/j.cell.2007.11.019
 40. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science (80-).* 2007. doi:10.1126/science.1151526
 41. Schöler HR, Ruppert S, Suzuki N, Chowdhury K, Gruss P. New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4. *Nature.* 1990. doi:10.1038/344435a0
 42. Okamoto K, Okazawa H, Okuda A, Sakai M, Muramatsu M, Hamada H. A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells. *Cell.* 1990. doi:10.1016/0092-8674(90)90597-8
 43. Abed M, Kenyagin-Karsenti D, Boico O, Orian A. DamID: A methylation-based chromatin profiling approach. *Methods Mol Biol.* 2009. doi:10.1007/978-1-60327-414-2_11
 44. Saigal S, Bhargava A. Stem cell - is there any role in tumorigenic activity. *Turk Patoloji Dergisi/Turkish J Pathol.* 2011. doi:10.5146/tjpath.2011.01055
 45. Boyer LA, Tong IL, Cole MF, et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell.* 2005. doi:10.1016/j.cell.2005.08.020

46. Loh YH, Wu Q, Chew JL, et al. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat Genet.* 2006. doi:10.1038/ng1760
47. Zhao W, Hisamuddin IM, Nandan MO, Babbin BA, Lamb NE, Yang VW. Identification of Krüppel-like factor 4 as a potential tumor suppressor gene in colorectal cancer. *Oncogene.* 2004. doi:10.1038/sj.onc.1207067
48. Rowland BD, Bernards R, Peeper DS. The KLF4 tumour suppressor is a transcriptional repressor of p53 that acts as a context-dependent oncogene. *Nat Cell Biol.* 2005. doi:10.1038/ncb1314
49. Li Y, McClintick J, Zhong L, Edenberg HJ, Yoder MC, Chan RJ. Murine embryonic stem cell differentiation is promoted by SOCS-3 and inhibited by the zinc finger transcription factor Klf4. *Blood.* 2005. doi:10.1182/blood-2004-07-2681
50. Sevim H, Gürpınar ÖA. İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler Ve Uygulamaları{Dotless}. *Marmara Med J.* 2012. doi:10.5472/MMJ.2011.01922.1
51. McMahon SB, Wood MA, Cole MD. The Essential Cofactor TRRAP Recruits the Histone Acetyltransferase hGCN5 to c-Myc. *Mol Cell Biol.* 2000. doi:10.1128/mcb.20.2.556-562.2000
52. Adhikary S, Eilers M. Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005. doi:10.1038/nrm1703
53. Fernandez PC, Frank SR, Wang L, et al. Genomic targets of the human c-Myc protein. *Genes Dev.* 2003. doi:10.1101/gad.1067003
54. Huangfu D, Maehr R, Guo W, et al. Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat Biotechnol.* 2008. doi:10.1038/nbt1418
55. Silva J, Barrandon O, Nichols J, Kawaguchi J, Theunissen TW, Smith A. Promotion of reprogramming to ground state pluripotency by signal inhibition. *PLoS Biol.* 2008. doi:10.1371/journal.pbio.0060253
56. Bayart E, Cohen-Haguenauer O. Technological Overview of iPS Induction by Human Adult Somatic Cells. *Curr Gene Ther.* 2013. doi:10.2174/1566523211313020002
57. Verfaillie C. The undoing of differentiation by four defined factors: A big step forward towards generating patient specific pluripotent stem cells. *J Hepatol.* 2008. doi:10.1016/j.jhep.2008.08.007
58. Abad M, Mosteiro L, Pantoja C, et al. Human and Mouse Induced Pluripotent Stem Cells Are Differentially Reprogrammed in Response to Kinase Inhibitors. *Stem Cell Reports.* 2015. doi:10.1002/stem.2071
59. Chatterjee S, Chaklader M, Basak P, et al. An animal model of chronic aplastic bone marrow failure following pesticide exposure in mice. *Int J Stem Cells.* 2010. doi:10.15283/ijsc.2010.3.1.54
60. Egashira T, Seki T, Yuasa S, et al. Generation of induced pluripotent stem cells in healthy volunteers and patients with hereditary heart disease. *J Mol Cell Cardiol.* 2010. doi:10.1016/j.yjmcc.2010.03.009
61. Ramos-Mejia V, Muñoz-Lopez M, Garcia-Perez JL, Menendez P. iPSC lines that do not silence the expression of the ectopic reprogramming factors may display enhanced propensity to genomic instability. *Cell Res.* 2010. doi:10.1038/cr.2010.125
62. Plews JR, Li JL, Jones M, et al. Activation of pluripotency genes in human fibroblast cells by a novel mRNA based approach. *PLoS One.* 2010. doi:10.1371/journal.pone.0014397
63. Zhou H, Wu S, Joo JY, et al. Generation of Induced Pluripotent Stem Cells Using Recombinant Proteins. *Cell Stem Cell.* 2009;4(5):381-384. doi:10.1016/j.stem.2009.04.005
64. Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, et al. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell.* 2010. doi:10.1016/j.stem.2010.08.012
65. Kim JS, Choi HW, Choi S, Do JT. Reprogrammed pluripotent stem cells from somatic cells. *Int J stem cells.* 2011;4(1):1.
