sina-pub.ir

سیستم های فعلی برنامه ریزی مجدد در پزشکی ترمیمی: از سلول های سوماتیک تا سلول های بنیادی پرتوان القایی

سلول های بنیادی پرتوان القایی(iPSCs) راه را برای زمینه های تحقیقاتی از جمله سلول درمانی،غربالگری دارویی، مدل سازی بیماری و مکانیسم رشد جنین، هموار کرده است. اگرچه فناوری سلول های بنیادی پرتوان القایی(iPSCs) توسط سیستم های دارو رسانی مختلف بهبود یافته است، انتقال مستقیم و تنظیم مولکول های کوچک، کارایی پایین برنامه ریزی مجدد و مراحل اصلاح ژنومیک از موانع کاربرد بالینی آن هستند. بهبود وکتور های موجود و کشف وکتور های جدید برای تعدیل کارایی و اصلاح ژنومیک برای برنامه ریزی مجدد لازم است. در اینجا ما یک تحلیل جامع از سیستم های برنامه ریزی مجدد فعلی را برای تولید سلول های بنیادی پرتوان القایی(iPSCs) از سلول های سوماتیک ارایه می کنیم. ما با شفاف سازی مزایا و معایب سیستم های برنامه ریزی مجدد فعلی، به دنبال کشف یک شیوه موثر برای تولید سلول های بنیادی پرتوان القایی (iPSCs) با درجه بالینی هستیم.

کلمات کلیدی : کارایی، اصلاح ژنومی، سلول های بنیادی پرتوان القایی، سیستم برنامه ریزی مجدد، وکتور

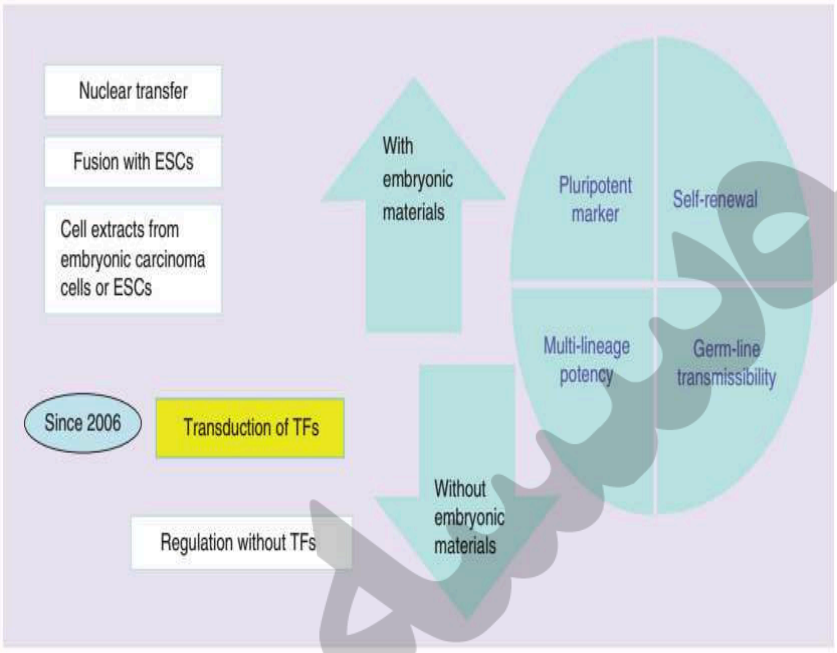
سلول های بنیادی پرتوان القایی(iPSCs) راه را برای زمینه های تحقیقاتی از جمله سلول درمانی،غربالگری دارویی، مدل سازی بیماری و مکانیسم رشد جنینی، هموار ساخته است. در گذشته، انتقال هسته ای یا همجوشی با سلول های بنیادی جنینی(ESC) در سلول های سوماتیک با موانع فنی، اخلاقی، ایمنی و لجستیکی همراه بوده است(1). عصاره های سلولی حاصل از سلول های کارسینومای جنینی یا ESC که تسهیل کننده برنامه ریزی مجدد هسته ای هستند، یک جایگزین جذاب برای فیوژن سلول یا انتقال هسته ای می باشند. به طور ویژه، آن ها ژن های ECSرا تنظیم افزایشی و نشانگر های سلول سوماتیک را تنظیم کاهشی کرده و هیستون ها را به صورت اپی ژنتیکی اصلاح می کنند(2). تا کنون، این عصاره ها به طور موفق سلول های سوماتیک را به سلول های بنیادی پرتوان القایی با پتانسیل تمایزیابی کامل، برنامه ریزی مجدد نکرده اند.

sina-pub.ir

جدا کردن مواد جنینی به عنوان یک رویکرد لازم برای دست یابی به سلول های بنیادی پرتوان القایی موجود در نظر گرفته شده است. تاکاشی و یامانکا(3)، از طریق انتقال ویروسی 24 ژن کاندید و سپس تقسیم آن ها به چهار عامل رونویسی(TF)، یعنی Klf4c,،Oct4, Sox2 وc-Myc به یک موفقیت بزرگ دست یافت و فیبروبلاست های موش را به سلول های بنیادی پرتوان القایی تبدیل کرد. این سلول های برنامه ریزی شده مجدد بر طبق ابعاد اصلی پرتوانی ایجاد شدند(شکل 1) از جمله مورفولوژی ، تکثیر، بیان نشانگر چند توانی، خود ترمیمی، پتانسیل چند رده ای و انتقال پذیری دودمان زاینده که مشابه با ESCs بود(4). اگرچه انتقال ویروسی OSKM رایج ترین راهبرد برای ارایه یک شیوه سریع برای تولید سلول های بنیادی پرتوان القایی با اهمیت درمانی مختلف می باشد، کارایی برنامه ریزی ضعیف هنوز یک مسئله و نگرانی کلیدی است(5).

به منظور بهبود کارایی برنامه ریزی مجدد، عوامل جایگزین و روش های جدید تر بایستی برای اطمینان از کیفیت سلول های بنیادی پرتوان القایی حاصله تست شوند. برای تولید موفق سلول های بنیادی پرتوان القایی از فیبروبلاست های موش،Sox1 SOX3 جایگزین های کامل برای Sox2 می باشند، به علاوه، L-Myc و N-Myc قادربه جایگزینی c-Myc(4-6) می باشد. به علاوه، برنامه ریزی مجدد سلول سوماتیک حاصل از سیستم تحویل ژن از طریق ترکیب ویروس ها می باشد، با این حال این مسئله منجر به ترکیب به متاسیون تصادفی و ژنوم میزبان در سلول های هدف(7) شده است.چون حذف کامل روابط تراژنی هدف اصلی سیستم های تحویل بوده است، چندین سیستم تحویل غیر ویروسی برای معرفی TF ها به سلول های سوماتیک با هدف بهبود کارایی بنرامه ریزی مجدد و کاهش کروموزوم های غیر طبیعی توسعه یافته است. در این مقاله مروری، ما یک تحلیل جامع را بر روی سیستم های برنامه ریزی مجدد برای تولید iPSCs از سلول های سوماتیک به عنوان راهنمایی برای کاربرد سیستم های نسل جدید انجام دادیم(شکل 2). با تجزیه تحلیل مزایا و معایب سیستم های برنامه ریزی مجدد فعلی، هدف ما دست یابی به یک مسیر موثر برای تولید سلول های بنیادی پرتوان القایی درجه بالینی می باشد(جدول 1).

sina-pub.ir



انتقال هسته ای	با مواد جنینی	نشانگر پرتوان	
فیوژن با ESC	بدون مواد جنینی	خود ترمیمی	
عصاره های سلول از سلول های کارسینومای جنینی یا ESC	توانایی چند نیایی		
از سال 2006، انتقال TF ها	انتقال پذیری دودمان زاینده		
تنظیم بدون TF			

شکل 1: برنامه ریزی مجدد با و بدون مواد جنینی و ویژگی های سلول های حاصله نشان داده شده است.

