

İNSAN PERİFERİK KANINDAN ÇOK KÜÇÜK EMBRİYONİK (VSEL) KÖK HÜCRELERİN ELDE EDİLMESİ VE TANIMLANMASI

CHARACTERIZATION AND ISOLATION OF VERY SMALL EMBRYONIC-LIKE (VSEL) STEM CELLS OBTAINED FROM HUMAN PERIPHERAL BLOOD

Serap ERDEM KURUCA¹ , Dolay Damla ÇELİK¹ , Gülderen DEMİREL² , Dilşad ÖZERKAN³ 

¹İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

²Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İmmünoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

³Kastamonu Üniversitesi, Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, Kastamonu, Türkiye

ORCID IDs of the authors: S.E.K. 0000-0002-5566-7844; D.D.Ç. 0000-0002-7523-8465; G.D. 0000-0001-5775-491X; D.Ö. 0000-0002-0556-3879

Cite this article as: Erdem-Kuruca S, Celik DD, Demirel G, Ozerkan D. Characterization and isolation of very small embryonic-like (VSEL) stem cells obtained from human peripheral blood. J Ist Faculty Med 2019;82(2):96-106. doi: 10.26650/IUITFD.2018.0001

ÖZET

Amaç: Kök hücre (KH) nakli malin kan hastalıkları, kemik iliği yetmezlikleri ve doğumsal kan hastalıklarının tedavisinde kullanılan yöntemdir. Bu amaçla, periferik kan projenitör hücreleri (PKPH) oldukça fazla kullanılmaktadır. Son yıllarda insan embriyonik kök hücrelerinin sahip olduğu pluripotent özelliği bulunan yeni KH türü tanımlanmıştır. Çok küçük embriyonik benzeri (VSEL) kök hücreler olarak adlandırılan bu hücrelerin, yetişkin bireyde periferik kanda (PK) bulunduğu düşünülmektedir. Bu çalışmada VSEL kök hücrelerinin periferik kan kaynağı kullanarak elde edilmesi ve tanımlanması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Donörlerden alınan materyallerden lizis ve ficol gradient yöntemleri kullanılarak elde edilen mononükleer ve eritrosit katmanlarından, VSEL hücreleri izole edilmiştir. Flov sitometri ve immünfloresan boyama ile NANOG, OCT4, SSEA-4 ve CXCR-4 embriyonal kök hücre belirteçlerinin varlığı incelenmiştir. Western blot yöntemiyle ise, NANOG ve OCT4 proteinlerinin varlığı araştırılmıştır.

Bulgular: Flov sitometri sonuçlarına göre debris katmanında, VSEL belirteci taşıyan hücre sayısı CD45- popülasyonuna göre daha yüksek bulunmuştur. Elde edilen western ve immünfloresan sonuçlarına göre yüksek miktarda OCT4 ve NANOG ekspresyonu görülmüştür. Aynı zamanda bu proteinlerin hücre içinde hem sitoplazmada hem de çekirdekte bulunduğu gösterilmiştir.

Sonuç: Pluripotent kök hücre belirteci olarak bilinen bu proteinlerin yetişkin periferik kanında yüksek miktarda ekspresyonunun, farklılaşmış dokularda nasıl görev yaptığı sorusunu akllara getirmektedir. Bu bulgular; periferik kanda pluripotent belirteçler taşıyan yeni bir kök hücre popülasyonu bulunduğu tezini güçlendirmekte ve bu konuda yapılacak ileriye dönük klinik çalışmalar içinde temel oluşturmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Çok küçük embriyonik benzeri (VSEL) kök hücreler, Periferik kan, Pluripotent kök hücre markırları

ABSTRACT

Objective: Stem cell transplantation is considered to be one of the available treatments for malign or hereditary blood diseases and bone marrow failure. Peripheral blood progenitor cells (PBPC) are widely used for this technique. Recently a new type of stem cell with a pluripotent potential has been identified. These cells, called very small embryonic-like (VSEL) stem cells, are thought to be found in peripheral blood (PB) in adult individuals. The aim of this study was to obtain and identify VSEL stem cells using a peripheral blood source.

Material and Method: VSEL cells were isolated from mononuclear and erythrocyte layers obtained by using lysis and ficoll gradient methods from the materials taken from donors. The presence of NANOG, OCT4, SSEA-4 and CXCR-4 embryonal stem cell markers by flow cytometry and immunofluorescence staining was investigated. The presence of NANOG and OCT4 proteins was investigated using the Western blot method.

Results: According to the flow cytometry results, the number of cells carrying the VSEL marker was higher in the debris layer than in the CD45-population. Western and immunofluorescence results showed high levels of OCT4 and NANOG expression. It was also determined that these proteins are present in both the cytoplasm and the nucleus.

Conclusions: High expression of these proteins, known as pluripotent stem cell markers, in adult peripheral blood brings to mind the question of how they work in differentiated tissues. These findings strengthen the thesis of a new stem cell population that have pluripotent markers in peripheral blood and provide the basis for future clinical studies about this point.

Keywords: Very Small Embryonic-like (VSEL) stem cells, Peripheral blood, Pluripotent stem cell markers

İletişim kurulacak yazar/Corresponding author: sererdem@yahoo.com

Geliş tarihi/Received Date: 25.07.2018 • **Kabul tarihi/Accepted Date:** 16.01.2019

©Telif Hakkı 2019 J Ist Faculty Med - Makale metnine jmed.istanbul.edu.tr web sayfasından ulaşılabilir.

©Copyright 2019 by J Ist Faculty Med - Available online at jmed.istanbul.edu.tr

GİRİŞ

Günümüzde kök hücre nakli (KHN) rejeneratif tıpta önemli bir tedavi yöntemidir. KHN; lösemi, lenfoma gibi bazı malin kan hastalıkları ve kemik iliği yetmezlikleri ile doğumsal kan hastalıklarının tedavisinde sıklıkla başvuru hayat kurtarıcı yöntemlerden biridir. Kök hücreler çeşitli kaynaklardan elde edilir. Embriyonik kök hücreler yetişkin bireyin tüm hücre ve dokularını oluşturabilme kapasitesinden dolayı, geniş bir kullanım alanına sahipken, insan embriyonik kök hücrelerinin kullanımı dünyanın birçok ülkesinde çeşitli etik tartışmalar, allojenik kullanımındaki sorunlar ve teratoma riski nedeniyle sınırlandırılmıştır. Kök hücre nakillerinde bu yüzden kemik iliği, periferik kan progenitör hücreleri (PKPH) ve kordon kanı gibi hematopoetik kök hücre (HKH) kaynakları tercih edilmektedir (1). Bu kaynaklardan elde edilen kök hücrelerin hematopoetik rejenerasyonu sağlayabilmesi için ağırlıklı olarak pluripotent potansiyeli olan kök hücreler olması gerekmektedir (2).

Son yıllarda insan embriyonik kök hücrelerinin pluripotent karakterine sahip ve organizmada tüm yaşam boyunca var olan yeni bir kök hücre türü tanımlanmıştır (3). Çok küçük embriyonik benzeri kök hücreler (Very small embryonic-like stem cells - VSEL) olarak adlandırılan bu hücrelerin, yetişkin bireyde şimdilik kemik iliği, kordon kanı ve periferik kanda bulunduğu gösterilmiştir (4). Bu hücrelerin izolasyon işlemi esnasında mononükleer tabakanın dışında eritrosit katmanında bulunduğu için kaybedildiği iddia edilmektedir. PKPH gibi kök hücre kaynaklarının pluripotent kök hücre sayısını artırarak niteliğini iyileştirmek ve yetişkinlerde de kullanılabilme potansiyelini artırmak konusundaki çalışmaların, bu materyalin kullanım sınırlarını genişleteceği düşünülmektedir.