66. Varli HS, Alkan F, Demirbilek M, Türkoğlu N. A virus-free vector for the transfection of somatic cells to obtain iPSC. *J Nanoparticle Res.* 2019;21(11). doi:10.1007/s11051-019-4668-1
67. Maherali N, Sridharan R, Xie W, et al. Directly Reprogrammed Fibroblasts Show Global Epigenetic Remodeling and Widespread Tissue Contribution. *Cell Stem Cell.* 2007. doi:10.1016/j.stem.2007.05.014
68. Keller GM. In vitro differentiation of embryonic stem cells. *Curr Opin Cell Biol.* 1995. doi:10.1016/0955-0674(95)80071-9
69. Stojkovic M. Derivation of Human Embryonic Stem Cells from Day-8 Blastocysts Recovered after Three-Step In Vitro Culture. *Stem Cells.* 2004. doi:10.1634/stemcells.22-5-790
70. Gokhale PJ, Andrews PW. Characterization of human pluripotent stem cells. 2013.
71. Haase A, Olmer R, Schwanke K, et al. Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from Human Cord Blood. *Cell Stem Cell.* 2009. doi:10.1016/j.stem.2009.08.021
72. Lowry WE, Richter L, Yachechko R, et al. Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008. doi:10.1073/pnas.0711983105
73. Aasen T, Raya A, Barrero MJ, et al. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol.* 2008. doi:10.1038/nbt.1503
74. Ebert AD, Yu J, Rose FF, et al. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature.* 2009. doi:10.1038/nature07677
75. Park IH, Arora N, Huo H, et al. Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell.* 2008. doi:10.1016/j.cell.2008.07.041
76. Singh VK, Kalsan M, Kumar N, et al. Induced pluripotent stem cells : applications in regenerative medicine , disease modeling , and drug discovery. 2015;3(February):1-18. doi:10.3389/fcell.2015.00002
77. Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, et al. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science (80-).* 2007. doi:10.1126/science.1152092
78. Wernig M, Zhao JP, Pruszak J, et al. Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008. doi:10.1073/pnas.0801677105
79. Zhang J, Wilson GF, Soerens AG, et al. Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Circ Res.* 2009. doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.192237
80. Kazuki Y, Hiratsuka M, Takiguchi M, et al. Complete genetic correction of iPS cells from duchenne muscular dystrophy. *Mol Ther.* 2010. doi:10.1038/mt.2009.274
81. Mahla RS. Stem cells applications in regenerative medicine and disease therapeutics. *Int J Cell Biol.* 2016. doi:10.1155/2016/6940283
82. Li Y, Tsai YT, Hsu CW, et al. Long-term safety and efficacy of human-induced pluripotent stem cell (iPS) grafts in a preclinical model of retinitis pigmentosa. *Mol Med.* 2012;18(9):1312-1319. doi:10.2119/molmed.2012.00242