ESC: سلول بنیادی جنینی ، TF: فاکتور رونویسی

سینتیک و کارایی برنامه ریزی مجدد

به منظور درک بهتر سیستم های برنامه ریزی مجدد، محققان به دنبال روش های مختلف و نشانگر هایی برای تعیین کارایی در فرایند برنامه ریزی مجدد می باشند. ویژگی های اپی تلیال و فعال سازی برخی نشانگر های ESC در سلول های سوماتیک پس از شروع برنامه ریزی مجدد از طریق انتقال MET نیاز است که یک گام مهم ولی غیر ضروری برای برنامه ریزی مجدد می باشد. سپس، ژن های مرتبط باپرتوانی فعال سازی شده و نشانگر های AP، SSEA1، NANOG و نشانگر سطحی TRA-1-60 به تدریج در مراحل مختلف برنامه ریزی مجدد(8-11)

sina-pub.ir

فعال سازی می شوند. نشانگر های سطح سلول CD44 و ICAM1 را می توان برای نشان دادن فرایند برنامه ریزی مجدد تدریجی از جمله حالت مزانشیم، حالت اپیدرمی، حالت پرتوان اولیه و حالت پرتوان پایانی(12) استفاده کرد. نسبت بین تعداد سلول های اصلی دریافت کننده مجموعه ای از TF ها و تعداد کلنی های سلول های بنیادی پرتوان القایی اصلی و سینتیک برنامه ریزی مجدد برای برنامه ریزی مجدد موفق از اهمیت زیادی برخوردار است، اگرچه اندازه گیری آن ها سخت است. به علاوه، سلول نوع دهنده و شرایط کشت مشخص بدون شک بر کارایی و سینتیک برنامه ریزی مجدد اثر می گذارند. در مقایسه با فیبروبلاست ها، کراتیتوسیت های انسان را می توان 100 برابر کارامد تر از MEF ها برنامه ریزی مجدد کرد(13). و حالت های اپی ژنتیکی اولیه در سلول های دهنده خاص در افزایش کارایی، TF های کم تر و کیفیت سلول های بنیادی پرتوان القایی(14) نقش دارند. برای مثال، لول های بنیادی هسته با بیان درونزای Sox2 را می توان در نبود sox2 و یا با oct 4 به تنهایی برنامه نویسی مجدد کر(15-16). به طور هم زمان، افزایش در سرعت تکثیر و کاهش اندازه سلول از نظر مولکولی با انتقال متوالی همراه است(17). ترانسکریپتاز معکوس تلومراز و آنتی ژن T بزرگ SV40، که دارای اثرات مثبتی بر روی تکثیر هستند، موجب افزایش مقدار سلول های بنیادی پرتوان القایی حاصله می شود(18). مولکول های کوچک و mi-RNA که قادر به تنظیم چرخه سلولی می باشند، موجب افزایش تعداد کلنی های برنامه ریزی شده مجدد می شود(19-20). شرایط هیپوکسیک(21)، فاکتور های رشد ترشح شده توسط سلول های تغذیه کننده(22) و مواد افزودنی به محیط کشت(23) به طور مطلق موجب بهبود کارایی برنامه ریزی مجدد می شود. سینتیک ها با چندین فاکتور تنظیم می شوند و در نتیجه یک استاندارد طلایی برای ارزیابی صحیح در مورد برنامه ریزی مجدد برای شرایط مختلف برنامه ریزی مجدد وجود دارد.

رویکرد های وکتور ویروسی برای برنامه ریزی مجدد

در طی فرایند برنامه ریزی مجدد، خاموش سازی القایی به تدریج اتفاق می افتد، با این حال ژن های ویروسی به طور سازنده ای بیان می شوند. علی رغم امکان تولید ایمن سلول های بنیادی پرتوان القایی، ویروس ها یک ظرفیت انتقال ژن نسبتا پایین را نشان داده و از این روی عفونت های مکرر اغلب برای بسیاری از انواع سلول ها نیاز هستند. در نتیجه، روتروویروس ها(24) و لنتی ویروس ها(25) هنوز جزو سیستم های تحویل رایج و کاربردی می باشند.

رتروویروس

sina-pub.ir

رتروویروس های حاصل از وکتورهای فاقد قدرت همانند سازی و به عنوان رایج ترین گزینه مطالعاتی قادر است تا سلول های هدف را آلوده کرده و محموله ویروسی خود را به آن ها تحویل دهند و در عین حال از لیز و مرگ سلولی با بازدارندگی مسیر لیتیک، جلوگیری کنند. قابلیت آلودگی روتروویروس ها محدود به سلول های تقسیم شونده است و به این ترتیب نوع سلول برای برنامه ریزی مجدد تحت برخی محدودیت ها قرار دارد. سلول های بنیادی پرتوان القایی به واسطه رتروویروس برای فسفاتاز قلیایی به صورت مثبت هستند و بیان ژن های پرتوانی جدید و ویژگی های فراساختاری را از جمله دانه های گلیکوژن را در سیتوپلاسم(26) نشان داده و تشکیل تراتوم های درون تنی(27) می دهند. اخیرا، کاست پلی سیسترونیک کد کننده چهار TF تفکیک شده با پپتید های 2A در رتروویروس تحت پروموتور LTR یا EF1a تست شده و کارایی بسیار بیشتر از(بیش از 0.6 درصد) نسبت به وکتور های دیگر بود(28). به طور خلاصه، موتاژنز الحاقی، بیان باقی مانده و فعال سازی مجدد TF در طی متمرکز سازی ویروس و ذخیره آن مانع از آلودگی گونه یا انواع سلول ها شده و در نتیجه منجر به ایجاد محدودیت هایی در برنامه ریزی مجدد می شود.