VSEL kök hücreler, ilk olarak 2006 yılında Zuba-Surma ve arkadaşları tarafından tanımlanan yeni bir kök hücre türüdür. Oldukça yeni keşfedilmiş olmaları nedeniyle, haklarında bilinenler son derece kısıtlıdır. Şimdiye kadar yapılan çalışmaların çoğunun fareler üzerinde yapılmış olması da, insandaki durumları hakkında bize yeterince bilgi verememektedir (5). Bu yüzden, bu çalışmada periferik kan kullanılarak VSEL kök hücrelerinin insandaki varlığının belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla periferik kan fikal ile santrifüj edildikten sonra hem mononükleer hem de eritrosit katmanındaki hücrelerin VSEL karakterizasyonu yapılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamıza katılan bireylere gönüllü onam formları imzalatılmıştır. Çalışmaya dahil edilen örnekler İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 20.06.2013 tarih'li 724 no'lu izni ile kullanılmıştır. Çalışmaya Sağlıklı 18 yaş ve üstü donörler dahil edilmiştir. Bunun aksine, kronik bir hastalığı olan, son 1 ay içerisinde enfeksiyon geçirmiş ve sigara kullanan donörler çalışmaya dahil etmemiştir. İzolasyon ve karakterizasyon yöntemleri canlı hücrelerde çalışmayı gerektirdiği için alınan kanlar bekletilmeden aynı gün içinde çalışılmıştır.

Hücre İzolasyonları

Fikal ile Hücre İzolasyonu

Fikal-gradient santrifüj yöntemi sıklıkla kullanılan ve kan hücrelerini çeşitli katmanlara ayırmaya yarayan bir yöntemdir (6). Kan fikal üzerine yayıldıktan sonra santrifüj edilir ve 4 katman halinde hücreler ayrılmış olur. İlk baştaki katmanda (1. katman) trombositler, sonraki katmanda (2. katman) ince bir çizgi halinde mononükleer hücreler (MNH), ardından 3. katmandaki fikalda bulunan nötrofiller ve en son olarak yoğunluklarından dolayı en altta bulunan eritrositler (4. Katman) olarak sıralanır. Bu izolasyon yönteminde, mononükleer hücreler fikal ile ayrılarak, hem MNH katmanında hemde eritrosit katmanında VSEL saflaştırılmıştır. Alınan materyal 1:1 oranında PBS (phosphate-buffered saline) ile dilüe edilmiştir. Sonrasında solüsyon 1:2 oranında Ficoll-Hypaque (BioWest Lymphosep 1.077 g/mL) solüsyonu üzerine eklenerek 2000 rpm'de 30 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda oluşan 4 katmanın 2.si (MNH) ve 4.sü (eritrosit) ayrı tüplere aktarılmıştır. 2. Katmana 1:3 oranında RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) eklenerek dilüe edildikten sonra 2000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant dökülerek kalan pellet RPMI ile yeniden süspanse edilmiştir. Daha sonra eritrositlerin bol miktarda bulunduğu 4.katman aynı şekilde dilüe edilerek daha yüksek bir hızda (2690 rpm 15 dk) santrifüj edilmiştir. Bunun nedeni, VSEL kök hücrelerinin boyut olarak eritrositlere yakın olmasıdır. Ortalama eritrosit boyutu ~7-8 µm iken VSEL kök hücrelerinin boyutu yaklaşık 5-6 µm'dir. Böylece eritrositlerin dibe çökmesi sağlanarak süpernatant yeni bir tüpe aktarılmış ve 3000 rpm 10 dk santrifüj edilmiştir. Tekrar süpernatant atıldıktan sonra dipteki pellet RPMI ile süspanse edilmiştir. Bu süspanسیون VSEL hücrelerinin bulunduğu bilinen katmandır (5. katman) (7). Elde edilen her katmandan yayma preparat hazırlanmıştır. Kullanılmayan pelletler protein izolasyonu için -20'de saklanmıştır.

Eritrosit Lizisi ile İzolasyon

VSEL izolasyonu için kullanılan diğer yöntem, eritrosit lizisidir. Fikal yöntemi ile çok fazla hücre kaybı oluşurken, bu yöntemde hücre kaybının daha az olduğu düşünülmektedir (8). Bu nedenle çalışmada 2 yöntem birlikte kullanılmıştır. Tüm materyal eritrositleri parçalayan (amonyum klorür) tamponlu çözelti ile 1:5 oranında karıştırılarak 15 dk oda ısısında bekletildikten sonra 2000 rpm'de 10'dk santrifüj edilerek üst katman toplanmıştır. Eritrositler tamamen uzaklaşınca kadar bu işlem tekrarlanmıştır. Daha sonra PBS ile 2000 rpmde 10 dk yıkama yapılarak, süpernatant atılmış ve dipteki pellet RPMI ile süspanse edilmiştir. Yayma preparat yapıldıktan sonra kullanılmayan pellet -20'de saklanmıştır.

Flow Sitometri Ölçümleri

Floresan ışıkların birbirine karışmaması için 4 ayrı tüpte, 4 farklı antikora bakılmıştır. Kullanılan antikolar SSEA-4 (evre-spesifik embriyonik antijen 4) (Santa Cruz), PE anti-human CD45 (BioLegend), FITC anti-human CD34 (BioLegend), NANOG (Nanog homeobox) (Santa Cruz), CXCR-4 (C-X-C motif kemokin reseptör 4) (Santa Cruz), OCT 3/4 (major octamer-bağlayıcı protein) (Santa Cruz); sekonder antikolar ise, Goat anti-mouse IgG-TR* (Santa Cruz), Donkey anti-goat IgG-FITC* (Santa Cruz) dir.

Flov sitometrik ölçümler sadece eritrosit lizisi yapılmış hücre grubuna uygulanmıştır. Lizis yapılmış hücreler 1×10^6 /ml hücre olacak şekilde PBS ile sulandırılmıştır. Her bir flov tüpüne 100 µl hücre süspansiyonu konulmuştur. Tüpte 1 µg olacak şekilde primer antikolar eklenerek, 30 dakika karanlıkta bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda tüplere 500 µl PBS eklenip, 2000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant atılarak 100'er µl PBS eklenmiştir. Primer antikolar ile uyumlu olan sekonder antikolar her tüpte 0,5 – 1 µg arasında olacak şekilde eklenmiş ve karanlıkta 30 dk inkübasyona bırakılmıştır. PBS ile yıkanarak, süpernatant atılmıştır. Her tüpe yaklaşık 500 µl flov solüsyonu konarak ölçüm yapılmıştır.

VSEL hücrelerinde literatüre göre CD45 belirteçinin negatif olduğunu, CD34'ün ise pozitif olduğu gösterilmiştir (9). Bu bilgi doğrultusunda; 1. tüpte CD45-/CD34+/SSEA-4+ hücreleri, 2. tüpte CD45-/NANOG+, 3. tüpte CD45-/CXCR-4+ ve 4. tüpte CD45-/OCT-3/4+ olan hücreler kapılanarak incelenmiştir. Aynı zamanda, VSEL hücrelerinin mononükleer hücrelere göre daha küçük olduğu için debris kısmında da bulunabileceği belirtildiğinden dolayı, debrisden de kapı alınarak aynı ölçümler gerçekleştirilmiştir.

İmmünfloresan Boyama

Hazırlanan yayma preparatlar %96'lık etanolde fikse edilmiştir. PBS ile 3 kere yıkama yapılmıştır. Hücre permeabilizasyonu için, %0,1'lik triton X-100 2 ml PBS içinde hazırlanarak 15 dk buzda inkübe edilmiş ve 3 kere PBS ile yıkanarak, her yıkamada 3'er dakika bekletilmiştir. Bloking tamponunda (%2'lik BSA (bovine serum albumin) ve %0,3'luk triton X-100) 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. 3x3 dk PBS ile yıkama yapılmıştır. Primer antikor 1:1000 oranında bloking solüsyonunda dilue edilerek hazırlanmıştır. +4°C'de tüm gece inkübasyona bırakılmış ve ertesi gün PBS ile 5x5 dk yıkama yapılmıştır. 1:1000 oranında dilue edilen sekonder antikor ile 1 saat karanlıkta bekletilmiş ve tekrar PBS ile 5x5dk yıkama yapılmıştır. 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Santa Cruz Biotechnology sc-3598) ile boyama yapılmış ve floresan mikroskopunda incelenmiştir. Floresan mikroskopu için kullanılan antikolar, flov sitometride kullanılanlar ile aynı antikordardır. Liste Tablo 1'de gösterilmektedir.

