ISSN: 2148-9815

Kök Hücre E-Bülteni

www.kokhucrebulteni.com
info@kokhucrebulteni.com

Sayı: 36
Ekim-Kasım-Aralık 2020

Editör'den

Alp Can

WEBİNAR Çağındayız !..

KHB'nin **36. sayı**sıyla hepinize tekrar merhaba.

Son iki sayımızı (34 ve 35) "tarihe geçecek koşullar altında yaşamak zorunda kaldığımız bir dönemde çıkarıyoruz" demiştik. 11 Mart 2020'den, yani ülkemizde ilk COVID-19 vakasının görüldüğü günden bu yana hastalığın ikinci dalgasına da geçtiğimiz 2-3 ayda tanık olduk ve gerek vaka gerekse ölüm sayılarında ciddi artışlar izledik.

Şimdi akademilerde görev yapan bizleri eğitim ve araştırma dönemi bekliyor. Gerek lisans eğitimleri gerekse mezuniyet sonrası araştırma etkinlikleri iç mekânlara tekrar girip birarada bulunmayı gerektiriyor. Öte yandan yüzyüze eğitimin ve kapalı oturumların sakıncaları anlaşıldığından bu yana uzaktan eğitim ve webinar hayatımızda daha fazla yer tutmaya başladı. Çağımız, yeni teknolojilere terim üretme (uydurma) çağı. Ağ anlamına gelen "web" ile bilgi alış-verişinde bulunmak anlamına gelen "seminar" kelimelerinden türetilen "webinar", sanıyorum son yıllarda çok sık içinde olacağımız bir etkinlik haline geldi. Birkaç kişiyle sınırlı olan tez izleme komitesi oturumlarından, birkaç bin kişilik kongre sunumlarına kadar webinar kullanmak mümkün. Webinarda daha çok bir kişinin sunum yapması, diğerlerinin ise dinlemesi ve soru sorması söz konusu. Katılımcılar arasında karşılıklı etkileşimin yüksek oranda olduğu etkinliklereyse "video konferans" adının verildiğini görüyoruz. Sevsek de sevmesek de bundan böyle karşılıklı bilgi alış-verişi için bir araya gelmek yerine webinar ve video konferans tekniklerini kullanıyor olacağız. Oldukça da masrafsız ve zahmetsiz.

Bu sayımızda yine kök hücre alanındaki ilgi çekici gelişmeleri sizlerle paylaşmak istedik. Önce **Dr. Hakan Coşkun**, bir süredir merak edilen bir hücre türünü **KHB** okurları için özetledi. Yazıdan da anlaşılacağı üzere mezenkimal kök hücrelerin daha pluripotent olanları için kullanılan MUSE hücresi terimi belki de giderek tedavide aradığımız ve diğer hücrelerden ayrıştırmak durumunda kalacağımız hücreler olacaktır. İkinci olarak **Dr. Ekin Baysal**'ın, 1997 yılında Asahara ve ark. tarafından ilk kez rapor edilen endotel öncüsü hücrelere ilişkin tanıtıcı yazısını seçtik sizler için. Ardından **Ezel Erkan**, fibroblastların kimyasal olarak doğrudan retinanın çubuk hücrelerine dönüştürülmesiyle görme duyusunun yeniden kazanılmasını konu alan çalışmalarıyla Mahato ve ark'nın Mayıs 2020'de Nature'da yayınladıkları çalışmayı **KHB** okurları için özetledi.

Mayıs ayında moleküler görüntüleme konusunda çok önemli iki çalışma bioRxiv sunucusunda yayınlandı, bugünlerde basılı makaleleri bekleniyor. Proteinlerin görüntülenmesine kriyo-EM'nin başarısını konu alan bu iki çalışmayı çok genel perspektiften özetledik. Her ne kadar kök hücre ile doğrudan ilişkisi olmasa da gerek protein yapılarının belirlenmesi gerekse hastalıkta ortaya çıkan protein değişikliklerinin giderilmesi için ilaç çalışmalarında atomik çözünürlükte elde edilecek veriler çok önemli olacaktır.

Bu sayımızda çoktandır ele almadığımız bir bölüme tekrar yer vermek istedik. **Dr. Öğr. Gör. Duru Aras Tosun KHB** okurları için son iki yılda yayınlanan bazı kitapların tanıtımını yapıyor. Kök hücre alanını çoğunlukla güncel yayınlanan makalelerden izleyen bizler için arada bir dönüp kitaplarda yazılanları okuyup "büyük resmi" görmek çok faydalı, kuşkusuz.

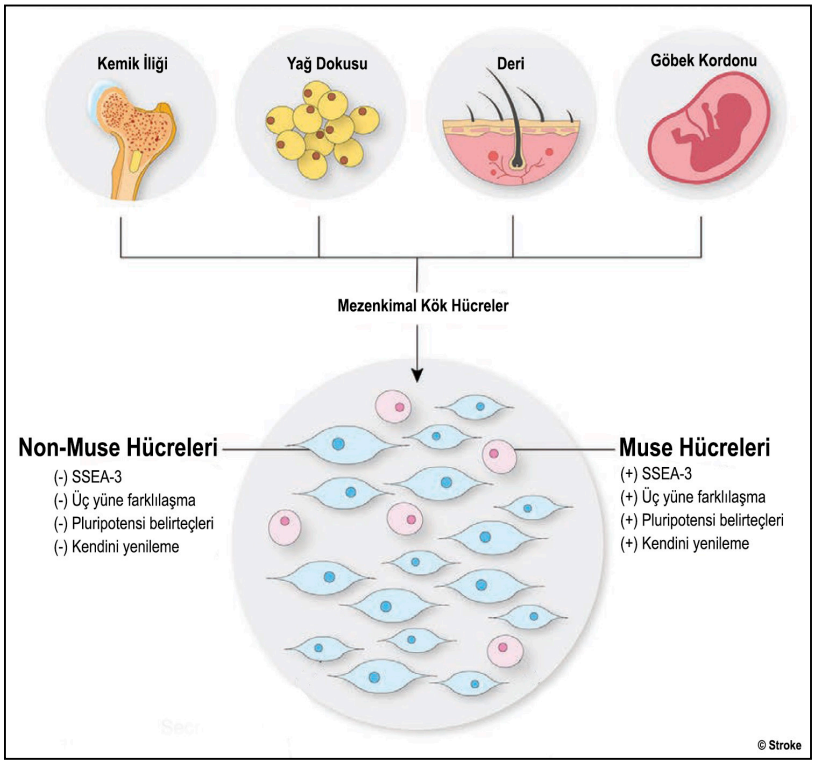
KHB'nin 37. sayısında buluşuncaya kadar hoşça ve sağlıkla kalın...

Hücresel Tedavi ve Rejeneratif Tıp

Hakan Coşkun

Yeni Bir Kök Hücre Tipi: "MUSE" Hücreleri!