لنتی ویروس

لنتی ویروس های تولید شده از VSV-G مبتنی بر HIV1، به عنوان زیر رده ای از رتروویروس ها، برای انتقال سلول های تقسیم نشونده، کارامد می باشند. با این حال،یکپارچه سازی غیر قابل پیش بینی منجر به اختلال در ژن های داخلی شده و موجب فعال سازی انکوژن ها می شود. در حالت پرتوان، خاموشی ضعیف آن هاموجب می شود تا نسخه های تشکیل دهنده آن ها برای برنامه ریزی مجدد مناسب نباشد(29). فیبروبلاست های موش های بالغ را می توان به طور کارامد به سلول های بنیادی پرتوان القایی با استفاده از وکتور لنتی ویروس پلی سیسترونیک کاست سلول بنیادی(30) تبدیل کرد. به طور مشابه، یک وکتور لنتی ویروسی قابل القا با داکس پلی سیسترونیک توسعه یافت و به طور موفق سلول های سوماتیک را با کارایی نسبی بالا برنامه ریزی مجدد کرد(31). به علاوه، تنها یک رونوشت پرووویروس در فرایند برنامه ریزی مجدد لازم بود(30-31). سلول های برنامه ریزی شده مجدد با مجموعه لنتی ویروس TF انسان یک مورفولوژی سلول بنیادی پرتوان القایی را چهار روز پس از انتقال نشان داد از آنجا که از یک نوع رتروویروس استفاده می کند، این روش با یک سری محدودیت ها همراه است. به علاوه، بسته بندی ناکارامد لاین های سلولی نیز به مسمومیت VSV-G کمک می کند.

sina-pub.ir

آدنوویروس

سیستم های تحویل ویروس مرتبط با آدنو(AAV) که فاقد خاصیت بیماری زایی می باشند، قادر به آلوده سازی سلول های تقسیم شونده و تقسیم ناشونده نمی باشند و می توانند به طور پایدار در ژنوم سلول میزبان در مکان ویژه قرار گیرند که آن ها را از رویکرد های مبتنی بر لنتی ویروس متمایز می کند.آدنوویروس ها قادر به آلوده سازی همه انواع سلول ها به جز برخی سلول های لنفاوی بوده و بیان ژن آن ها در این سیستم کافی نیست. سلول های بنیادی پرتوان القایی انسانی عاری از تراژن را می توان از طریق تلفیق و برش مکان-ویژه ترازن ها همراه با سیستم LoxP/Cre تولید کرد. سروتیپ های AAV 2 و 6 نسبت به سروتیپ های دیگر در کارایی انتقال آن ها برتر می باشند و این با فراوانی گیرنده های متناظر آنها همبستگی دارد(33). حتی، کارایی برنامه ریزی مجدد این دو سروتیپ در سلول های موش و انسان بسیار پایین هستند(34-35). به عنوان جایگزینی برای آدنوویروس های استاندارد، معرفی قطعات دو رشته ای DNA مصنوعی در فرایند برنامه ریزی مجدد با وکتور آدنوویروس وابسته به یاور(HDAdV) و 7-81 درصد کلنی، برای تولید کامل سلول های بنیادی پرتوان القایی(36-37) هدف یابی شدند. در نتیجه، مطالعات بیشتری برای بیان تراژنی بهینه و کارایی بالاتر در فرایند برنامه ریزی مجدد لازم هستند.

سیستم های قابل برش				
وکتور های ویروسی	وکتور های غیر ویروسی	سایر وکتور های جدید	انتقال بدون وکتور	مولکول های کوچک
رتروویروس ها	پلازمید ها	کروموزوم های مصنوعی انسان	miRNA	تنظیم کننده های اپی ژنتیک
لنتی ویروس ها	اپیزومال	مگنتوفکشن[1] لیپوزومی	مسیر سیگنالینگ	
ویروس مرتبط با آدنو	وکتور حلقه کوچک	Mrna سنتتیک	پروتین	
ویروس سندای، ترانسپوزون	حامل های نانوذرات،	باکلوویروس		

1 روشی که در آن از میدان مغناطیسی برای رساندن ذرات حاوی اسیدهای نوکلئیک به سلول‌های هدف استفاده می‌شود

sina-pub.ir

شکل 2: نظر سنجی جامع سیستم های برنامه ریزی مجدد برای تولید سلول های بنیادین پرتوان القا شده از سلول های سوماتیک به عنوان راهنمایی برای کاربرد سیستم های فعلی

جدول 1: مزایا و معایب سیستم های برنامه ریزی مجدد فعلی

طبقه بندی	وکتور ها	مزایا	معایب
ویروس	رتروویروس	کارایی بالا، اجتناب از مرگ و لیز سلولی	نوع سلول محدود، موتاژنز الحاقی، بیان باقی مانده TF در طی متمرکز سازی ویروسی
	لنتی ویروس	کارایی بالا، تروپیسم بافتی وسیع، سهولت جا به جایی، دسترسی به سیستم های قابل القا	مکان یکپارچه سازی غیر قابل پیش بینی، خاموش سازی ضعیف، موتاژنز الحاقی، کاهش تیتراسیون در زمان متمرکز سازی ویروس، بسته بندی ناکارامد لاین های سلولی
	آدنوویروس	فاقد ویژگی بیماری زایی، تروپیسم گسترده، یکپارچه سازی جایگاه-ویژه	کارایی پایین
	ویروس سندای	کارایی بالا، بدون قرار گیری در ژنوم میزبان، تروپیسم بافتی سریع	رونویسی سیتئپلاسمی وکتور های ویروسی
	باکلوویروس	کارایی بالا، تروپیسم بافتی وسیع، یکپارچه سازی جایگاه ویژه، بدون سمیت سلولی محسوس، انعطاف پذیری در تبادل تراژنی، سمیت ژنومی پایین	اختلال در رونویسی 12 ژت دخیل در مسیر سیگنالینگ گیرنده تی ال ار

sina-pub.ir

رویکرد های غیر ویروسی	پلازمید های استاندارد	بدون قرار گیری در ژنوم میزبان، بدون ناهنجاری های کروموزومی	کارایی پایین، نیاز به TF اضافی که منجر به مرگ سلولی می شود، بیان موفقت تراژن ها، کارایی پایین، برش ناکافی وکتور ها
	پلازمید های اپیزومال	ساده ترین رویکرد تفکیک، کارایی منطقی، تروپیسم وسیع	کارایی پایین، القای مکرر، برش ناکارامد وکتور های یکپارچه
	پلازمید های حلقه ای کوچک	غیر قابل تلفیق، کم خرج، ایمنوژنیسیته پایین	کارایی پایین،ادغام موقت، نیاز به TF اضافی، ترانسفکشن های چندگانه، برش ناکارامد وکتورها
	ترانسپوزون ها	کارایی بیشتر از پلازمید ها، تروپیسم بافتی سریع	موتاسیون ها در ژنوم، کارایی پایین، القای نکراری، برش ناکارامد وکتور ها
سیستم های تحویل نوظهور دیگر	mi-RNA	کوچک، بدون ادغام بافتی، سنتز اسان، عملکرد طولانی تر از RNA کد کننده	کارایی پایین، عمل موقت و ترنسفکشن چندگانه
	سیستم کروموزوم مصنوعی	انتقال اپیزومال، انتقال تراژن های بزرگ چندگانه از رونوشت اپیزوم ها، بدون ادغام در کروموزوم های میزبانف قابل انتقال از یک سلول به سلول دیگر	کارایی پایین، محدودیت مربوط به مشکلات فنی بار گذاری ژن در HAC، ساختار های نامشخص
	RNA پیام اور سنتتیک	کارایی بالا بدون ادغام تراژنی،سینتیک سریع، حذف مرحله پاک سازی برای تخلیص وکتور	نسبتا سخت

sina-pub.ir

	مگنتوفکشن لیپوزومی	کارایی بالا، پایدار،عدم ادغام، تحت حداقل شرایط سمی	توزیع کملپکس های ترکیبی در سطح سلول می تواند غیر یکنواخت باشد
انتقال مستقیم پروتین		بدون اصلاح ژنتیک، ساده تر و سریع تر	کارایی پایین تر، نیازمند القای مکرر و تولید برش های ناکافی از وکتور ها
مولکول های کوچک		کارایی بالا، بهبود کارایی برنامه ریزی مجدد به واسطه TF، کاهش فاکتور های رونویسی	قادر به تکرار سری های TF و تولید سلول های بنیادی پرتوان القایی با پرتوانی کامل و توانایی تمایز یابی نیست.