Western Blot Yöntemi ile Spesifik Proteinlerin Karakterizasyonu

Çalışılan proteinler NANOG ve OCT4'dür. Kontrol olarak β-aktin kullanılmıştır. Örnekler 2000 rpm'de 10 dk santrifüj yapılarak, süpernatantları atılmıştır. Hücre Lizis Tamponu (1:10 EDTA/Tris-HCl, %0,5 Triton X-100) hazırlanmış ve 10 ml stok hücre lizis tamponunu içine, PMSF (Phenylmethylsulfonyl Fluoride proteaz inhibitörü) stoktan 10 µl eklenmiştir. Hücre pelletlerinin üzerine 100 µl lizis tamponu eklenerek, 30-60 dk buzda inkübe edilmiş ve 14.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir.

Protein Tayini (Bradford Testi)

BSA'dan (1,46mg/ml dsu) seri dilüsyonlar yapılarak 5 tane standart elde edilmiştir. Hücre lizis örnekleri kullanılmıştır.

Tablo 1: İmmünfloresan preparatlar ve antikolar

Kaynak Adı	Hücre Grubu	Antikolar		
		1.Preperat	2.Preperat	3.Preperat
Periferik Kan	MNH Katman Preperatı	SSEA-4-TR	NANOG-FITC	OCT4-FITC
		CXCR4- FITC	CD45-PE	CD45-PE
		CD45-PE	DAPI	DAPI
Periferik Kan	5. Katman Preperatı	SSEA-4-TR	NANOG-FITC	OCT4-FITC
		CXCR4- FITC	CD45-PE	CD45-PE
		CD45-PE	DAPI	DAPI
Periferik Kan	Lizis Preperatı	SSEA-4-TR	NANOG-FITC	OCT4-FITC
		CXCR4- FITC	CD45-PE	CD45-PE
		CD45-PE	DAPI	DAPI

96'lık mikrotiplere 10 µl örnek 200 µl Bradford belirteci 3 tekrarlı şekilde eklenmiştir. 5 dk inkübasyona bırakılmıştır. Spektrofotometrede 560-590 nm arasında okunmuştur. Standartların ölçülen absorbansları kullanılarak standart grafiği oluşturulmuş, örneklerin absorbansları bu grafikte yerine konularak protein miktarları saptanmıştır.

Çalışmada %12'lik akrilamid içeren ayırma jeli ve %5'lik yükleme jeli kullanılmıştır. 2x Laemli Örnek Tamponu (Laemli Sample Buffer) ile örnekler 1:1 oranında karıştırılmış ve içine %5 oranında β-merkaptoetanol eklenmiştir. Protein denatürasyonu için 80°C'de 15 dk inkübe edilerek, hemen buza alınmış, örnekler 20 µl olacak şekilde jele yüklenmiş ve 130 V'da 45 dk yürütülmüştür. PVDF membran kullanılarak, membran filtre kağıdı ve jel sistemi hazırlanmış ve 350 mA'de 60 dk blotlama yapılmıştır.

Membranda Spesifik Proteinin İşaretlenmesi

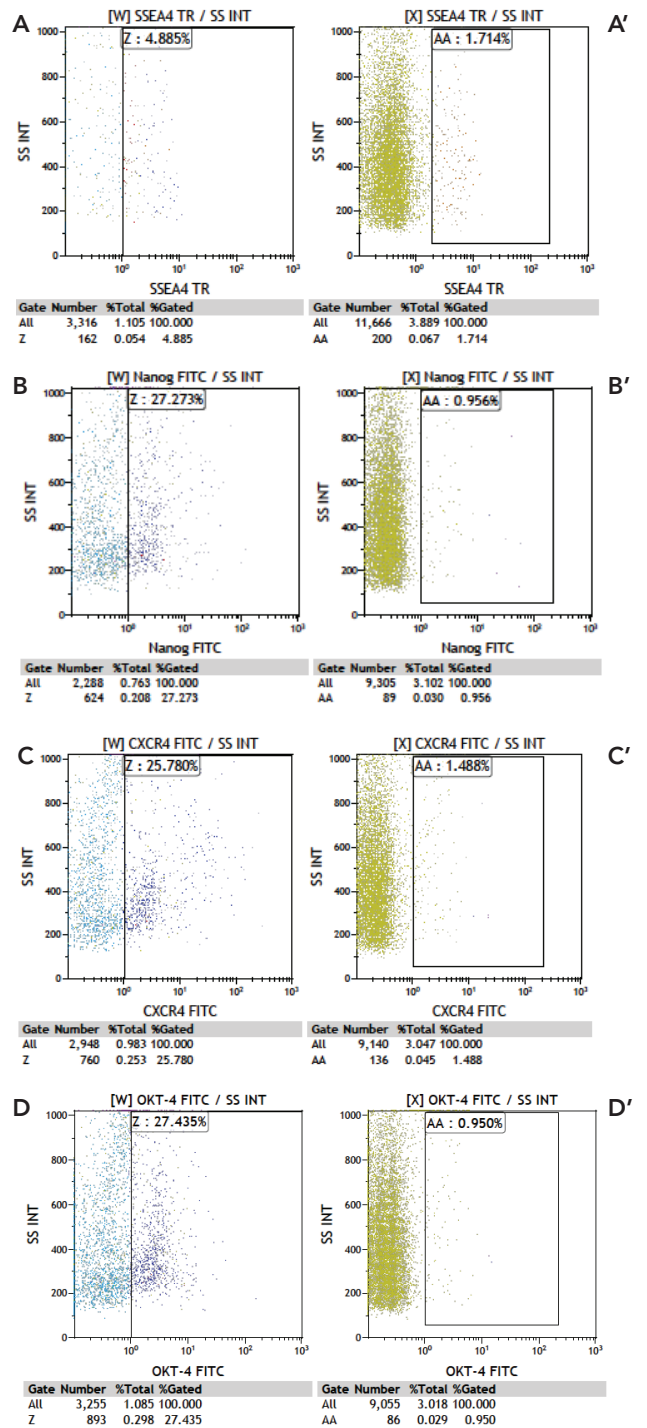
TBST (50 mM Tris-Cl, pH 8,0, 150 mM NaCl, %0,1 Tween-20) içinde %5'lik süt tozu bloking solüsyonu olarak kullanılmış ve membran bu solüsyonda 1 saat boyunca, çalkalayıcıda inkübasyona bırakılmıştır. Bloking bitince yıkama solüsyonu olan TBST'de 3 kere 5'er dakikalık çalkalayıcıda yıkama yapılmıştır. Primer antikor bloking solüsyonunda istenen oranda sulandırılarak hazırlanarak, gece boyu +4°C'de çalkalayıcıda bırakılmıştır. İnkübasyon bitince 3'er kez 5'er dakikalık TBST ile yıkama yapılmıştır. Sekonder antikor, alkalın fosfataz (AP) konjuge olarak seçilmiştir. Sekonder antikorda istenilen oranda %5'lik süt tozu solüsyonunda dilue edilerek, 1 saat çalkalayıcıda, oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Kullanılan antikor ve dilüsyonları sırasıyla NANOG (1:1000), OCT-4(1:1000), β-actin (1:1000), Donkey anti-goat IgG-AP (1:10000) şeklindedir.

Görüntüleme

Sekonder antikor AP ile konjuge olarak seçildiğinden AP substratı olan Novex AP Chromogenic Substrat ile görüntüleme yapılmıştır. Sekonder antikordan sonra 3'er kez 5'er dakikalık TBST ile yıkama yapılmış ve distile su ile 2 dk daha membran çalkalayıcıda çalkalandıktan sonra Novex Substrat konulmuştur. İstenen görüntü elde edilince distile su ile reaksiyon durdurulmuştur. Membran kurutularak, bilgisayarda taranmıştır.

İstatistiksel Analiz

Çalışmada Graphpad Prism5 (La Jolla, Amerika) programı kullanılmıştır. Flov sonuçlarında kapılardaki antikorların kendi içlerinde anlamlılığı 'one-way ANOVA' testi ile, kapılar arasındaki antikorların anlamlılıkları ise "two-way ANOVA" testi ile yapılmıştır. Western sonuçlarında antikorların her birinin katmanlardaki değerleri "one-way ANOVA" testi ile bakılmıştır. İki antikorun katmanlar arasındaki anlamlılıkları ise "two-way ANOVA" testi ile incelenmiştir. Anlamlılık değeri p<0,05 olan sonuçlar anlamlı kabul edilmiştir.