İlk olarak 2010 yılında **Kuroda ve ark**. [Proc Natl Acad Sci USA 107: 8639–8643, 2010] tarafından tanımlanan **Strese Dayanıklı Çok Yöne Farklılaşabilen** [**MUSE** (*Multilineage-differentiating stress-enduring*) *cells*] **hücreleri**, mezenkimal kök hücrelerin bir alt kümesi olarak kemik iliği, yağ dokusu, dermis, pankreas ve periferik kan dokusunu içeren bağ doku tiplerinde bulunmaktadır. Kemik iliğinde yenileyici kök hücre rolü üstlenen MUSE hücreleri, kemik iliğinin gevşek dokusu içindeki (myeloretüküler doku) tek çekirdekli hücre popülasyonunun %0,03'ünü oluşturmakta. Periferik kandaki tek çekirdekli hücrelerinin ise %0,01 ila %0,02'sini temsil eden MUSE hücrelerinin bir doku yaralanması ya da hastalık durumunda yoğunluğunun arttığı gösterilmiş [Tanaka ve ark. Circ J 82: 561–571, 2018]. Bununla birlikte, embriyo dışı bir doku olan ve günümüzde önemli bir kök hücre kaynağı olarak kullanılan olan göbek kordonunda da MUSE hücreleri bulunmakta [Dezawa M. Cell Transplant 25: 849–861, 2016].



MUSE hücrelerinin çoklu yöne farklılaşabilme özelliklerinden dolayı miyokard enfarktüsü, inme, kronik böbrek hastalığı ve karaciğer hastalıklarının tedavilerine yönelik klinik öncesi önemli çalışmalar bulunmakta. Miyokard enfarktüsü ve inme sonrası yapılan klinik çalışmalarda MUSE hücrelerinin akut evrede periferik kanda sayılarının arttığı gözlemlenmiş ve bu artışın miyokard enfarktüsü sonrası uzun iyileşme süreciyle arasında pozitif bir bağlantı olduğu gösterilmiştir [Amin ve ark. Cell Transplant 27: 285–298, 2018] . Bu bağlamda, iskemi sonrasında ortaya çıkan doku hasarını onarıcı etkisinin güçlendirilmesi için herhangi bir gen düzenlemesi ya da sitokin olmaksızın, naif MUSE hücrelerinin kullanılabileceği düşünülmekte. Bu hipoteze göre, akut evrede serebral arteri tıkama modeli oluşturulmuş sıçanlara, enfarktüs alanının çevresine insan kemik iliği kaynaklı MUSE hücrelerinin uygulanması sonrasında, bu hücrelerin başarılı şekilde iskemik dokuyla yerleştiği ve mikrotübülüs ilişkili protein-2 (MAP2), kalbindin ve nöronal hücresel antijen gibi sinir hücresine ait belirteçleri ifade ettiği gösterilmiştir [Uchida ve ark. Stroke 48: 428–435, 2017]. Bu çalışmalara ek olarak beyin, kalp, karaciğer, böbrek ve deri gibi organlarda da MUSE hücrelerinin onarıcı özellik sergiledikleri ifade edilmekte.

Doku hasarı sonrası kemik iliğinden hareket ederek periferik kana karışan MUSE hücrelerinin sfingozin 1 fosfat reseptörü aracılığıyla yaralı bölgeye yerleştiği biliniyor. Strese karşı doğal toleransları sayesinde hasarlı doku bölgesinde iskemi sonrası inflamasyon

gibi etmenlerden etkilenmeden kalabiliyorlar ve immünmodülatör özellikleri sayesinde allojeneik ya da ksenograft MUSE hücreleri konakçının bağışlılık hücrelerinden korunabiliyorlar. Hedef bölgeye ulaştıklarındaysa kendiliğinden doku uyumlu hücrelere farklılaşıp dokuya entegre oluyorlar. Göründüğü kadarıyla iskemik inme modelinde, sinir hücresine farklılaşan MUSE hücrelerinin transplantasyondan iki ila üç ay sonrasında aksonlarını oluşturduğu gösterilmiş. Ayrıca konakçı nöronları ile sinaps oluşturarak motor fonksiyonların yeniden düzenlenmesini sağlamış durumda.

Mezenkimal kök hücrelerin bir alt grubu olan MUSE hücreleri mezenkimal kök hücre popülasyonun içinden izole edilerek elde edilmekte [Tatsumi ve ark. Adv Exp Med Biol 1103: 69–101, 2018]. Kısaca, kemik iliğinden izole edilen mezenkimal kök hücreler gerekli kültür koşullarında çoğaltılarak %90 yoğunluğa ulaştığında pasajlanır. Üçüncü ya da dördüncü pasaja gelindiğinde hücreler dondurularak 2-3 günlüğüne -80 °C ya da daha uzun süreler için sıvı nitrojen içinde saklanabilir. Dondurulmuş mezenkimal kök hücreler yeniden kültür edilerek %90 yoğunluğa ulaştıktan sonra yeniden pasajlanır ve hücre yoğunluğu %100'e ulaştığında hücreler kaldırılarak süspanse edilir. Bu karışım içinden MUSE hücreleri, **evreye özgü embriyonik antijen-3** (**SSEA-3**) ile işaretlenerek flöresan protein işaretli hücre ayırma işlemi ile ayrılır. Elde edilen hücreler %10 buzağı serumu içeren DMEM besi yeri ile kültür edilerek çoğaltılır.

İn vivo ve *in vitro* koşullar altında elde edilen bilgilerin klinik çalışmalara aktarılması sürecinde, tedavinin başlangıç süresiyle kullanılması gereken hücre dozunun optimizasyonunun yapılması ve bu süreçte en az zarar verici yöntemler uygulanması gerekmekte. Buna yönelik yapılan bir çalışmada subakut ya da kronik evredeki enfarktüs fare modellerine, $Sox2^+$, $Oct3/4^+$, $Nanog^+$ MUSE hücreleri düşük doz ($5x10^3$ hücre/kütle), orta doz ($1x10^4$ hücre/kütle) ve yüksek doz ($5x10^4$ hücre/kütle) olmak üzere üç farklı yoğunlukta damar içine verildiğinde, yüksek doz verilen grupta subakut dönemde 6, kronik fazda ise 8 hafta sonra önemli ölçüde iyileşme olduğu rapor edilmiştir. Buna göre MUSE hücreleri, laküner enfarktüs sonrası iyileşmede ümit vaat eden bir hücre türü olarak görülmekte.