ویروس سندای

وکتور ویروس سندای، که یک ویروس RNA رشته ای منفی از خانواده پارامیکسوویریده می باشد، برای انسان غیر بیماری زا است. این ویروس در سیتوپلاسم سلول های هدف همانند سازی می کند ولی از فاز DNA عبور نمی کند(38). این ویروس به تدریج از سیتوپلاسم سلول های بنیادی پرتوان القایی پس از چندین بار عبور تخلیه شده و به طور کارامد تولید سلول های بنیادی پرتوان القایی عاری از تراژن با انواع سلول های متفاوت و در شرایط عاری از تغذیه کننده(39-40) می کند. در طی تقسیم سلول های بنیادی پرتوان القایی، اگرچه وکتور های ویروسی به کندی رقیق می شوند، همانند سازی پیوسته وکتور های ویروسی بایستی پاکسازی شود(41). این ویروس به طور مقرون به صرفه ای نتایج برنامه ریزی مجدد ثابت و پیوسته را نشان می دهد(42). سپس موتاسیون های حساس به دما که به تسریع کاربرد بالینی آینده سلول های بنیادی پرتوان القایی با روش های غیر مخرب کمک می کند، برای حذف کامل ساختار های ویروسی در دما های غیر مجاز معرفی شده است(43).

باکلوویرال

علاوه بر وکتور های ویروسی فوق الذکر، باکلوویرال(BV) قادر به انتقال سلول های مختلف پستانی بدون سمیت سلولی قابل ملاحظه(44-45) می باشد. این ویروس، ژن هایی با کارایی بالا را در ESC انسان تحویل داده و ژن

sina-pub.ir

ها را تقریبا در همه ECS های ماهی مداکا، تحویل می دهند(46). بعد از سه انتقال متوالی فیبروبلاست های جنین موش(MEF) با ذرات BacMam، کلنی های سلول های بنیادی پرتوان القایی تولید شده و کارایی تا 64-98 درصد افزایش یافت(47). اگرچه BV می تواند موجب تحریک درونی پاسخ ها در سلول های پستاندارن شود(33-34)، انتقال MSC تنها موجب فعال سازی پاسخ های خفیف و موقت در مسیر گیرنده تی ال ار (48) می شود و هیچ گونه سیتوکین و سنسور ها یا واسطه های سیگنالینگ پایین دست با این روش تغییر نیافتند(49). اخیرا، انتقال BV به طور موفق فیبروبلاست های انسانی را با ادغام مکان ویژه در جایگاه ژنی(لوکوس) AAVS1(50) برنامه ریزی مجدد کردند. سیستم نوکلئاز افکتور شبه فعال کننده رونویسی BV با افزایش کارایی ادغام بالا، تبادل تراژنی انعطاف پذیر و سمیت ژنومی پایین، پتانسیل بالایی برای اصلاح ژنتیکی دقیق در تولید سلول های بنیادی پرتوان القایی دارد(51-55). BV به عنوان وکتور تاریخته فناوری تصویر برداری ژن گزارشگر رادیونوکلویید برای بهبود فناوری، به پایش درمان پیوند سلول های بنیادی کمک می کند(53).

رویکرد های غیر ویروسی برای برنامه ریزی مجدد

برای اجتناب از تداخل با ژنوم میزبان در طی فرایند برنامه ریزی مجدد، روش های ایمن تر بایستی توسعه یابند. چندین وکتور غیر ویروسی از جمله پلازمید ها(54)، وکتور های اپیزومال(55)، حلقه های کوچک(56) و ترانسپوزون ها(57) برای برنامه ریزی مجدد سلول های بنیادی پرتوان القایی توصیف شده اند. با این حال، این رویکرد های غیر ویروسی ناکارامد بوده و نیازمند ادغام تکراری و تولید برش ناکارامد وکتور ها است.

پلازمید های استاندارد

پلازمید ها، وکتور های غیر ویروسی هستند که وارد ژنوم های سلول های بنیادی پرتوان القایی شده و تولید ناهنجاری های کروموزومی(58) می کنند ولی دارای کارایی برنامه ریزی مجدد پایینی هستند(59). یکپارچگی ژنومیک آن ها مستلزم TF اضافی بوده و منجر به مرگ سلولی در زمان نوکلوفکشن(انتقال از طریق هسته) می شود. بیشتر وکتور های پلازمید منظم فاقد توانایی همانند سازی خود در سلول های پستانداران بوده و منجر به تقسیم سلولی تدریجی شده و آن ها به طور موقت تراژن ها را بیان می کنند. سلول های بنیادی پرتوان القایی از نظر مورفولوژیکی مشابه با ESC بوده و نشانگر های پرتوان ESC را در سطوح مشابه بیان می کنند. برای اطمینان

sina-pub.ir

از تولید کارامد و کنترل شده، پلازمید های برنامه ریزی مجدد مجهز به جایگاه باکتریوفاژ خاص و یک وکتور بیان ویژه برای بهبود ادغام در ژنوم می باشند(61).

پلازمید های اپیزومال

سیستم های اپیزومال مبتنی بر آنتی ژن هسته ای 1 اپشتین-بار ، که ساده ترین رویکرد تجزیه است، کارایی محسوسی را نشان داده ضمن این که تنها نیازمند یک ترانسفکشن با Maxiprep DNA است. وکتور ها به طور گسترده ای برای تولید سلول های بنیادی پرتوان القایی بوده و به طور خودکار همانند عناصر برون کروموزومی در هر دو سلول های تقسیم شونده و تقسیم ناشونده همانند سازی کرده و در سرتاسر برنامه ریزی مجدد باقی مانده و سپس در سلول های بنیادی پرتوان القایی کاهش می یابد(62). از آنجا که پروتوکل های فعلی تولید سلول های بنیادی پرتوان القایی انسانی عاری از تجزیه از کراتینوسیت ها به طور کلی ناکارامد است، ترنسفکشن ساده وکتور های اپیزومی قادر به دست یابی به کارایی برنامه ریزی مجدد به میزان 0.14 درصد(63) می باشند. تحویل وکتور های اپیزومی به سلول ها می تواند یک مسئله مهم برای سلول های سوماتیک اصلی باشد که می توان آن ها را با استفاده از سیستم ترکیبی بردار اپیزومی ادنوویروس(64) حل کرد که سیستمی است که از نوترکیبی جایگاه-ویژه به واسطه Cre برای برش یک وکتور اپیزومی از یک ژنوم ادنوویروس نوترکیب هدف استفاده می کند. به طور خلاصه، وکتور های اپیزومال نسبت به وکتور پلازمید به دلیل افزایش مدت زمان بیان فاکتور برنامه ریزی مجدد در سلول های هدف، عملکرد برتری دارند.