Şekil 1: Periferik kanda VSEL belirteçlerinin flow sitometri ile gösterilmesi. A) Debris popülasyonunda, SSEA-4 pozitif hücreler A') CD45- popülasyonunda, SSEA-4 pozitif hücreler B) Debris popülasyonunda, NANOG pozitif hücreler B') CD45- popülasyonunda, SSEA-4 pozitif hücreler C) Debris popülasyonunda, CXCR4 pozitif hücreler C') CD45- popülasyonunda, CXCR4 pozitif hücreler D) Debris popülasyonunda, OCT3/4 pozitif hücreler D') CD45- popülasyonunda, OCT3/4 pozitif hücreler görülmektedir.

BULGULAR

Flow Sitometri ile Kapılama ve Hücre Sayımı

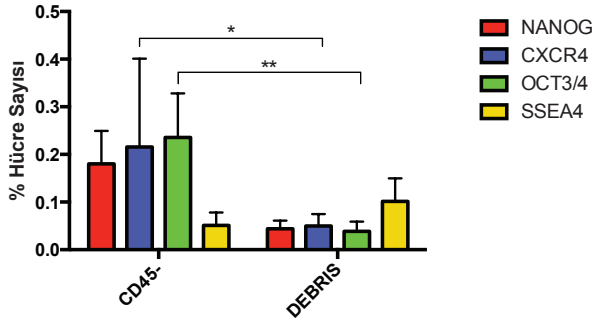
Flow sitometride iki farklı kapılama yapılarak, hücreler üzerindeki VSEL belirteçlerinin varlığına ve sayısına bakılmıştır. İlk kapılama CD45- hücreler (CD45 soluk hücreler de dahil) üzerinden yapılmıştır. Bu grubun içindeki NANOG, CXCR4, OCT3/4 ve SSEA-4 pozitif hücre sayısı belirlenmiştir. İkinci kapılama debris kısmı üzerinden yapılmıştır. Bu kısımda da aynı belirteçler incelenmiştir.

Şekil 1’de alınan bir periferik kan örneğinin flow sonuçları verilmektedir.

Elde edilen sayıların yüzde olarak ortalamaları Tablo 2’de gösterilmektedir. Her iki kapılamadaki antikorların kendi aralarındaki korelansı anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). Debris ve CD45- popülasyonunda CXCR4 ve OCT3/4 antikorlarının farklılığının anlamlı olduğu gösterilmiştir ($p < 0,05$). İki grubun ortalamalarının karşılaştırılması Şekil 2’de gösterilmektedir.

Tablo 2. Flow sitometri ile sayılan hücrelerin (%) ortalamaları.

	%NANOG	%CXCR4	%OCT3/4	%SSEA-4	P Değeri
CD45-	0,180	0,215	0,235	0,05	0,0172
DEBRİS	0,044	0,049	0,038	0,101	0,0076

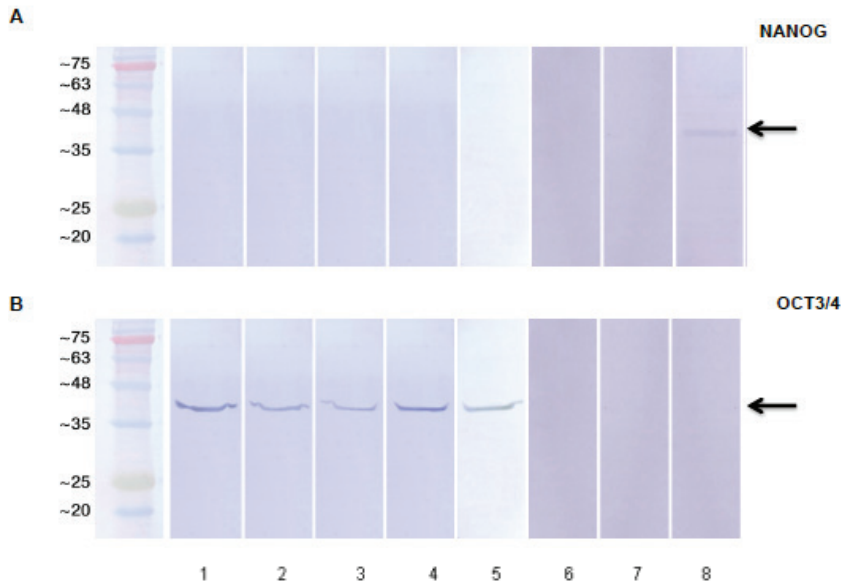


Şekil 2: Periferik kandan eritrosit lizisi ile elde edilen hücrelerde flow sitometride CD45- popülasyonunda ve debris-de VSEL belirteçleri (NANOG, CXCR4, OCT3/4, SSEA-4). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Western Blot Yöntemi ile VSEL Proteinlerinin Tayini

Alınan 8 periferik kanın incelenen katmanlarında (lizis, MNC ve 5. katman) western blot yöntemi ile OCT3/4 ve NANOG proteinlerinin varlığı araştırılmıştır. Şekil 3’de lizis katmanında, NANOG 40 kDa ağırlığında sadece 1 örnekte pozitif iken diğerlerinde tespit edilemedi. OCT3/4 proteini ise 33 kDa düzeyinde 5 örnekte pozitif bulundu.

Şekil 4’de MNC katmanında NANOG 40 kDa düzeyinde sadece 3 örnekte pozitif iken diğerlerinde tespit edilemedi. Aynı örneklerde 25 kDa düzeyinde ekstra ladder şeklinde bantlar görülmüştür. OCT3/4 proteini ise 33 kDa düzeyinde 5 örnekte pozitif bulunmuştur.

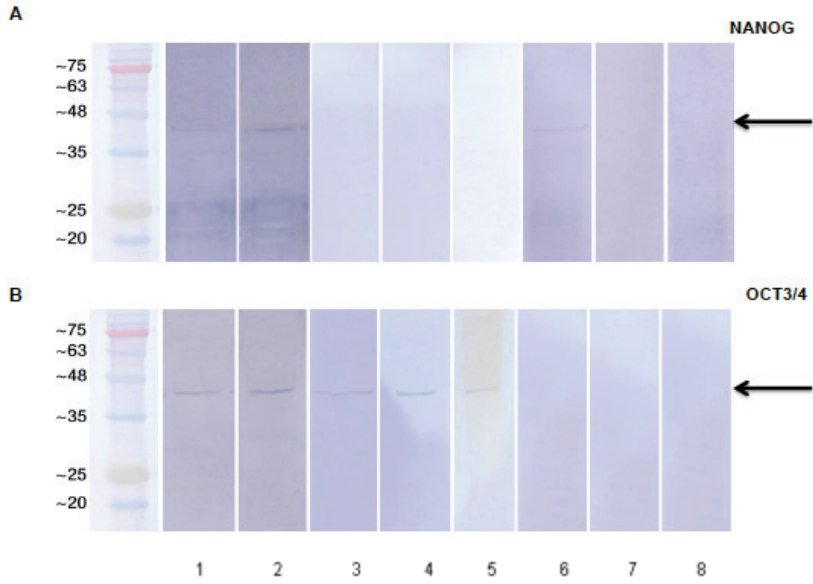


Şekil 3: Periferik kan lizis katmanında, VSEL belirteçlerinin protein düzeylerinin western blot ile gösterilmesi A) NANOG proteinin varlığı B) OCT3/4 proteinin varlığı