Klinik çalışmalara bakıldığında, iskemik inme sonrasında sinir kök hücresi uygulanması sonrasında önemli bir iyileşme göstermediği bilinmekte. Ayrıca bazı çalışmalarda bu hücrelerin tümör oluşturdukları gösterilmiştir [Amariglio ve ark. PLoS Med 6: e1000029, 2009]. Buna göre en uygun ve güvenli yöntemin mezenkimal kök hücre kullanımı olduğu söylenebilir. Fakat hücre tedavilerinin etki değeri de uygulama sonrası ortamda salgılanan büyüme faktörleri, immünolojik değişimler, yangı ve mitokondriyal madde aktarımları gibi faktörlerde bağlı olarak değişiklik göstermekte. MUSE hücresi aktarımı sonrasında bu sınırlamalardan bazılarının aşıldığı ve doğrudan hücre değişimiyle yenilenmenin gerçekleştiği gösterilmiş. İnsan kaynaklı MUSE hücreleri özellikle plasentanda bulunan ve immün toleranstan sorumlu olan bir antijen olan insan lökosit antijen-G'yi (HLA-G) ifade etmekte. Böylece allojenik MUSE hücreleri konakçının dokusunda herhangi bir immün baskılama olmadan 6 ay boyunca hücresel işlevlerini yerine getirebilmekte. Dolayısıyla allojeneik MUSE hücrelerinin kullanımı otolog uygulamalara göre akut bir inme sonrasında en kısa sürede uygulanabileceğinden önemli bir avantaj sağlamakta.

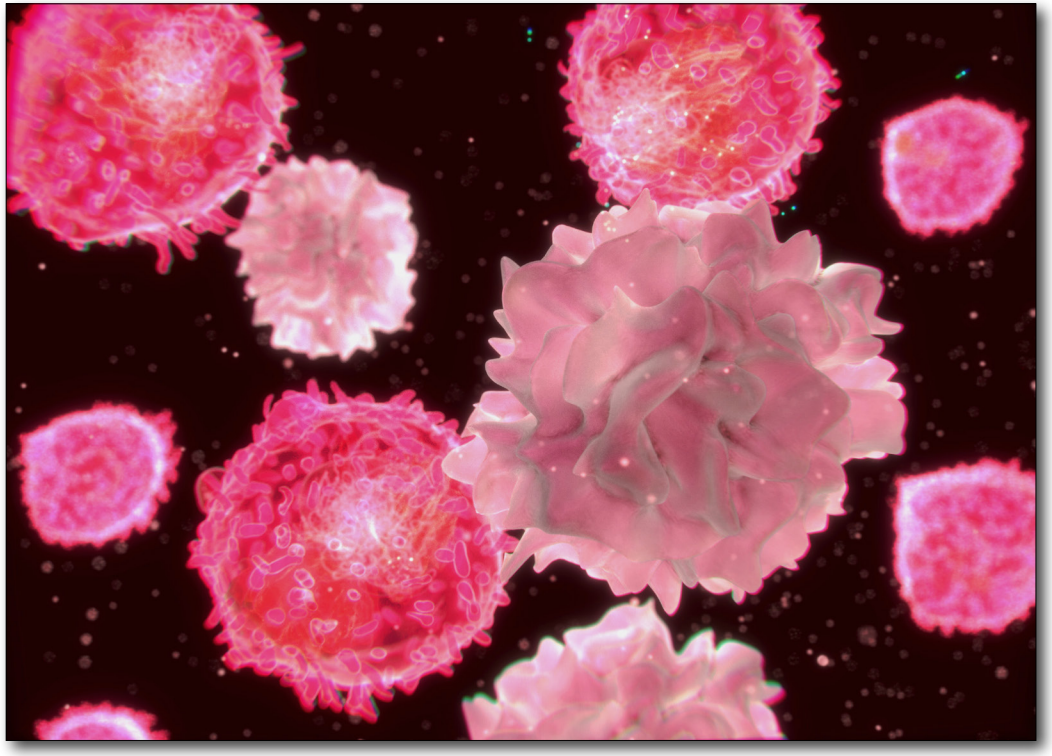
Bildiğiniz gibi günümüzde birçok hastalığın tedavisinde hücresel terapi önemli bir rol oynamakta. Kullanılan hücre tiplerinin başında da mezenkimal kök hücreler gelmekte. Mezenkimal kök hücreler kemik iliği, yağ doku, göbek kordonu ve diş pulpası gibi farklı kaynaklardan elde edebilmekte. Bu hücreler, her ne kadar ortak bazı özellikler sergileseler de immün modülasyon özellikleri, anti inflamatuvar etkileri, mitokondriyal etkinlikleri, farklılaşma kapasiteleri ve süresi hastaya ve hastalığa bağlı olarak tedaviye başlanmadan önce göz önünde bulundurulması gereken kriterler. Ayrıca hücre tedavisinin, hastalığın hangi evresinde kullanılması ve hangi dozlarda kaç kez verilmesi gerektiğinin bilinmesi de tedavinin optimum seviyeye ulaşması için önemli. Bununla birlikte aniden gelişen ve bir an önce tedavi edilmesi gereken iskemik inme, miyokard enfarktüsü gibi klinik durumların sonucunda daha önceden hazır bulunan hücrelerin allojeneik olarak uygulanması zamanlama açısından önemli bir avantaj sağlamakta. Bu bilgiler doğrultusunda konakçının bağışıklık hücrelerinden etkilemeyen, strese dayanıklı, farklı hücre tiplerine farklılaşabilen ve hasarlı bölgeye giderek oradaki yenilenme sürecine doğrudan katılabilen MUSE hücreleri gelecekte hücresel tedavinin önemli oyuncularından biri olacak gibi görünmekte.

Doku Mühendisliği

Ekin Baysal

Dokuların Endotel Öncüsü Hücrelerle Damarlandırılması.

Yeterli damar sistemi olmayan biyomühendislik ürünü ya da dondurulup çözülmüş dokunun *in vitro* ortamda kültüre edilebileceği en büyük kalınlık, hücrelerin çevreden difüzyonla oksijen, besin ve metabolit alışverişi rahatça yapabileceği kadardır; bu da yaklaşık 0,2 milimetredir. Aksi taktirde, hipoksik değişiklikler ve doku merkezinde nekroz meydana gelir. Alıcı organizmanın damarlarının büyüme hızıysa günde birkaç on mikrometreyi geçmez, bu da birkaç yüz mikrometre kalınlığında bir dokunun bile alıcı tarafından damarlanmasının haftaları bulacağı anlamına gelir. Ancak hasarlı organları onarabilmek, hatta yerine koyabilmek için daha büyük, üç boyutlu, karmaşık doku parçalarına gereksinim bulunmakta.



Endotel hücrelerinin tek işlevi dokuya kan ve metabolit taşıyan damarları döşemek değil. Embriyoda endotel hücreleriyle parankim hücreleri arasındaki sinyalleşmelerin organların gelişimi için gerekli olduğu ve yetişkinde endotel hücrelerin anjiyokrin (endotel hücresi kaynaklı olan ve organların gelişmesini uyaran biyomoleküller) faktörler üreterek kök hücre yenilenmesi ve organ rejenerasyonunu düzenlediği biliniyor. Bu nedenlerle, üretilen doku ve organların yeterince damarlandırılabilmesi rejeneratif teknolojilerin gelişimi açısından oldukça kritik öneme sahip.