پلازمید های کوچک حلقه

پلازمید های کوچک حلقه، وکتور های تحویل ارزان و غیر ادغام شونده با ایمنوژنیسیته پایین می باشند، با این حال پروتوکل ها برای استفاده از آن ها ناکافی است که این موضوع منجر به ادغام تصادفی شده و مستلزم فاکتور های رونویسی اضافی و ترنسفکشن های چندگانه هستند. حلقه های کوچک، وکتور های DNA اپیزومال خاص عاری از ساختار پلازمید باکتریای بوده(65) و به طور معنی داری کوچک تر از پلازمید های استاندارد است. نرنسفکشن مکرر وکتور های DNA حلقه کوچک به سلول های سوماتیک و منابع سلول های فراوان برای برنامه ریزی مجدد کارامد به سلول های بنیادی پرتوان القایی عاری از تراژن قابل اصلاح هستند(65). در مقایسه با پلازمید های استاندارد، DNA کوچک حلقه دارای کارایی بالاتر و بیان اکتوپیک طولانی بوده ولی با فعال سازی

sina-pub.ir

پایین تر خاموش سازی برونزا همراه است(56) که موجب بهبود کارایی ترنسفکشن آن و نرخ بقای سلول های هدف می شود. اگرچه حلقه کوچک از دیدگاه نظری نبایستی در سلول های هدف ادغم نشود، شانس ادغام نسبتا پایین خواهد بود. در عین حال، تولید سلول های بنیادی پرتوان القایی مبتنی بر پلازمید های حلقه کوچک با تولید کایمرای مرغ(66) سازگار است.

ترانسپوزون ها

ترانسپوزون ها قادر به حرکت از یک جایگاه ژنی به جایگاه ژنی دیگر در کروموزوم بوده و منجر به بروز موتاسیون و بازارایی ژنومی در ژنوم می شوند. ترانسپوزون ها که اولین بار توسط باربارا مک کلینتوک در 1950(67) کشف شدند، را می توان به دو دسته تقسیم کرد: دسته اول، خود را پس از این که اولین بار به RNA رونویسی شدند، همانند سازی کرده و سپس به طور معکوس به DNA رونویسی شده و در نهایت به یک جایگاه دیگر در ژنوم افزوده می شود. دسته دوم، مستقیما از یک جایگاه ژنی به جایگاه ژنی دیگر حرکت کرده، با این حال خود را از جایگاه اصلی برش داده و به یک جایگاه ژنی جدید افزوده می شوند. ترانسپوزاز ها معمولا در انتهای هر ترانسپوزون واقع شده و می توانند تقریبا بر روی هر توالی DNA عمل کنند(68) و موجب افزایش کارایی ادغام ژنوم نسبت به پلازمید ها می شود(69). غربالگری های ژنتیکی انجام شده بر روی این ترانسپوزاز منجر به ایجاد یک واریانت ابر فعالی شده است که امکان ترانسپوز کارامد را در سلول های مهره داران و پستانداران(69) داده و از این روی امکان روش های جدید مهندسی ژنتیک در مدل های حیوانی، تعدادی از انواع سلول های انسانی و کارازمایی های ژن درمانی را می دهد. به علاوه، پس از ادغام ژنومیک پایدار، بیان مجدد ترانسپوزاز می تواند منجر به برش ترانسپوزون(71) شود. ترانسپوزون piggyBac (PB) متعلق به عناصر ژتتیکی دسته دوم بوده و تنها نیازمند تکرار های پایانه معکوس(ITR) و ترانسپوزون فعال برای کاتالیز افزایش یا برش(69-70) می باشد. ویژگی های منحصر به فرد ترانسووزن های PB از جمله ادغام ژنومیک کارامد، ظرفیت محموله نامحدود، بیان ژنی قوی و حتی برش یکپارچه موجب شده است این سیستم به یکی از بهترین گزینه ها برای تولید سلول های بنیادی پرتوان القایی تمیز از نظر ژنتیکی تبدیل شوند. استفاده از PBدر یک پلازمید حاوی هر دو ترانسپوزاز و ترانسپوزون موجب افزایش احتمال ادغام ترانسپوزاز می شود، ولی استفاده از ترانسپوزون و ترانسپوزاز از وکتور های مجزا موجب غلبه بر این مشکل شده است. به علاوه، تحویل وکتور های پلازمید PB به سلول ها بستگی به معرف های ترنسفکشن

sina-pub.ir

دارد و مکان های افزایش در هر سلول غیر قابل کنترل هستند. سیستم ترانسپوزون ژن زیبای خفته۲ از قطعات متعلق به ابر خانواده Tc1/mariner باز سازی شده و مشابه با ترانسپوزون نیایی است(73). ترانسپوزون SB، اریبی ادغام را به سمت عناصر ژنتیکی خاص نشان نداده و این موجب کاهش ریسک موتاژنز الحاقی می شود. به علاوه، بر خلاف ترانسپوزون جایگزین PB، SB فاقد عناصر شبه SB در ژنوم انسان بوده و موجب حداقل شدن امکان تحرک عناصر ترانسپوزون دروزا می شود(57). سلول های بنیادی پرتوان القایی برنامه ریزی شده مجدد ترانسپوزون SB، تکثیر بلند مدت درون تنی را در 40 مسیر نشان داده و نشانگر های سطحی ESC را بیان کردند. انتقال ژن به واسطه SB همراه با تولید ساده و ارزان را می توان برای تولید سلول های بنیادی پرتوان القایی از پیش زمینه ژنتیکی متفاوت استفاده کرد(75).

سیستم های قابل حذف از ژنوم

سیستم Cre–loxP

سیستم های قابل حذف از Cre امکان حذف تراژن های ادغام شده را از ژنوم فراهم کرده اند(64). در طی چرخه رونویسی معکوس ویروسی نرمال قبل از ادغام، توالی loxP به منطقه $5'$ LTR برای ایجاد یک نسخه loxP رونویسی شده و سپس به ژنوم هدف ادغام می شود. حذف کاست تراژن Loxp مستلزم معرفی فعالیت نوترکیبی Cre می باشد که با پلازمید کد کننده Cre (76)، ساختار های Cre لنتی ویرال(64) و ساختار های Cre ادنوویروس(77) انجام شده اند. بر عکس، تحویل Cre mRNA (78) برای دست یابی به سلول های بنیادی عاری از تراژن مستلزم ترانسفکشن روزانه m-RNA برای یک هفته جهت انجام برش یا حذف می باشد از این روی این پیشرفت به واسطه Mrna ناکارامد، سخت و غیر جذاب است. سپس، سلول های بنیادی پرتوان القایی عاری از تراژن را می توان با آنزیم های ریکومبیناز و انتخاب کلون های سلول های بنیادی پرتوان القایی حذف شده بدست اورد. هر دو سلول های بنیادی پرتوان القایی حذف شده یا نشده ، نشانگر های پرتوان را بیان کرده و قادر به تمایزیابی درون شیشه ای بوده و سلول های حذف نشده قادر به تشکیل درون تنی کایمراز دودمان زاینده(64) می باشند. اخیرا با استفاده از پروتین نوترکیب TAT-Cre به مدت 5 ساعت فرایند دست یابی به سلول های بنیادی پرتوان القایی عاری از تراژن با پیچیدگی فنی حداقل تسریع شده است(79). آنزیم ریکامبیناز Cre منجر

[2] Sleeping Beauty

sina-pub.ir

به حذف تراریخته چندگانه شده و منجر به بازارایی ژنومی و ناپایداری ژنومی می شود. القای کارامد و مطمئن ریکامبیناز Cre در سلول های بنیادی پرتوان القایی اصلاح شده با loxp و انتخاب کلون های پاک سازی شده یک مانعی بر سر راه استفاده گسترده از سیستم های قابل حذف Cre بوده اند(79).