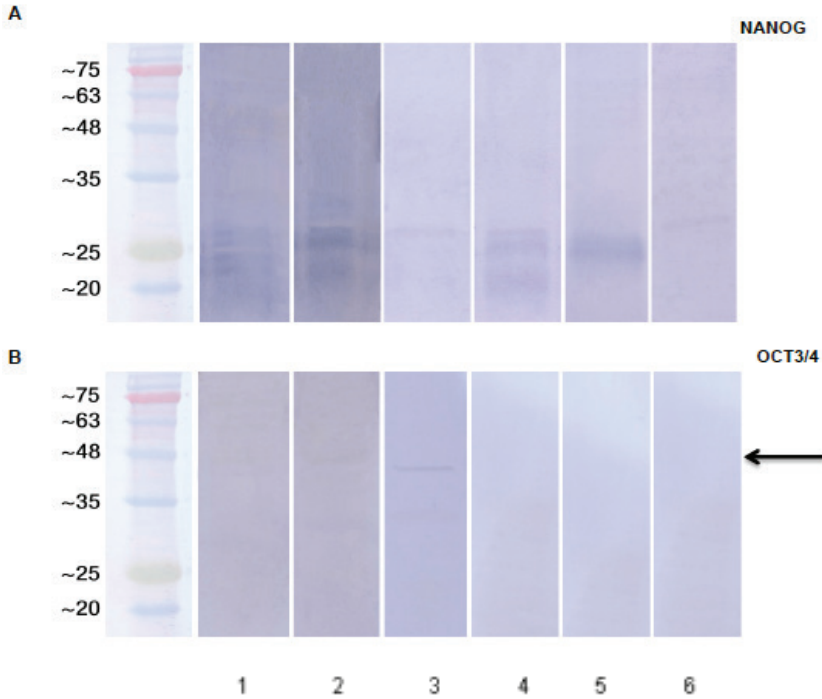
Şekil 5'de 5. katman hücrelerinde bulunan bantlar gösterilmektedir. NANOG 25 kDa düzeyinde tüm örneklerde ladder şeklinde bantlar tespit edilmiştir. OCT3/4 proteini 33 kDa düzeyinde 1 örnekte pozitif bulunmuştur.

VSEL Belirteçlerinin İmmüno Floresan Boyamalar ile Gösterilmesi

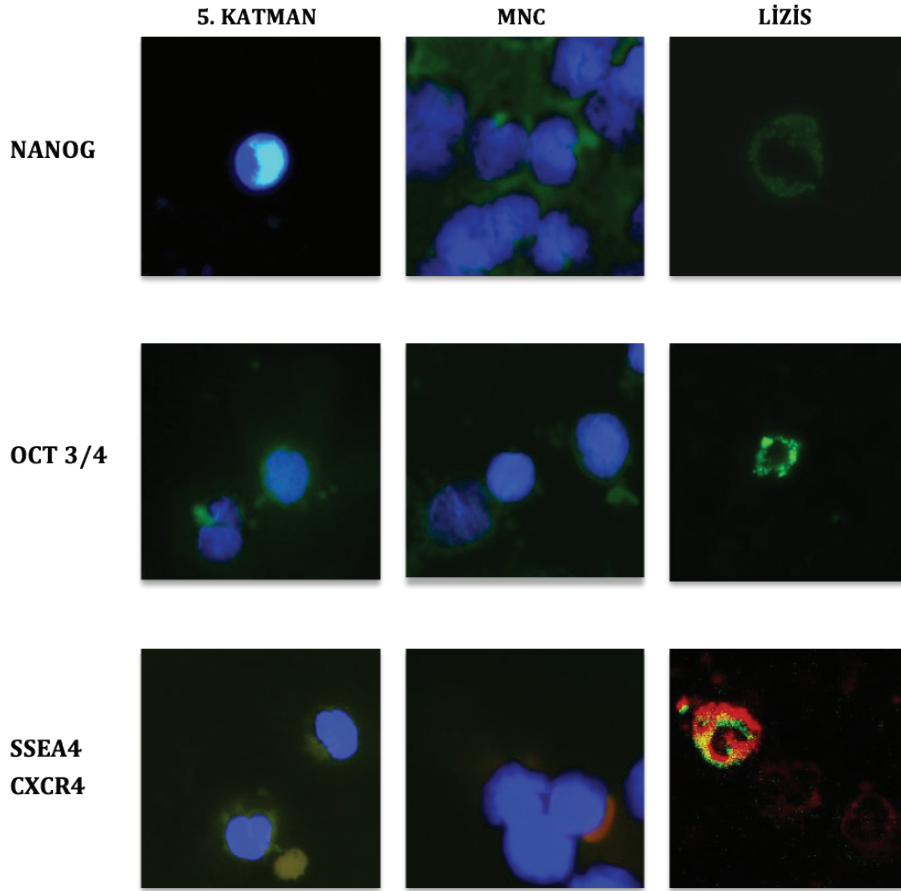
Şekil 6'da, 3 hücre katmanında da yapılan immüno floresan boyamalar gösterilmektedir.



Şekil 4: Periferik kan MNC katmanında, VSEL belirteçlerinin protein düzeylerinin western blot ile gösterilmesi A) NANOG proteinin varlığı B) OCT3/4 proteinin varlığı



Şekil 5: Periferik kan 5. Katman hücrelerinde, VSEL belirteçlerinin protein düzeylerinin western blot ile gösterilmesi A) NANOG proteinin varlığı B) OCT3/4 proteinin varlığı



Şekil 6: Periferik kandan izole edilen üç farklı hücre katmanında VSEL belirteçlerinin (NANOG, OCT3/4, SSEA-4, CXCR4) immünofloresan ile gösterilmesi. Satırlarda kullanılan antikorlar, sütunlarda ise hücre katmanları göstermektedir. DAPI nükleusu boyayarak mavi floresan vermektedir. VSEL belirteçlerinin pozitifliği ise, NANOG, OCT3/4 ve CXCR4 için yeşil floresan ile, SSEA-4 için ise kırmızı floresan ile gösterilmiştir.

TARTIŞMA

HKH'lerin transplantasyonda kullanım oranının yüksek olması, rejenerasyonu sağlamada daha başarılı olmalarından kaynaklanmaktadır. Bu özellikten plastitenin sorumlu olduğu düşünülmekteydi (10). Bunun nedeninin kemik iliğinde bulunan, henüz tanımlanmamış, hematopoetik olmayan, primitif bir hücre grubu olabileceği ileri sürülmüştür (11, 12). VSEL kavramı da bu hipotez doğrultusunda ortaya çıkmıştır. Yüksek nükleus/sitoplazma oranına sahip, boyutları 4-6 µm olan, EKH belirteçlerini sentezleyen ve dormansi halde bir grup kök hücrenin kemik iliğinde varlığı gösterilmiştir. Bu hücrelerin boyutlarının küçük olması nedeniyle 'Çok Küçük Embryonik Benzeri Kök Hücreler (VSELsc)' olarak tanımlanmıştır (3). Günümüzde halen bu hücrelerin varlığı, pluripotent kapasiteleri ve kendilerini yenileyebilir oluşları, *in vitro/vivo* çoğalması bir tartışma konusu halindedir (13-15).

Şimdiye kadar yapılan çalışmalar, bu hücreleri tanımlamak ve fonksiyonlarını anlayabilmek amaçlı yapılmış olmakla beraber

genellikle fare çalışmalarıdır. Son yıllarda insan materyalinde VSEL çalışmaları artırılarak, farelerdeki VSEL kök hücreleriyle benzerlikleri ve farklılıkları araştırılmaktadır (16, 17).