Endotel hücreleri gibi **anjiyokrin faktörler** salıveren hücrelerle stromal hücrelerin birlikte kültüre edilmesi *de novo* damar gelişimini tetikleyerek prevaskülarize yapıların oluşumunu sağlıyor. Oluşan bu kılcal ağlar, alıcının damar sistemiyle anostomozlaşarak doku perfüzyonunu ve sonuçta dokunun canlılığının korunmasını sağlıyor. Mevcut damarlardan dokuya özgü olan olgun endotel hücresi izolasyonu invaziv girişimler gerektiriyor. Üstelik, tamamen farklılaşmış hücrelerin çoğalma potansiyeli daha düşük. Sitokin ve büyüme

faktörlerine daha az yanıt verdikleri için çevredeki parankim hücreleri ve damarlarla bütünleşmeleri daha zor.

Endotel öncüsü hücreler (EÖH) embriyodaki ilk damarların oluşumunu sağlamalarının yanı sıra yetişkin vücudunda hipoksi ve travma durumunda ortaya çıkan HIF1-α, VEGF, eritropoetin, östrojen, SDF1 gibi faktörlerle uyarılıyor ve kemik iliğinden dolaşıma çıkıyor, sitokin yoğunluğunu takip ederek hasarlı yere ulaşıyor, damarla bütünleşip yeni damar oluşumunu (postnatal vaskülogenez) sağlıyor. EÖH; kordon kanı, periferik kan ve uyarılmış pluripotent kök hücrelerden elde edilebiliyor. Damardan izole edilmiş olgun endotel hücrelerine benzer geçirgenlik değerlerine ve her tür doku endoteli hücresine farklılaşabilme potansiyeline sahipler. Üstelik çeşitli çalışmalarda damar ağları oluşturma konusunda damardan elde edilmiş olgun endotel hücrelerinden daha başarılı oldukları gösterildi. Bu alandaki çarpıcı gelişmelere rağmen endotel kaynağı olarak hangi hücrelerin kullanılacağı konusunda kesin bir kanı yok. Çünkü EÖH'lerle ilgili literatürde çelişkili veriler yer almakta.

1997 yılında **Asahara ve ark**. EÖH'leri ilk kez tanımlayarak kemik iliği kaynaklı $CD34^+$ hücreleri periferik kandan izole edip kronik iskemi modellerinde bu hücrelerin in vitro endotel fenotipi kazandığını ve in vivo damar oluşumuna katıldığını göstermişti [Asahara ve ak. Science 275: 964-967, 1997]. O zamandan bu yana EÖH'lerin diğer hücrelerden arındırılması için pek çok farklı yüzey antijeni belirteci kümeleri öne sürüldü (en yaygın kabul görüleni CD34/CD133/VEGFR2) [Can ve Dastouri, Endothelium: Molecular Aspects of Metabolic Disorders. CRC Press, Taylor & Francis Group 136-150, 2013], ancak hâlâ EÖH'leri daha saf halde ayrıştırabilmemizi sağlayan özgün bir belirteç bulunduğuna dair fikir birliği sağlanamadı. Çalışmalarda EÖH eldesi için farklı yüzey antijenlerinin kullanılması kuşkusuz, farklı gelişim aşamalarındaki hücre kümelerinin çalışılmasına neden olmakta.

EÖH'lerin dokudaki mikroçevresini oluşturup, sitokinlerle bu kök hücrelerin davranışını belirleyen damar nişleri olmadan damar ağları oluşturulamıyor. Kültür ortamı da her bir nişin farklı biyokimyasal ve biyofiziksel sinyal gereksinimleri göz önünde bulundurularak tasarlanıyor. VEGF-α ve FGF-β eklenmiş kültür ortamları; damar düz kas hücreleri ve fibroblastlar gibi stromal hücreler kullanılarak

EÖH'ler için in vivo vaskülojenik ve anjiyojenik süreçleri taklit eden in vitro modeller geliştirilebiliyor. Bugüne kadar adipoz stromal hücreler, dermal fibroblastlar, kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücreler, primer osteoblastlar, akciğer fibroblastları, safenöz damar düz kas hücreleri ve aort düz kas hücreleri kullanılarak damar nişleri oluşturulabildi [Peters E. Tissue Engineering Part B, Reviews. 24: 1-24, 2018]. Ancak, VEGF gibi anjiyojenik inisiyatörlerin kullanılması parankim öncüllerin de damar benzeri yapılara farklılaşmasına yol açabilir.

Kordon kanı kaynaklı EÖH'ler orta boy kan damarı endoteli fenotipine sahipken periferik kandan elde edilen EÖH'ler hem kan hem lenf damarı endoteli popülasyonu oluşturabiliyor. Ancak, EÖH'lerin arter, ven ve organa özgü damar endoteline özelleşmesinin moleküler temelleri henüz kapsamlı olarak bilinmiyor. Bu amaçla Nolan ve ark. yaptıkları çalışmayla karaciğer, kemik iliği, kalp, beyin, akciğer, dalak, böbrek, kas ve testis damar endotelinin özgün moleküler özelliklerini ortaya koyan veriler sağladı [Developmental Cell 26: 204-219, 2013]. Bulgularına göre her doku farklı anjiyokrin faktör kümesi ifade ediyordu ve organa özgü endotel farklılaşması ETS transkripsiyon faktör ailesi tarafından düzenleniyordu. Özellikle SFPI1, kemik iliği ve karaciğer damarlarında çok ifade edildiği için pencereli kesintisiz endotele farklılaşmayla ilişkiliydi.

EÖH'ler parankim hücreleriyle birlikte kültüre edilerek ve yönlendirilmiş farklılaşma ya da doğrudan programlamaya tabi tutularak dokuya özgü endotele farklılaştırılabiliyor. Boyer-Di Ponio ve ark. bir çalışmalarında astrositlerle birlikte kültüre edilen EÖH'lerin kan beyin bariyeri karekterinde düşük geçirgenlik ve yüksek sıkı ve ara bağlantı proteini ifadesi gibi özellikler kazandığını gözlemlemişti [PloS one. 9: e84179, 2014]. Aynı çalışmada EÖH'ler 50 ng/mL VEGF ile muamele edilince arter ilişkili gen ifadeleri (Ephrin-B2, DLL4, Notch 3, HES1, HEY1, HEY2) artmış ve arter fenotipi göstermişti. Lippmann ve ark.'nın yaptığı bir başka çalışmadaysa Wnt/B-catenin sinyal aktivasyonuyla uyarılmış pluripotent kök hücrelerden nöron öncüsü hücreler ve serebral mikrovasküler endotel hücreleri birlikte farklılaştırılmıştı [Nature Biotechnology 30: 783-791, 2012].