ادغام مکان-ویژه قابل حذف

اگرچه روش های غیر ادغام شونده به سرعت در حال تبدیل به یک رویکرد استاندارد می باشند، روش های مبتنی بر ادغام اختصاصی ژن های فاکتور برنامه ریزی مجدد از پتانسیل بالایی برای تولید کارامد سلول های بنیادی پرتوان القایی اصلاح پذیر از نظر ژنتیکی برای کاربرد های ژن درمانی اینده برخوردار است. نوکلئاز افکتور شبه فعال ساز رونویسی، به عنوان یک دسته از آنزیم های محدود کننده مصنوعی، را می توان به طور کارامد با سیستم ترشح نوع 3 تحویل داد(80) و به طور معنی داری موجب بهبود نوترکیبی همولوگ به میزان 1000 برابر می شود. مطالعه اخیر با استفاده از ترنسفکشن پلازمید سلول های انسان، تولید سلول های بنیادی پرتوان القایی را با افزایش ژن های TF به جایگاه CCR5 به واسطه نوکلئاز های انگشت روی[3] اثبات کرده است، اگرچه، کارایی برنامه ریزی مجدد نسبتا پایین گزارش شده است(81). بدیهی است که کارایی کنتفرانسفکشن پایین ZEN و یک DNA دهنده بزرگ حامل ژن های TF بیانگر یک مانع مهم برای برنامه ریزی مجدد سلول های انسان با فناوری ZFN می باشد. بیان TF به طور کارامد در هر سلول در زمان ترکیب با یک حامل پلی سیسترونیک با الحاق پپتید 2A خود شکن و یا توالی جایگاه ورود ریبوزوم داخلی بین دو قالب خواندن باز متوالی انجام می شود(31).

سایر سیستم های تحویل نوظهور

انتقال miRNA

miRNA ها را که بسیار کوچک هستند، می توان به آسانی سنتز کرده و آن ها را به سلول ها انتقال داد. پس از آن، آن ها به مدت چندین روز پایداری خود را حفظ کرده و عملکرد طولانی تری از RNA های کد گذاری ولی بدون خطر ادغام ژنوم دارند. بازدارنده های miRNA موجب افزایش و بهبود برنامه ریزی مجدد سلول های سوماتیک در سلول های بنیادی پرتوان القایی می شود(82). بیان بالای miR-302a, miR-302b و miR-200c می توانند کارایی برنامه ریزی مجدد را بهبود بخشند ولی زمان مدیریت و تومورزایی را به طور کارامد

[3] zinc finger nuclease

sina-pub.ir

کاهش می دهند. در یک سیستم اپیزومال، miRNA اختصاصی ESC(خوشه 302/367miR- موجب افزایش کارایی تبدیل کلنی در فیبروبلاست ها و سلول های اپی تلیال(84) می شود. دیگر miRNA (miR-294) اختصاصی ESC قادر به جایگزینی c-Myc در برنامه ریزی مجدد MEF ها نسبت به IPSC و بهبود کارایی برنامه ریزی مجدد بدون c-Myc می باشد.miR-302b که توالی مشابه با miR-294 دارد، قادر به بهبود کارایی برنامه ریزی مجدد است(20). بر اساس تنظیم پردازش miRNA،Lin28 می تواند جایگزین Klf4 و c-Myc شده و موجب بهبود کارایی برنامه ریزی مجدد همراه با Nanog می شود(85). میوشی و همکاران، سلول های بنیادی پرتوان القایی موش و انسان را با تحویل مستقیم miRNA اختصاصی ESC بدون انتقال ژن مبتنی بر وکتور(86) تولید کردند. با این حال، ترنسفکشن های چندگانه برای برنامه ریزی مجدد کامل با miRNA نیاز هستند.

سیستم کروموزوم مصنوعی

کروموزوم های مصنوعی انسان(HAC) را که می توان از یک سلول به سلول دیگر انتقال داد، برای انتقال اپیزومال و انتقال چندین تراژن بزرگ استفاده می شوند. کروموزوم کارکردی HAC امکان حفظ بلند مدت اپیزوم های تک نسخه ای را بدون ادغام در ژنوم هدف می دهد. علی رغام این مزایا نسبت به وکتور های ویروسی، استفاده از HAC برای برنامه ریزی مجدد با مشکلات فنی الحاق تراژن و ساختار های نامشخص همراه است(87-88). اخیرا، با استفاده از وکتور 21HAC، MEF ها به طور موفق به سلول های بنیادی پرتوان القایی برنامه ریزی مجدد شده اند. الگوهای بیان ژن جهانی نشان داده اند که سلول های بنیادی پرتوان القایی مبتنی بر HAC در سطح مشابه با سلول های بنیادی پرتوان القایی مبتنی بر رتروویروس، نسبتا یکنواخت می باشند. سپس سلول هایی که در HAC به طور ناخودگاه از بین می روند ایزوله شده و در نهایت سلول های بنیادی پرتوان القایی های عاری از HAC تثبیت شدند(89).HAC1 حامل چهار MEF برنامه ریزی شده مجدد TF می باشد با این حال HAC2 حامل چهار TF بوده و کاست ناک داون P53 به طور کارامد MEF را برنامه ریزی مجدد می کند(89). کروموزوم های مصنوعی مبتنی بر DNA- ماهوره ای(ATATC) قبلا از برخی موانع عبور کرده اند از جمله تخلیص بزرگ مقیاس، انتقال به سلول ها و جنین های مختلف، انتقال دودمان زاینده و تولید حیوان تراریخته(90). برنامه ریزی مجدد MEF ها به طور کارامد توسط HAC با فاکتور های OSKM مهندسی شده حامل شناسه پایانه N و یک نقطه پلی ارژینین پایانه C القا شد(91).

sina-pub.ir

RNA پیام رسان سنتتیک

استفاده از mRNA سنتتیک برای تولید سلول های بنیادی پرتوان القایی، برای پزشکی ترمیمی بسیار جذاب است چرا که از موانع رایج در راهبرد های برنامه ریزی مجدد مبتنی بر ویروس یا مبتنی بر DNA رنج نمی برد. DNA برونزا بایستی به سیتوپلاسم انتقال یافته و بر روی کروموزوم برای برنامه نویسی مجدد موفق قرار گیرد. برعکس، mRNA برونزا تنها بایستی از درون سیتئپلاسم سلول انتقال می یابد. بر عکس سلول های بنیادی پرتوان القایی استخراج شده از رتروویروس، سلول های بنیادی ناشی از mRNA سنتتیک، تفاوت معنی داری از فیبروبلاست های مادری ندارند. از این روی mRNA سنتتیک به طور تدریجی به یک جایگزین مهم برای ادغام مبتنی بر DNA برای برنامه نویسی مجدد سلول تبدیل شده است. به علاوه، مطالعات تمایز یابی هپاتیک نشان داد که سلول های بنیادی مبتنی بر mRNA قادرند تا به طور کارامد به هپاتوبلاست ها(92)تمایز یابند. فنون عاری از ادغام مبتنی بر mRNA سنتتیک منجر به تولید موفق سلول های بنیادی پرتوان القایی از بافت های چربی بیمار تحت شرایط عاری از تغذیه کننده شده و سلول های بنیادی پرتوان القایی به عنوان یک پزشکی ترمیمی شخصی بالقوه مطرح شده است(93). این سیستم قادر به برنامه ریزی مجدد سلول های مختلف به پرتوانی با کارایی بالا و جهت دهی به سلول های بنیادی پرتوانی القایی به سلول های تمایز یافته(94) می باشند. مزیت های رویکرد mRNA شامل کارایی بالا، سینتیک سریع و حذف مرحله پاک سازی برای تخلیص وکتور است. با این حال، این روش نسبتا سخت می باشد ولی در زمان برنامه ریزی مجدد بدون تغذیه کننده، هزینه مواد و نیروی کار کاهش می یابد(95).