Kucia ve arkadaşlarının (2006) yaptıkları çalışma VSEL kavramı için öncü niteliği taşımaktadır. Flov sitometri ile buldukları sonuçlara göre; fare PK'sında Sca-1⁺/Lin⁻/CD45⁻ olan hücre miktarı 160 hücre/ml (yani total beyaz kan hücrelerinin %0,0016) iken mobilize olmuş PK'da 800 hücre/ml'dir (yani total beyaz kan hücrelerinin %0,0035'i). Aynı zamanda Oct4, NANOG gibi transkripsiyon faktörlerinin mobilize kanda ekspresyonunun arttığını, mRNA düzeylerine göre hesaplamışlardır. İmmüno Floresan boyama ile, nükleusta Oct4 ve NANOG ekspresyonunu göstermişlerdir. Bu hücrelerin sadece PKH belirteçlerini ifade etmediklerini aynı zamanda 3 germ tabakasına da farklılaştığını göstermek için hücreleri kültür yaptıklarında farklılaştıklarını gözlemlemişlerdir. İzole edilen VSEL hücreleri kardiyomyosit, nöral hücreler ve pankreatik hücrelere benzer kümeler oluşturmuşlardır (3, 5). Başka bir ça-

İşmada ise, insan kordon kanından 3 grup olmak üzere lin⁻/CD45/CXCR4⁺, lin⁻/CD45/CD34⁺, lin⁻/CD45/CD133⁺ hücreleri izole etmişlerdir. Bu hücre gruplarının total kordon kanı hücrelerinde sırasıyla %0,037, %0,118 ve %0,018 oranında olduğunu göstermişlerdir. Aynı zamanda bu grupları FACS ile izole ederek, yüksek miktarda Oct4 ve NANOG mRNA düzeyleri elde etmişler ve immüno floresan ile de hücre yüzeyinde SSEA-4, nükleusda Oct4 ve NANOG varlığını belirlemişlerdir (18). Bu makalelerin ışığında, bu çalışmada insan periferik kanında flov sitometri ile VSEL varlığı araştırılmıştır. PK hücrelerinde CD45-gruptan sırasıyla %0,18 NANOG, %0,215 CXCR4, %0,235 Oct4 ve %0,05 SSEA-4 pozitif bulunmuştur. CD45-/Debris grubundan %0,044 NANOG, %0,049 CXCR4, %0,038 Oct4 ve %0,101 SSEA-4 pozitifliği gösterilmiştir (n=8).

Bhartiya ve arkadaşları (2012), VSEL hücrelerinin boyutlarını göz önüne alarak VSEL izolasyonu için bu çalışmada kullanılan yöntemi belirtmişlerdir. 5. Katmandaki hücrelerin Oct4 ve NANOG ifade ettiğini hatta MNH katmanındaki hücrelere oranla bu transkripsiyon faktörlerinin daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. Oct4'un HKH'lerde sitoplazmada, VSEL'lerde ise çekirdekte olduğunu, SSEA4 unda hücre yüzeyinde VSEL'lerde pozitif olduğunu göstermişlerdir. Bu sonuçların ışığında VSEL hücrelerinin MNH katmanı dışındaki eritrosit katmanında daha fazla bulunduğunu ve bundan dolayı kordon kanı saklanırken, sadece MNH hücrelerinin dondurulduğu ve bu alt katman olan kısmın dahil edilmediği için VSEL hücrelerinin atılmış olduğunu ileri sürmüşlerdir (7). Bu araştırmaya benzer şekilde, bu çalışmada 5. ve MNH katmanları izole edilerek, bu katmanlardaki VSEL kıyaslaması için western blot yöntemi kullanılmıştır. Western blot yöntemi VSEL çalışmalarında bu güne kadar hiç kullanılmamış bir yöntemdir. Genellikle çalışmalar mRNA miktarını gösteren RT-PCR üzerinden yapılmıştır. Fakat RT-PCR genellikle western ile de doğrulama gerektiren bir yöntemdir. Çünkü RT-PCR ile bakılan mRNA düzeyi, her ne kadar bir proteinin bilgisini transkripsiyonal düzeyde verse de, proteine dönüşen miktar hakkında bir şey söylememektedir. mRNA'dan protein sentezi sırasında yanlış, eksik veya sentezlenmeyen proteinler olabilmektedir. Bu yüzden sonuçlara göre, lizis ve MNC katmanında Oct4 varlığı gösterilirken; 5. Katmanda varlığı gösterilememiştir. 5. Katman çok az miktarda hücreden oluşmaktadır ve bu da western blot için gerekli olan total protein miktarını genel olarak sağlayamamasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Özellikle PKH belirteci olan bir transkripsiyon faktörü Oct4'nin varlığı gösterilmiştir. Bu çalışmada bulunan sonuçlara benzer şekilde, PK MNH'lerinde Oct4 varlığını PCR, Western blot ve immüno floresan yöntemlerle gösterilmiş ve Oct4'un saf bir pluripotent kök hücre belirteci olup olmadığının tartışmalı bir konu olabileceğine değinilmiştir (19). Fakat başka bir çalışmada, Oct4 izoformları incelenerek Oct4'un yapısını anlayama yönelik önemli bilgiler elde edilmiştir (20). Oct4 varlığı hücrenin farklılaşmasını engellemektedir. Oct4 baskılanınca hücre

farklılaşmaya başlar. Ayrıca, Oct4 POU domain ailesinin bir üyesidir ve insanda Oct4A ve Oct4B izoformları olmak üzere 2 formu bulunmaktadır (21). Oct4 mRNA'sı 3 bölümden oluşmaktadır. N-terminal kısmı, POU DNA bağlanma bölgesi ve C-terminal kısmı. Oct4A ve Oct4B mRNA'larının POU ve C-terminal kısmı aynı olmasına rağmen N-terminal kısımları farklıdır. Oct4B N-terminal kısmında yaklaşık 95 amino asitlik bir eksik bulunmaktadır. Bu eksiklik Oct4B izoformunun DNA ya bağlanma yeteneğini inhibe etmektedir. Bunun aksine Oct4A DNA'ya bağlanabilmekte ve pluripotensiyi koruyabilmektedir. Aynı zamanda embriyonik hücre hatlarında iki izoformda bulunmasına rağmen Oct4A miktarı, Oct4B miktarına oranla oldukça yüksek olarak gösterilmiştir. Ayrıca, Oct4A çekirdekte, Oct4B ise sitoplazmada lokalize olmaktadır (20). Liedtke ve arkadaşları (2007), Oct4 varlığını PK ve kordon kanı MNH'lerinde RT-PCR ile gösterirken primer seçiminin çok önemli olduğunu, yanlış primer seçimi ile Oct4A ile Oct4B izoformlarının birbirine karıştırılabileceğini (22); Zangrossi ve ark. (2007) ise bulduklarının aslında Oct4B izoformu olduğunu bildirmişlerdir (19). Daha sonraki çalışmalarda bazı kanserli hücre hatlarında ve HKH'lerde Oct4B izoformunun varlığı gösterilmiştir (23-26). Bu çalışmada, Oct4 varlığının Oct4B izoformu olduğu düşünülmektedir. İmmüno floresan görüntülerde bu kanıyı desteklemektedir. Ayrıca yapılan immüno floresan boyamalarda Oct3/4'un sitoplazmik lokasyona sahip olduğu görülmektedir. Western blot sonuçlarıyla beraber ele alınınca PK'da Oct4B izoformunun yüksek miktarda ifade edildiğini söylemenin yanlış olmayacağı düşünülmektedir. Fakat yapılan izolasyon işlemleriyle miktarının azaldığı gözlenmiştir. Fikol ile ayrılan katmanlarda Oct4 ifadesinin azaldığı veya yok olduğu görülmüştür. Bu da fikolün hücre kaybına neden olduğunu doğrulamaktadır. Veya MNC katmanı dışında kalan bir hücre gurubunun daha Oct4B ifade ettiğini göstermektedir. Oct4B izoformunun tam olarak görevi, hangi hücrelerde bulunduğu, Oct4A ile olan etkileşimlerinin ne olduğu bilinmemektedir. Bu henüz aydınlatılmamış bir konu olarak durmakta ve daha kapsamlı araştırmalar gerektirmektedir.