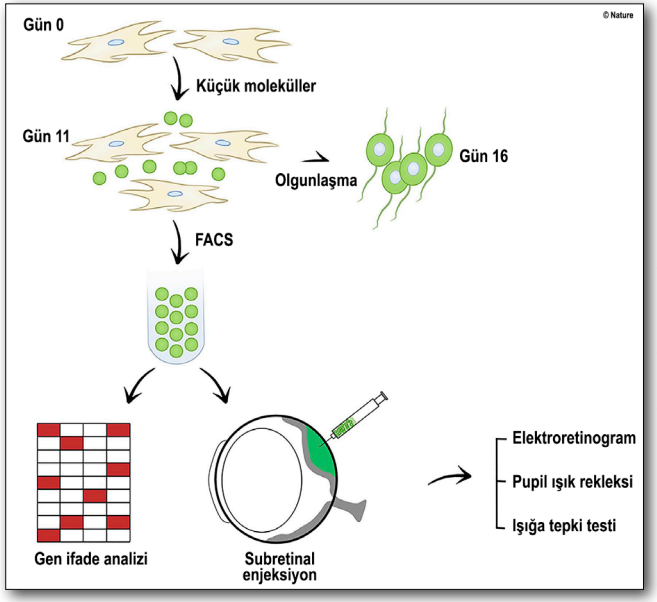
Özetle; kemik iliğinden kaynaklanan ya da indüklenerek elde edilen bu endotel öncüsü hücreleri organa özgü endotele sahip damar ağları oluşturmada kullanmak mümkün. EÖH'nin tanımlayıcısı olan biyomoleküler özelliklerinin ortaya konularak daha saf izolasyonu ve optimum kültür koşullarının sağlanması doku ve organ mühendisliği teknolojileri ve rejeneratif tedavilerin geliştirilebilmesi için önemli bir hedef.

Hücresel Tedavi ve Rejeneratif Tıp

Ezel Erkan

Fibroblastların Fotoreseptör Hücrelerine Programlanması ile Görme Geri Kazanılabilir!

Nature dergisinin Mayıs 2020 tarihinde yayınlanan sayısında **Mahato ve ark**. tarafından yapılan çalışmada [Nature May 581: 83-88, 2020] yaşa bağlı maküla dejenarasyonu ve gece körlüğü (retinitis pigmentoza) gibi ciddi ve kalıcı göz hastalıkları sonucunda oluşan retinopati sorunlarının sebep olduğu geri döndürülemez körlük için yeni bir tedavi yönteminin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmada fibroblastların kimyasal olarak yeniden programlanması ve bunun sonucunda bir fotoreseptör hücresi türü olan çubuk hücrelerine dönüştürülmesi amaçlanmıştır. Temel olarak fibroblastların nöron hücrelerine dönüştürülmesi için valproik asit, RepSox (TGF-β tip 1 reseptör inhibitörü), forskolin gibi moleküllerin kullanılması ile RORβ, ASCL1, PIAS3 gibi fotoreseptöre özgü transkripsiyon faktörlerinin düzeylerinin yükseldiği görülmüştür. Fotoreseptöre özgü transkripsiyon faktörlerinden ASCL1 bir nöron öncüsü transkripsiyon faktörü olup doğrudan yeniden programlama işleminde gliya hücrelerinin fotoreseptör hücrelere dönüştürme etkinliği oldukça belirgindir. Bu işlem bir inhibitör olan AXIN2'nin kullanılan kimyasal moleküllerle mitokondriyonlara geçmesi sonucunda reaktif oksijen türlerinin oluşmasıyla sağlanmaktadır. Olağan hücre sitoplazmasında inaktif halde bulunan NF-κB transkripsiyon faktörü aktive olur ve ASCL1'nin düzeyi artar.



Kimyasal olarak indüklenmiş fotoreseptör benzeri hücrelerin (CiPCs) elde edilmesi amacıyla transgenik Nrl–GFP fareden alınan embriyonik fibroblastlar kullanılmıştır. Nrl promotörü çubuk fotoreseptörlerine özelleşmiş olup eGFP ifadesi göstermektedir. CiPCs'lerin retina dejenerasyonunda model organizma olarak kullanılan rd1 türündeki farelerin gözlerindeki subretinal boşluğa transplantasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Transplantasyon üzerinden yaklaşık 4 hafta geçtikten sonra 14 adet rd1 fareden altısında düşük derecedeki ışıkta pupil yanıtı gözlemlenebilmiştir. Kimyasal olarak indüklenmiş fotoreseptör benzeri hücrelerin fonksiyonel olarak değerlendirilebilmesi için yapılmış olan elektroretinogram testleri sonucunda skotopik a ve b dalgalarına yanıt alınabilmiştir. Transplantasyon işleminin üzerinden üç ay geçtikten sonra CiPCs'lerde recoverin, rodopsin gibi fotoreseptöre özgü belirteçlerin ifade olduğu GFP proteinlerinin pozitif çıkmasıyla gözlemlenebilmiştir. Otx2, Crx ve Nrl gibi retinaya özgü transkripsiyon faktörlerinin de ifadelenmesi fotoreseptör hücrelerinin elde edilmiş olmasını kanıtlamıştır. Yapılmış olan kromatin analizlerinde fibroblasta özgü genlerin susturulmuş ve nöron belirteçlerininse ifadelenmeye başlaması doğrulanmıştır. Aynı zamanda gliya hücrelerinin fotoreseptör hücrelerine dönüşümünden sorumlu olan ASCL1'in indüklenmesi sonucunda da gliya belirteçlerinin aktive olmadığı görülmüştür. Yapılan immünflüoresan analizlerde beklenildiği gibi kimyasal olarak indüklenmiş fotoreseptör benzeri hücreler ile retinanın iç kısmında bulunan nöronlar arasında sinaptik bir iletişimin olduğunu ortaya koymuştur. Bütün bunlara ek olarak hücrede NF-κB indüklenmesinin sağlanması amacıyla lipopoli-

sakkarit, TNFα (tümör nekroz faktörü-α) ve mitokondriyal reaktif oksijen türleri kullanılmıştır. ROS birikmesini önlemek amacıyla antioksidan olarak MitoTEMPO kullanılmış ve 3 gün sonunda lusiferaz aktivitesinde düşüş gözlemlenmiştir. mROS'un NF-κB aktivasyonundan sorumlu olduğu (AXIN2 - NF-κB – ASCL1 yolağı) ve regülasyon bölgesine bağlanarak ASCL1 ekspresyonunu kontrol ettiği sonucuna varılmıştır.

Çalışmada uygulanmış olan doğrudan kimyasal yeniden programlamayla geri döndürülemez körlüklerin tedavisi için alternatif bir terapötik potansiyel yol geliştirilmiştir. Mitokondriyona yerleşen AXIN2'nin mROS üretme mekanizması her ne kadar tam olarak bilinmese de ve düşük bir dönüşüm verimliliği elde edilmiş olsa da yapılan çalışma görme onarımı için gelecek vadeden bir çalışmadır. Daha fazla CiPCs elde edilmesi için optimizasyon seçenekleri paylaşılmıştır. Çalışmada da söz edildiği üzere, ileride geliştirilebilecek olan yöntemlerle ASCL1 gibi güçlü transkripsiyon faktörlerinin hedef alınması ve çeşitli hücrelerin fotoreseptörlere kimyasal olarak yeniden programlanması ile retinadaki nöron kayıplarının tedavisi külfetli bir yol olan kök hücre tedavisine veya herhangi bir viral transkripsiyon faktörünün kullanılmasına gerek kalmadan sağlanabilecektir.