مگنتوفکشن لیپوزومی

مگنتوفکشن لیپوزومی(LMF) بر مبنای استفاده از ذرات ابرپارامغناطیس و لیپید های کاتیونی بوده و کارایی ترانسفکشن بهتری را نسبت به سایر سیستم های تحویل غیر ویروسی نشان می دهد. با این حال، توزیع غیر یکنواخت کمپلکس های ترکیبی بر روی سطح سلول را بایستی حذف کرد. تحت یک میدان مغناطیسی گرادیان پویا، ترنسفکشن دارای سمیت سلولی کم تر بوده و کارایی آن تقریبا 21 برابر و 42 درصد بیش از به ترتیب LMF و لیپوفکشن است(89). سلول های بنیادی پرتوانی القایی مبتنی بر LMF دارای ویژگی های مشابه با ESC می باشد از جمله ریخت شناسی سلولی، بیان نشانگر سطحی، تشکیل بدن جنین، تشکیل تراتوم، تمایز مستقیم به

sina-pub.ir

سلول های پایانه ای و تولید موش کایمریک(96). پارک و همکاران تولید ول های بنیادی پرتوانی القایی بدون ادغام و پایدار با یک روش LMF و نصف دوز پلازمید کردند، در حالی که پرتوانی درون تنی و برون تنی مشابه با سایر سلول ها بود. به این ترتیب، LMF یک روش برجسته برای تولید لاین های سول های بنیادی پرتوان القایی بدون ویروس بوده و منجر به بهبود درمان با استفاده از سلول های بنیادی می شود(96).

حامل های سنتتیک

حامل های نانوذرات و سنتتیک کاربرد های رو به رشدی به عنوان سیستم های برنامه ریزی مجدد برای تولید سول های بنیادی پرتوان القایی دارند. برای مثال، پس از ادغام اسید رتیونیک(RA) به طور موثر در نانوذرات کواکریلامید ایزوپروپیل اکریلامید، این نانوذره به یک حامل قوی برای تحویل RA سلول های بنیادی پرتوان القایی انسانی به نیای نورونی(97) تبدیل شده است. ناورنیر و همکاران، سلول های بنیادی پرتوان القایی موش را از MEF با استفاده از حامل لیپید کاتیونی متفاوت ادغام شده با OSKM mRNAs تولید کردند(98).

انتقال پروتین مستقیم

پروتین رسانی بدون اصلاح زنتیک، یک رویکرد ساده تر و سریع تر از سیستم های برنامه ریزی مجدد ژنتیکی پیشرونده می باشند با این حال کارایی آن ها در زمینه های بالینی و تحقیقاتی نسبتا پایین است. تولید پروتین از TF با پلی ارژینین منجر به تولید سلول های بنیادی پرتوان القایی موش در حضور اسید والپرویک(VPA)(99) سلول های بنیادی پرتوان القایی انسانی بدون VPA(100) شده است. با ادغام شناسه ترانسفراز- اس- گلوتاسیون و پلی پپتید سیگنال هسته رونویسی، پروتین OKSM نوترکیب به طور موفق قادر به تولید سلول های بنیادی پرتوان القایی بود(101). پس از بهینه سازی نسبت کمپلکس بولام فیفیل-پروتین تا 7:1 و انکوباسیون به مدت 3 ساعت، فیبروبلاست های انسانی برنامه ریزی شده مجدد، ویژگی های ESC را از جمله بیان ژن های پرتوان، تشکیل تراتوم و تمایز یابی به سلول های مختلف(102) نشان دادند

اگرچه انتقال پروتین قادر به تبدیل سلول های کشنده نابالغ است، سلول های سوماتیک بالغ به سختی قابل برنامه ریزی مجدد هستند(18). اخیرا، سلول های بنیادی عصبی خون بند ناف به طور موفق با استفاده از عصاره های سلولی HEK293 حاوی سه پروتین نوترکیب TF همراه با مولکول های کوچک تحت شرایط با کسیژن

sina-pub.ir

پایین(103) برنامه ریزی مجدد شده اند. به علاوه، پس از کانژوگه شدن سلول TAT حاصل از HIV1 با لیپوزوم های کاتیونی و یا ترکیب با VPA، کارایی انتقال افزایش یافت(104-105). سیستم در نبود تیمار شیمیایی، امکان ترجمه فناوری سلول های بنیادی پرتوان القایی را به کاربرد های بالینی می دهد(94-100). با این حال برای برنامه نویسی موفق سلول های سوماتیک به حالت پرتوان، تخلیص پروتین های مطلوب لازم است.

مولکول های کوچک

شواهد روز افزونی وجود دارد که نشان می دهد مولکول های کوچک قادرند تا تحولی در زمینه سلول های بنیادی پرتوان القایی با جایگزینی به جای سیستم های تحویل فعلی و بهبود قابل توجه کارایی برنامه ریزی مجدد ایجاد کنند. آن ها از اهمیت زیادی برای سلول های برنامه ریزی شده مجدد و سلول های مقاوم به برنامه ریزی مجدد برخوردار هستند. اکثریت این مواد شیمیایی، بازدارنده های تنظیم کننده های اپی ژنتیک و مهار کننده های مسیر های سیگنالینگ می باشند.

تنظیم کننده های اپی ژنتیک

به منظور برنامه ریزی مجدد سلول های سوماتیک با مکمل های شیمیایی، فناوری های غربال با بازده بالا را می توان برای شناسایی مولکول های کوچک در راستای تنظیم بیان و پرتوانی مورد استفاده قرار داد. هانک و همکاران(106) اثبات کرده اند که تیمار MEF با بازدارنده دی استیلاز هیستون قادر به بهبود کارایی برنامه ریزی مجدد با MEF های ناشی از OSKM و OSK به ترتیب تا 100 و 50 برابر می باشند.اگرچه بیان بالای Mbd3/NuRD فاقد اثر مثبت یا منفی بر روی کارایی القای سلول های بنیادی پرتوان القایی بوده و بیان بالای Nanog موجب بهبود سینتیک برنامه ریزی مجدد می شود(107). با این حال، دیگر مطالعه اخیر نشان داده است که Mbd3/NuRD برای تولید کارامد سلول های بنیادی پرتوان القایی از سلول های بنیاددی عصبی، سلول های بنیادی استخراج شده از اپی بلاست و سلول های بنیادی پرتوان القایی بالا اهمیت دارند. در زمینه برنامه ریزی مجدد سلول های بنیادی پرتوان القایی همراه با بیان بالای واریتانت های هیستون TH2A و TH2B، کارایی تولید سلول های بنیادی پرتوان القایی بهبود یافت. هم چنین بیان افزایشی فسفوریلاسیون تشکیل نوکلئوپلاسمین از طریق القای ساختار کروماتین باز می شود(109). اخیرا، لی و همکاران(110) اثبات کرده اند که تحت انتقال با وکتور های لنتی ویرال بیان کننده OCT4، استفاده از مولکول های کوچک برای تولید سلول های بنیادی پرتوان

sina-pub.ir

القایی کارکردی کافی است. ترکیب VPA، CHIR99021, 616452، ترانسیل سیپرومین، فورسکولین و دزنپ قادر است تا MEF را به سلول های بنیادی پرتوان القایی با محیط 2i برنامهریزی مجدد کند. به علاوه، تحت شرایط بدون هر تراژن، سلول های بنیادی پرتوان القایی موش به طور کارامدی با ترکیب هفت ترکیب مولکول کوچک تولید شد(9).