NANOG; Oct4 ve Sox2 genleriyle iş birliği halinde hücrenin pluripotent özelliğinin sürdürülmesini sağlar, miktarı azaldığında pluripotansiyel özellik azalır. Bu çalışmada, NANOG ekspresyonu gösterilmiştir. Fakat NANOG antikorumun birden fazla bant verdiği ve tahmin edilen kDa'dan farklı noktalarda da bantlar oluşturduğu da görülmüştür. Bu NANOG'un çabuk degrade olduğunu, post translasyonel modifikasyonlara uğrayarak bu şekilde bir bant dizisi verdiğini düşündürmektedir (27). PK'da varlığının tartışmalı olması, NANOG'un saf bir kök hücre belirteci olup olmadığını düşündürmektedir. NANOG proteinin 11 tane psödogeni olduğunu gösterilmiştir. NANOGP1 ve NANOGP8 dışında geri kalan NANOGP2, NANOGP3, NANOGP4, NANOGP5, NANOGP6, NANOGP7, NANOGP9, NANOGP10 ve NANOGP11 psödogenler eksik intronları, okuma çerçevesi içinde stop kodunu bulundurması veya

okuma çerçevelerinin kayması gibi nedenlerle protein üretemektedirler. NANOGP1 ise duplike psödodendir. NANOG ile çok benzer ekson-intron organizasyonuna sahiptir ve fiziksel olarak da birbirlerine bağlıdır. Sekans dizimi %97 NANOG ile aynıdır. Fakat NANOGP1 dizisindeki bir nükleotidin değişimi ile dizinin başlarında stop kodonu oluşmaktadır. Dolayısıyla mRNA'sı düzgün bir protein kodlayamamaktadır. NANOGP8 okuma çerçevesine sahip olan ve fonksiyonel olabileceği düşünülen psödodendir (28). Farelerde yapılan bir çalışmada, NANOG proteini western blot ile incelendiğinde, antikorun kolaylıkta fragmente olup bir merdiven (ladder) şeklinde bant görüntüsü verdiği; bununda proteinin sürekli turnover geçirmesi nedeniyle olabileceği savunulmuştur. Ayrıca NANOG'un çekirdekte lokalize olduğu gösterilmiştir (29). İnsan embriyonik kök hücreleri, neonatal fibroblastlar, HeLa hücreleri (servikal kanser hücreleri), SH-SY5Y (nöroblastoma hücreleri), ve insan mezenşimal kök hücreleri embriyonik NANOG ifade ederken; erişkin fibroblastlar, HUVEC hücreleri (endotel hücreleri), total kalp dokusu ve insan düz kas hücrelerinin sadece NANOGP8 ifade ettiği gösterilmiştir. Aynı zamanda farklı hücre tiplerinde NANOG proteininin farklı hücrel lokalizasyonuna sahip olduğu belirlenmiştir. NANOG yada NANOGP8 ifade etmelerinin lokalizasyon açısından anlamlı bir farkı olmadığı, iki formunda farklı hücrelerde sitoplazmik yada nükleik olabileceği ve lokalizasyonun hücre tipine göre değiştiği gözlemlenmiştir. NANOG proteininin birden fazla bant vermesinin post translasyonel modifikasyonlardan kaynaklanabileceği de savunulmuştur (27). Farelerde NANOG proteininin 3 adet varyantı olduğu saptanmıştır. Alternatif bölünme ile 3 farklı NANOG proteininin oluştuğu ve 3 varyantında kendini yenileyemeyi koruyabildiği gösterilmiştir. Aynı zamanda bu farklı varyantların farklı kDa'a sahip olduğundan, ladder formuna b varyantların sebep olabileceği belirtilmiştir. Ayrıca, NANOG isoformlarının sitoplazmada bulunduğu gösterilmiştir (30). İnsan servikal kanser hücrelerinde (SCC) de, NANOG varlığı sitoplazmik olarak gösterilmiş; NANOG hücrel lokalizasyonun hücre tipine ve kanserin safhasına göre değiştiği bildirilmiştir (31). Tüm bu çalışmaların ışığında, bu çalışmanın sonuçları karşılaştırıldığında, NANOG proteininin periferik kanda bulunduğu söylenebilir. NANOG proteininin bir ladder oluşturduğu gözlemlendiğinde, western blot için optimize etmesi zor bir antikor olduğunu düşünülmüştür. Ayrıca, belirli katmanlarda farklı ağırlıkta bantlar görülmekte; bu da NANOG proteininin farklı hücre gruplarında farklı post translasyonel modifikasyonlara uğrayabileceğini göstermektedir. Aynı zamanda farklı NANOG varyantlarında, farklı hücre gruplarında bulunabileceğini ortaya çıkartmaktadır. Bunlar hakkında kesin kaniye varabilmek için ayrıca gen düzeyinde PCR gibi ilave testlerle de gösterilmesi gerekmektedir. Bu çalışmada, lizis katmanında bir ekspresyon görülmezken, MNC katmanında NANOG ifade edilmektedir. 5. Katmanda ise 27 kDa yakınlarında bir bant grubu gözlemlenmiştir. Normal NANOG bantından çok aşağılarda böyle bir ban-

tın olması, belki NANOG proteinin fragmente olarak böyle bantlar vermiş olabileceğini düşündürmektedir. Genel olarak 5. Katmanda protein miktarının çok az olması hücre grubu hakkında yorum yapmayı kısıtlı bir alana itmektedir.

Yapılan immünfloresan boyama ile özellikle sitoplazmada tüm katmanlarda NANOG saptanmıştır. Şimdiye kadar NANOG varlığı embriyonik kök hücrelerde, primordiyal germ hücrelerinde, insan germ hücre tümörlerinde, mezenşimal kök hücrelerde, testis kanserinde, meme kansinomalarda, fetal testisde, malin servikal epital hücrelerinde ve erişkin insan fibroblastlarında gösterilmiştir (31-35). NANOG proteininin başka hangi hücrelerde olduğu veya psödogeni olan NANOGP8'in nasıl bir etki yarattığını bilinmemektedir. Sitoplazmik yada nükleik olmasının nasıl bir değişikliğe veya fonksiyona neden olduğunu, hangi mekanizmalarla sitoplazmik NANOG oluştuğuna dair bir bilgi de bulunmamaktadır. Bu konuda daha ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak, 5. Katmanda Bhartiya ve ekibinin gösterdiği derecede yüksek pluripotent özellikte, rejenerasyon kapasitesi yüksek yeterli miktarda hücre grubuna rastlanmamıştır. 5. Katmanda pluripotent özellik gösteren hücreler var olsa da, yeterli miktarda ve sayıda bulunmadıkları ve transplantasyon başarısını arttıracabilecek düzeyde olamayacakları düşünülmektedir. Lizis ve MNC katmanları ele alınırsa, fikal kullanımının hücre miktarını azalttığı ve hücre kaybına neden olduğu da gösterilmiştir. VSEL hücrelerini ve hematopoetik kök hücrelerinin korunması ve materyaldeki bütün değerlendirilmek isteniyorsa fikal kullanımı sınırlandırılmalıdır.

VSEL hücrelerinin varlığı ve miktarı hakkında western blot ile kesin olarak bir yargıya varmak pek mümkün görünmemektedir. Bunun nedeni, kullanılan pluripotent belirteçlerin çeşitli izoformlarının olması ve bu izoformların western blot ile birbirinden ayırt edilememesidir. Flov sonuçlarına göre bakıldığında pluripotent belirteçleri taşıyan hücre miktarı Zuba-Surma ve arkadaşlarının gösterdiği gibi debris kısmında daha fazla görünmektedir. Bu hücrelerin küçük olmaları debrisle karışmalarına ve bu yüzden gözden kaçmalarına neden olmaktadır. VSEL hücrelerinin karakterlerinin tam olarak anlaşılabilmesi için daha fazla araştırma yapılmalıdır. Bu hücrelerin kendini yenileyebilme kapasitesi, buldukları dokular ve işlevlerinin anlaşılması sonunda klinik kullanım potansiyellerinin de yolu açılacaktır.

Teşekkür: Periferik kan materyalinin sağlanmasında yardımcı olan İstanbul Üniversitesi Kan merkezi yönetimine ve çalışanlarına teşekkür ederiz.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için etik komite onayı, İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan (20.06.2013 tarih ve 724 no) alınmıştır.

Bilgilendirilmiş Onam: Katılımcılardan bilgilendirilmiş onam alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Çalışma Konsepti/Tasarım- S.E.K., G.D.; Veri Toplama- S.E.K., D.D.Ç.; Veri Analizi/Yorumlama-S.E.K., G.D., D.D.Ç., D.Ö.; Yazı Taslağı- D.D.Ç., D.Ö.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- D.Ö.; Son Onay ve Sorumluluk- S.E.K., D.Ö., D.D.Ç., G.D.; Malzeme ve Teknik Destek- G.D.; Süpervizyon- G.D.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP) tarafından desteklenmiştir (Proje kodu: 35553).

Acknowledgement: Thanks to Istanbul University Blood Center managers and workers for their help with the peripheral blood materials.

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval was received for this study from the ethics committee of Istanbul Faculty of Medicine.