Teknik ve Uygulamalar

Alp Can

Çığır Açıcı bir Teknikle Artık Her bir Atom Tek Tek Görüntülenebiliyor!

Kriyo-elektron mikroskopi (kriyo-EM) çok önemli bir engeli aşarak proteinleri daha önce hiç görülmediği kadar detaylı olarak görünür kılıyor. Ezber bozan bu gelişmeyle bir proteini oluşturan atomlar ve moleküller ilk kez en keskin şekilde görüntülendi. Atomik ölçekte çözünürlük sağlayan kriyo-EM, bundan önce atom ve molekül düzeyinde en güçlü görüntüleme tekniği olan X-ışını kristalografiden artık çok daha üstün.

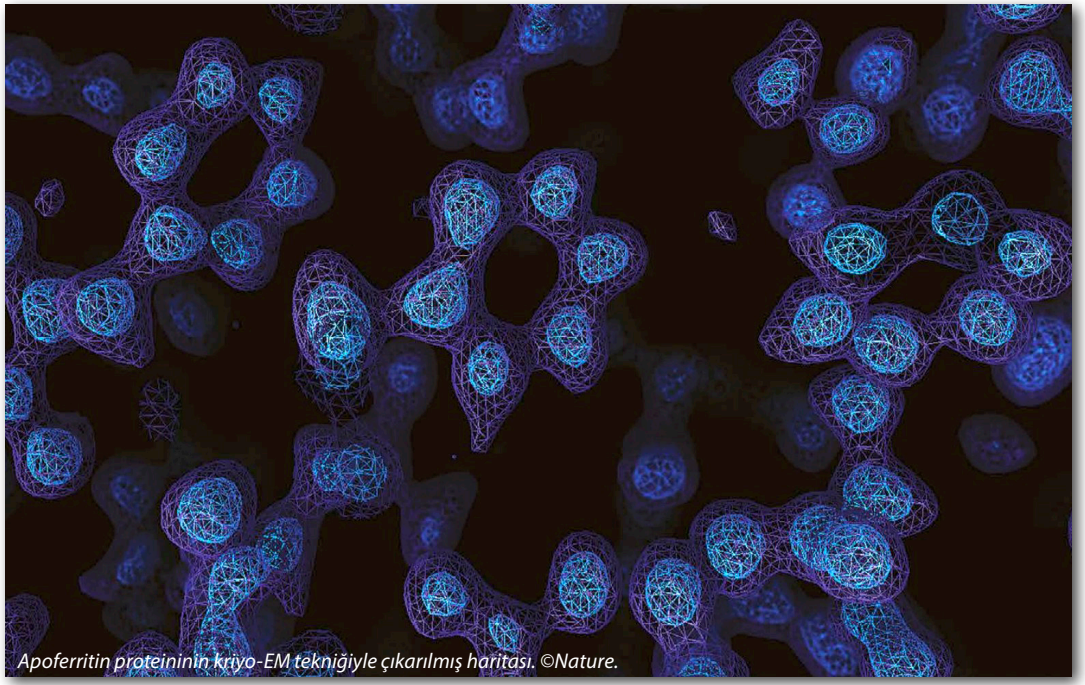
Geçtiğimiz ay iki ayrı laboratuvar tarafından rapor edilen bu çığır açıcı teknik proteinlerin üç boyutlu haritalanmasında makro molekül içindeki yerini göstererek molekül araştırmalarındaki ağırlığını çok ciddi oranda sağlamlaştırdı. Bu sayede araştırmacılar sağlıklı ve hastalıklı hücrelerde proteinlerin nasıl konumlandığı görerek daha etkin ve daha az yan etkisi olan ilaçları geliştirebilecekler.

Eş Zamanlı Yayınlandı!

Her ikisi de 22 Mayıs'ta bioRxiv sunucusunda yayınlanan birinci makalenin sorumlu yazarı olan ve Almanya-Göttingen'de bulunan Max Plack Enstitüsü, Biyofiziksel Kimya Bölümünden biyokimyacı ve elektron mikroskopist **Dr. Holger Stark** bu gelişmeyi "***kesinlikle devrim niteliğinde bir gelişme, artık bundan sonra daha fazla parçalayacak bir alt yapı bulunmuyor, bu ulaşılabilen son noktadır***" şeklinde ifade ediyor. Diğer çalışmaysa Cambridge'deki Tıbbi Araştırma Konseyi Moleküler Biyoloji Laboratuvarı'nda (MRC-LMB) yapısal biyologlar olan **Dr. Sjors Scheres** ve **Dr. Radu Aricescu** tarafından yayınlandı. Kanada'daki Toronto Üniversitesi'nde yapısal biyolog olarak göreve yapan John Rubinstein ise "***Gerçek 'atomik çözünürlük' gerçek bir kilometre taşıdır***" diye ekliyor. "***...ancak proteinlerin esnekliği nedeniyle pek çok proteinin atomik çözünürlükteki yapısını görüntülemek oldukça zor olacaktır***".

Sınırları Aşmak

Kriyo-EM, elektronları kullanarak hızla dondurulmuş örneklerin görüntülenmesinde kullanılan onlarca yıllık bir teknik. Yansıyan elektronları kaydetmede görüntü analizi yazılımındaki gelişmeler, 2013 yılında bir '**çözünürlük devrimini**' başlattı. Bu, her zamankinden daha keskin ve neredeyse X-ışını kristalografisinden elde edilenler kadar iyi olan protein yapılarının gözlenebilmesini sağladı. Adı geçen X-ışını kristalografisi protein kristallerinin X ışınları bombardımanına tutulduklarında yaptıkları kırınım modellerinden yapıları ortaya çıkaran eski bir teknik. Ardından gelen donanım ve yazılımdaki ilerlemeler, kriyo-EM yapılarının çözünürlüğünde belirgin gelişmelere yol açtı. Ancak bilim insanları, atomik çözünürlüklü yapılar elde etmek için büyük ölçüde X-ışını kristalografisine güvenmek zorunda kaldılar. Ancak, araştırmacılar bir proteinin kristalize olması için aylar ve hatta yıllar harcamaları gerekir ve tıbbi açıdan önemli birçok protein, kullanılabilir kristaller oluşturmaz. Oysa, kriyo-EM için proteinin saflaştırılmış bir çözelti içinde olmasını yeterli. Bu sayede ortaya çıkarılan atomik çözünürlük düzeyindeki protein haritaları, yaklaşık 1,2 Ångströms (Å) ($1{,}2 \times 10^{-10}$ m) çözünürlükte bir proteindeki tek bir atomun konumunu açık bir şekilde ayırt edebilmekte. Bu yapılar, enzimlerin nasıl çalıştığını anlamak ve bu etkinliklerini engelleyebilecek ilaçları belirlemek için çok faydalı olabilir.