Informed Consent: Written consent was obtained from the participants.

Peer Review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Conception/Design of Study- S.E.K., G.D.; Data Acquisition- S.E.K, D.D.Ç.; Data Analysis/Interpretation- S.E.K, G.D., D.D.Ç., D.Ö.; Drafting Manuscript- D.D.Ç., D.Ö.; Critical Revision of Manuscript- D.Ö.; Final Approval and Accountability- S.E.K., D.Ö., D.D.Ç., G.D.; Technical or Material Support- G.D.; Supervision- G.D.

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

Financial Disclosure: This study was supported by Istanbul University Scientific Research Projects Unit (BAP) (Project code: 35553).

KAYNAKLAR

1. Kucia M, Reza R, Campbell FR, Zuba-Surma E, Majka M, Ratajczak J. et al, A population of very embryonic-like (VSEL) CXCR4+ SSEA-1+ Oct-4+ stem cells identified in adult bone marrow. *Leukemia* 2006;20:857-69. [CrossRef]
2. Zuba-Surma EK, Kucia M, Ratajczak J, Ratajczak MZ. "Small stem cells" in adult tissues: Very small embryonic-like stem cells (VSELs) Stand up. *Cytometry* 2009;75(1):4-13. [CrossRef]
3. Kucia M, Wysoczynski M, Wu W, Zuba-Surma EK, Ratajczak J, Ratajczak MZ. Evidence that very small embryonic-like stem cells are mobilized into peripheral blood. *Stem Cells* 2008;26:2083-92. [CrossRef]
4. Loos H, Blok-Schut B, Van Doorn R, Hoksbergen R, Riviere AB, Meerhof L. A method for the recognition and separation of human blood monocytes on density gradient. *Blood* 1976;48:731-42.
5. Bhartiya D, Shaikh A, Nagvenkar P, Kasiviswanathan S, Pethe Prasad, Pawani H, et al. Very small embryonic-like stem cells with maximum regenerative potential get discarded during cord blood banking and bone marrow processing for autologous stem cell therapy. *Stem Cells Dev* 2012;21(1):1-6. [CrossRef]
6. Chang Y, Tien K, Wen C, Hsieh T, Hwang S. Recovery of CD45(-)/Lin(-)/SSEA-4(+) very small embryonic-like stem cells by cord blood bank standard operating procedures. *Cytotherapy* 2014;16(4):560-5. [CrossRef]
7. Sovalat H, Scrofani M, Eidsenchen A, Pasquet S, Rimelen V, Henon P. Identification and isolation from either adult human bone marrow or G-CSF-mobilized peripheral blood of CD34+/CD133+/CXCR4+/ Lin-CD45- cells, featuring morphological, molecular, and phenotypic characteristics of very small embryonic-like (VSEL) stem cells. *Exp Hematol* 2011;39:495-505. [CrossRef]
8. Ratajczak MZ, Zuba-Surma E, Wojakowski W, Kucia M, Ratajczak J. Bone marrow – Home of versatile stem cells. *Transfus Med Hemother* 2008;35:248-59. [CrossRef]
9. Kucia M, Ratajczak J, Ratajczak MZ. Are bone marrow stem cells plastic or heterogenous – That is the question. *Exp Hematol* 2005;33:613-23. [CrossRef]
10. Ratajczak MZ, Zuba-Surma E, Wojakowski W, Suszynska M, Liu R, Ratajczak J, et al. Very small embryonic-like stem cells (VSELs) represent a real challenge in stem cell biology: recent pros and cons in the midst of a lively debate. *Leukemia* 2014;28:473-84. [CrossRef]
11. Parker GC. Very small embryonic-like stem cells: A scientific debate? *Stem Cells Dev* 2014;23(7):687-8. [CrossRef]
12. Kassmer SH, Krause DS. Very small embryonic-like stem cells: Biology and function of these potential endogenous pluripotent stem cells in adult tissues. *Mol Reprod Dev* 2013;80:677-90. [CrossRef]
13. Heider A, Danova-Alt R, Egger D, Cross M, Alt R. Murine and human very small embryonic-like cells: A perspective. *Cytometry* 2012;83A:72-5. [CrossRef]
14. Kucia M, Halasa M, Wysoczynski M, Baskiewicz-Masiuk M, Moldenhawer S, Zuba-Surma E. et al. Morphological and molecular characterization of novel population of CXCR4+/SSEA-4+/Oct-4+ very small embryonic-like cells purified from human cord blood – preliminary report. *Leukemia* 2007;21:297-303. [CrossRef]
15. Zangrossi S, Marabese M, Brogginini M, Giordano R, D'Erasmus M, Montelatici E. et al. Oct-4 expression in adult human differentiated cells challenges its role as a pure stem cell marker. *Stem Cells* 2007;25:1675-80. [CrossRef]
16. Lee J, Kim HK, Rho J, Han Y, Kim J. Human Oct4 isoforms differ in their ability to confer self-renewal. *J Biol Chem* 2006;281:33554-65. [CrossRef]
17. Kaufmann G, Liebaers I, Steirteghem AV, Velde HVD. POU5F1 isoforms show different expression patterns in human embryonic stem cells and preimplantation embryos. *Stem Cells* 2006;24:2685-91. [CrossRef]
18. Liedtke S, Enczmann J, Walclawczyk S, Wernet P, Kögler G. Oct4 and its pseudogenes confuse stem cell research. *Cell Stem Cell* 2007;1:364-6. [CrossRef]
19. Tai M, Chang C, Olson LK, Trosko JE. Oct4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2005;26(2):495-502. [CrossRef]

20. Atlasi Y, Mowla SJ, Ziaee SAM, Gokhale PJ, Andrews PW. OCT4 spliced variants are differentially expressed in human pluripotent and nonpluripotent cells. *Stem Cells* 2008; 26:3068-74. [\[CrossRef\]](#)
21. Redshaw Z, Strain A. Human hemotopoietic stem cells express Oct4 pseudogenes and lack the ability to initiate Oct4 promoter-driven gene expression. *J Negat Results Biomed* 2010;9(1):2. [\[CrossRef\]](#)
22. Ambady S, Malcuit C, Kashpur O, Kole D, Holmes WF, Hedblom E. et al. *Int Dev Biol* 2010;54:1743-54. [\[CrossRef\]](#)
23. Booth HAF, Holland PWH. Eleven daughters of NANOG. *Genomics* 2004;84:229-38. [\[CrossRef\]](#)
24. Hatano S, Tada M, Kimura H, Yamaguchi S, Kono T, Nakano T. et al. Pluripotential competence of cells associated with Nanog activity. *Mec Develop* 2005;22:67-79. [\[CrossRef\]](#)
25. Levasseur DN, Das S, Jena S. Alternative splicing produces nanog protein variants with different capacities for self-renewal and pluripotency in embryonic stem cells. *J Biol Chem* 2011;286:42690-703. [\[CrossRef\]](#)
26. Gu T, Liu S, Zheng P. Cytoplasmic NANOG- positive stromal cells promote human cervical cancer progression. *Am J Pathol* 2012;181(2):652-60. [\[CrossRef\]](#)
27. Ezeh UI, Turek PJ, Reijo RA, Clark AT. Human embryonic stem cell genes OCT4, NANOG, STELLAR, and GDF3 are expressed in both seminoma and breast carcinoma. *Cancer* 2005;104:2255-65. [\[CrossRef\]](#)
28. Page R, Ambady S, Holmes WF, Vilner L, Kole D, Kashpur O, et al. Induction of stem cell gene expression in adult human fibroblasts without transgenes. *Cloning stem cells* 2009;11(3):417-25. [\[CrossRef\]](#)
29. Alvarez A, Hossain M, Dantuma E, Merchant S, Sugaya K. NANOG overexpression allows human mesenchymal stem cells to differentiate into neural cells. *Neurosci Med* 2010;1:1-13. [\[CrossRef\]](#)
30. Eberle I, Pless B, Braun M, Dingermann T, Marschalek R. Transcriptional properties of human NANOG1 and NANOG2 in acute leukemic cells. *Nucleic Acids Res* 2010; 38(16):5384-95. [\[CrossRef\]](#)