Apoferritin proteininin kriyo-EM tekniğiyle çıkarılmış haritası. ©Nature.

Örnek Seçimi Çok Önemli...

Kriyo-EM'yi atomik çözünürlüğe ulaştırmak için iki ekip de, **apoferritin** adı verilen demir depolayan bir protein üzerinde çalıştı. Olağanüstü stabilitesi nedeniyle, bu protein kriyo-EM için harika bir örnekti ve ulaşılan 1,54 Å'luk çözünürlük proteinlerin yapısını ortaya koymada bir rekor olarak kayda geçti. Ekipler daha sonra apoferritinin daha net resimlerini çekmek için teknolojik iyileştirmeler kullandı.

Stark'ın ekibi, elektronların bir örneğe çarpmadan önce benzer hızlarda hareket etmesini sağlayan ve ortaya çıkan görüntülerin çözünürlüğünü artıran bir alet yardımıyla proteinin 1,25-Å yapısını elde etti. Scheres, Aricescu'nun ekibiyse, benzer hızlarda hareket eden elektronları harekete geçirmek için farklı bir teknoloji kullandılar; ayrıca, bazı elektronlar protein örneğinden uzaklaştıktan sonra ortaya çıkan gürültüyü azaltan bir teknolojiden ve daha hassas bir elektron algılama kamerasından yararlandılar.

Elde edilen 1.2 Å çözünürlüğündeki yapılarının eksiksiz olduğunu söylüyor Scheres. Öyle ki, hem proteinde hem de çevreleyen su moleküllerinde bağımsız hidrojen atomları seçilebiliyor. Stark, teknolojileri bir araya getirmenin çözünürlüğü yaklaşık 1 Å'e çekebileceğini düşünüyor - ama bundan ötesine değil. "***kriyo-EM ile 1 Å'nın altına inmek neredeyse imkansız***" diyor. Ekibi, mevcut son teknoloji ile böyle bir yapı elde etmenin birkaç yüz yıllık veri kaydı ve gerçekçi olmayan miktarda bilgi işlem gücü ve veri depolama kapasitesi gerektireceğini tahmin ediyor.

Kök Hücre E-Bülteni Sayı: 36 (Ekim-Kasım-Aralık 2020)

Üç ayda bir yayınlanır. www.kokhucrebulteni.com
Yayınlananların sorumluluğu yazarlarına aittir.
Editör: Prof.Dr. Alp Can (Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji AD.)

Bu sayıya katkıda bulunanlar; *(yazıların geliş sırasına göre)*
Dr. Hakan Coşkun (Harvard Üniversitesi, Boston, ABD)
Dr. Ekin Baysal (Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD, Ankara)
Ezel Erkan (Başkent Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Ankara)
Dr. Öğt. Üy. Duru Aras Tosun (Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD, Ankara)

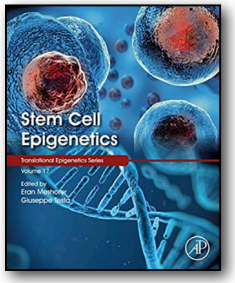
Yeni Çıkan Kitaplar

Duru Aras Tosun

STEM CELLS IN BIRTH DEFECTS RESEARCH and DEVELOPMENTAL TOXICITY

Editör: Theodore P. Rasmussen, Nisan 2018, Wiley Yayınevi.

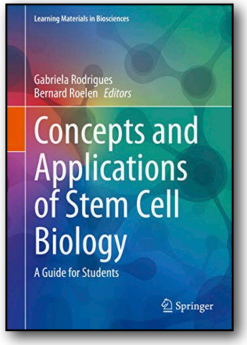
"Stem Cells in Birth Defects Research and Developmental Toxicology" gerek klinikte gerekse araştırma laboratuvarlarında konjenital anomaliler üzerine uzmanlaşmış bilim insanlarının ortak bir ürünü! Kadın doğum uzmanları, yenidoğan yoğun bakım hekimleri, hemşireleri ve hatta fizik tedavi uzmanlarının kök hücre araştırmacılarıyla yaptığı bu işbirliği, toksikoloji ve teratoloji alanlarında kök hücre araştırmalarının son durumunu tüm yönleriyle, tek bir kitapta sunuyor. Kitapta kök selopatiler ve teratoloji platformlarında tedaviye yönelik kök hücre yaklaşımları ele alınırken ilaç endüstrisine ve çevre ve güvenlik konusunda kök hücrelerin yeterliliğini sorgulayan otoritelere de yol gösterici bilgilere yer veriliyor.



STEM CELL EPIGENETICS

Editörler: Eran Meshorer, Giuseppe Testa, Ağustos 2020, Academic Press.

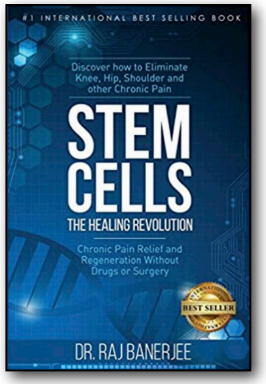
"Stem Cell Epigenetics"in 16. baskısında epigenetik mekanizmaların kök hücre farklılaşmasındaki rolü epigenetik ve yeniden programlama tekniklerine yapılan atıflarla güncel literatüre yer veriyor. Pluripotenside kromatin yapısı, yeniden programlamanın epigenetik regülasyonu, kök hücreler ve DNA metilasyonu, kök hücre farklılaşmasında histon modifikasyonları, hastalık modelleri ve epigenetik, pluripotent hücrelerden elde edilen organoidler, pluripotensi ve erken dönem farklılaşmada non-coding RNA'ların önemi, epigenetik kökenli hastalıklar bu kapsamda ele alınan başlıklardan yalnızca birkaçı... Kitapta ayrıca kök hücre epigenetiğinin yeni ilaçların keşfinde, rejeneratif tıpta ve çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılma potansiyeli detaylarıyla ele alınıyor. Yenilenen içeriğiyle "Stem Cell Epigenetics" konuya ilgi duyan araştırmacılara ve klinisyenlere bu son derece hızlı gelişen teknolojiyi kolaylıkla sahaya uygulayabilmeleri için ışık tutuyor.



CONCEPTS and APPLICATIONS of STEM CELL BILOOGY. A Guide for Students.

Editörler: Gabriela Rodrigues, Bernard AJ Roelen. Temmuz 2020, Springer.

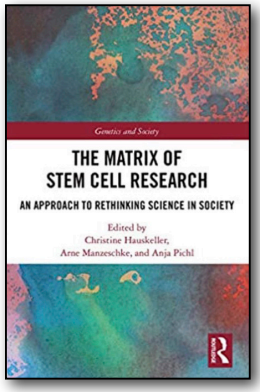
"Concepts and Applications of Stem Cell Biology: A Guide For Students" üniversite öğrencilerine kök hücrelerle ilgili geniş kesimlerce kabul gören yaygın bilgileri güncel bir perspektifle sunuyor. Kitapta amacına uygun olarak kök hücrelerle yeni tanışan genç bilim insanlarının anlayabileceği yalın bir dil kullanılıyor. Kitapta embriyonik kök hücreler, pluripotensi, epigenetik gibi temel kavramların yanı sıra, erişkin kök hücreler ve potansiyel kullanım alanları, nöral, mezenkimal ve musküler kök hücre tipleri ve bunların klinik ve deneysel uygulama alanları da tartışılıyor. Doku ve organ kültürleri gibi konulara da yer verilen bu kitap en az kök hücre biyolojisi kadar genç ve dinamik bir kitleye hitap ediyor!



STEM CELLS. THE HEALING REVOLUTION

Editör: Raj Banerjee, Ekim 2018, Bağımsız baskı.

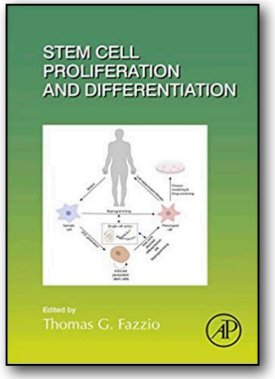
"Stem Cells - The Healing Revolution" yazarının deyimiyle "kök hücre mucizesini" halk dilinde anlatıyor. Kronik ağrıları olan hastalar için yeni bir umut olarak tanıtılan bu kitap "Ağrıdan ve hastalıklardan kurtulun! Hayatınızın kontrolünü elinize alın" sloganıyla çok satan kitaplar arasında yerini alıyor. Buna rağmen konu kök hücre olduğunda en basit sorunun dahi bilimsel bir karşılığı var! Kök hücre tedavileri güvenli midir? Bu tedavi yöntemiyle kesin sonuç alınır mı? Riskler nedir? Yazar Dr. Banerjee bu soruları yanıtlarken kök hücrelerin doğal olarak hasarlı hücrelerin yerini alışını bir devrime benzetiyor ve ekliyor: Kök hücreler her gün bedenimizin yeniden yapılanmasına yardım ediyor! Kemik, ligament ve tendonları onarıyor. Peki biz hastalıkların ve ağrının tedavisinde bu doğal mucizeden faydalanmak için neden daha cesur davranmıyoruz?



THE MATRIX of STEM CELL RESEARCH

Editörler: Christine Hauskeller, Arne Manzeschke, Anja Pichl, Temmuz 2019, Routledge Yayınevi.

"The Matrix of Stem Cell Research: An Approach to Rethinking Science in Society" gün geçtikçe daha fazla bilim dalını ilgilendiren kök hücre araştırmalarını bir de sosyoekonomik yönden irdeliyor. Gerek kök hücrelerin insan dokusu ve embriyolardan bağış yoluyla elde edilmesi, gerekse öncelikli kullanım alanlarının belirlenmesi açısından kök hücre tedavileri pek çok etik tartışmayı beraberinde getiriyor. Kök hücreler estetik ve plastik cerrahide kullanılmalı mı? Yanıklarda evet, protez tedavilerinde hayır mı? Bunun kararını kim vermeli? Peki ya kanserler? Her kök hücre tipi tüm tedaviler için uygun mu? Tedavilerin fiyatı neye göre belirlenmeli? Araştırma için ayrılan bütçeler bugün kimi gen tedavilerinde olduğu gibi kök hücre tedavilerine de yansıtılmalı mı? Büyüyen biyoekonomi ve artan etik kaygıların yarattığı tüm bu soruların cevapları bu kitapta derinlemesine tartışılıyor.

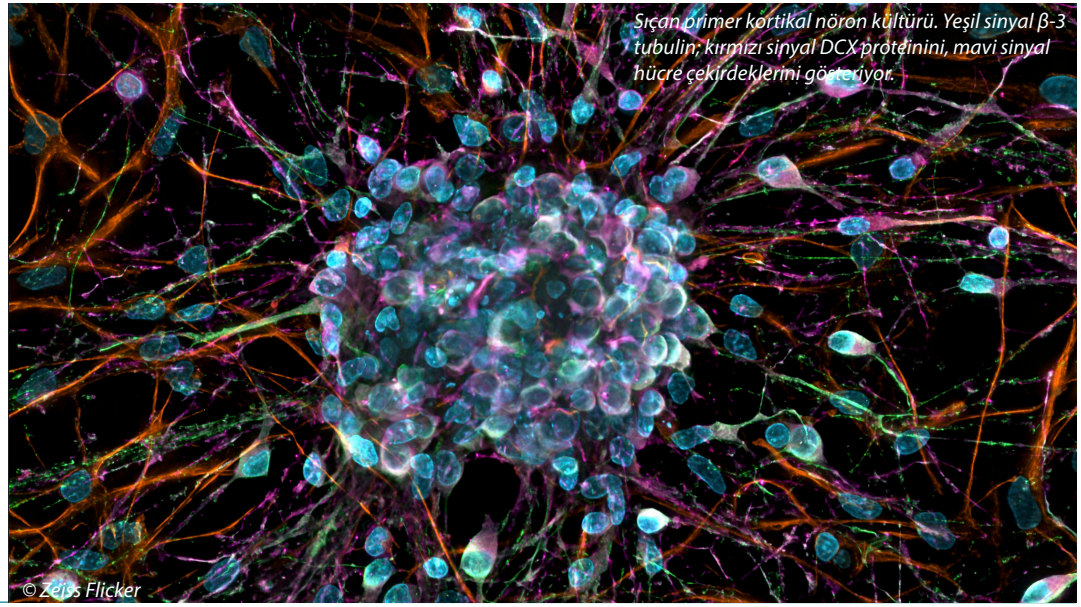


STEM CELL PROLIFERATION AND DIFFERENTIATION

Editör: Thomas G. Fazzio, Mart 2020, Academic Press.

"Current Topics in Developmental Biology" serisinin 138. sayısı. Her bir bölümü konusunda uzman yazarlar tarafından şekillendirilen kitap, başlığının ötesine geçiyor ve kök hücre proliferasyonu ve farklılaşmasının yanı sıra kromatin ağı, histon modifikasyonları ve epigenetik mekanizmaların kök hücre davranışlarındaki rolüne de ışık tutuyor. Alt başlıkları ve multidisipliner yazar kadrosuyla gerek klinikte gerekse laboratuvarda çalışan bilim insanlarının, öğrencilerin ve yeni bilginin peşinde koşan profesyonellerin yararlanacağı en güncel kaynaklardan biri olarak öne çıkıyor.

AYIN FOTOĞRAFI



Sıçan primer kortikal nöron kültürü. Yeşil sinyal β-3 tubulin; kırmızı sinyal DCX proteinini, mavi sinyal hücre çekirdeklerini gösteriyor.

© Zeiss Flicker