مسیر های سیگنال

به طور مشابه، مدولاتور های سیگنالینگ خاص نیز برای تولید سلول های بنیادی پرتوان القایی مشتق شده از فیبروبلاست کارکردی کافی است(112). ترکیب مسیر های TGF-β, WNT و PGF منجر به تنظیم پرتوانی در گونه های مختلف می شود(113). با ترکیب بازدارنده گیرنده TGF-β، بازدارنده MEK و تیازوویون، کارایی برنامه ریزی مجدد تا بیش از 200 برابر افزایش یافت(114). مطالعات اخیر نشان داده است که مسیر های Ink4/Arf و p53–p21 مانعی بر سر راه تولید سلول های بنیادی پرتوان القایی می باشند. به این ترتیب آزمون این که آیا ترکیب بازدارندگی موقت P53 و تحویل فاکتور های برنامه ریزی مجدد از طریق وکتور های غیر ادغام نشونده قادر است تا تولید سلول های بنیادی پرتوان القایی انسان بدون اصلاح ژنتیکی با کارایی برنامه ریزی مجدد بالاتر کند یا خیر. به علاوه، تنظیم کننده های مسیر سیگنالینگ قادر به حذف نیاز به انتقال با فاکتور های برنامه ریزی مجدد خاص است. در نبود c-Myc برونزا، محیط Wnt3a به برنامه نویسی مجدد سلول های سوماتیک با کارایی بالا کمک می کند(23). به علاوه، مسیر های MEK و TGF-β بدون تحویل فاکتور های رونویسی برونزا تولید سلول های بنیادی پرتوان القایی کردند(118). به علاوه، مولکول های کوچک از مفید ترین منابع برای برنامه نویسی مجددموفق سلول های بنیادی پرتوان القایی با درجه بالینی با کیفیت با حداقل عملکرد ژنتیکی می باشند. با این حال، این مسئله مشخص نیست که آیا مولکول های کوچک قادرند تا سری های TF را اصلاح کرده و سلول های بنیادی پرتوان القایی را با پرتوانی کامل و توانایی تمایز، تولید کنند.

موانع اپی ژنتیک و فرایند برنامه ریزی مجدد

وضعیت اپی ژنتیک ممکن است در طی فرایند برنامه ریزی مجدد تغییر کند(119) و کمپلکس های مدل سازی کروماتین و واریانت های هیستون نقش مهمی در حفظ وضعیت کروماتین پرتوان ایفا میکند(120). پیکر بندی ساختار کروماتین از جمله متیلاسیون DNA، اصلاح هیستون و مدل سازی نوکلئوزوم پس از شروع برنامه ریزی

sina-pub.ir

مجدد انجام می شود. کروماتین مغلوب حاوی مانع مکانیستی اصلی در فرایند برنامه ریزی مجدد(121-122) می باشد و دی متیلاسیون DNA حفظ شده و نیازمندد ویژگی برنامه ریزی مجدد است(123). بیشتر واریانت های هیستونی در کروماتین در حالت وابسته به همانند سازی قرار گرفته و به تقویت مانع ژنتیکی در طی برنامه ریزی مجدد کمک می کند(124). به علاوه، هر دو متیلاسیون هیستون H3K9me2/3 مغلوب و حضور 5MC به عنوان مانعی برای فرایند برنامه ریزی مجدد عمل می کند. در مرحله اولیه برنامه ریزی مجدد، تغییرات ژنومی توزیع H3K4me2 یکی از ابتدایی ترین رویداد هاست(17) و از این روی تغیرات بنیادین در پروموتور اتفاق می افتد. از سوی دیگر، بیان بالای NANOG و بازدارندگی متیلاسیون DNA موجب بهبود مرحله نهایی برنامه ریزی مجدد می شود127). از اینروی، برنامه ریزی مجدد با خاموش سازی ژن های سلول سوماتیک، تقویت پرتوانی و تغییر وضعیت اپی ژنتیکی همراه است. بر عکس، شواهد ارایه شده نشان می دهد که برخی از تغییرات اپی ژنتیکی برای برنامه ریزی مجدد موفق اجباری نیستند. اگرچه متیلوم سوماتیک پس از شروع برنامه ریزی مجدد تغییر می کند، رسوب جدید متیلاسیون، لازم نیست(128). تخلیه Tet1وTet2 موجب کاهش معنی داری در کارایی تشکیل کلنی iPSC می شود(129) اگرچه ان ها تنها برای سلول های سوماتیک تحت MET در طی برنامه ریزی مجدد سلول های بنیادی پرتوان القایی کاملا شفاف سازی شده اند(129).

به منظور شفاف سازی انتقال در طی فرایند برنامه ریزی مجدد، تحلیل قیاسی ESC و سلول های بنیادی پرتوان القایی موش انجام شده و پروفیل های متیلاسیون و رونوشتی مشابه را نشان داد، در حالی که در موارد دیگر، سلول های بنیادی پرتوان القایی مشابه نبود (131). تفاوت بین ESC و سلول های بنیادی پرتوان القایی ناشی از موتاسیون های قبلی در سلول های اصلی یا کشت طولانی مدت یا فناوری برنامه ریزی مجدد می باشند(132). با وکتور های ادغامی، سلول های برنامه ریزی شده مجدد با افزایش تراژنی، ناهمگن می شود(133). با توالی یابی فیبروبلاست پوست الت تناسلی انسان و سلول های بنیادی پرتوان القایی، ناهنجاری ها را می توان به عبور درون شیشه ای برای 7 درصد، موتاسیون در فیبروبلاست های مادری برای 19 درصد و 74 درصد باقی مانده موتاسیون ها در طی برنامه ریزی مجدد سلولی لازم بود. گزارش دیگر نشان داد که شدت جهش در طی برنامه ریزی مجدد 9 برابر بیش از نرخ موتاسیون اولیه در کشت بافت است(134). به علاوه، نرخ تغییرات تعداد رونوشت های ژنومی ارتباط منفی با دوز TF دارد و عوامل مهندسی با عملکرد بالا منجر به نرخ تغییرات تعداد رونوشت های ژنومیک نسبت به TF

sina-pub.ir

ها در دوز یکسان می شود(135).یکپارچگی ژنومی سلول های بنیادی پرتوان القایی موش مبتنی بر برنامه ریزی مجدد با سلول های بنیادی پرتوان القایی موش توسعه یافته از راهبرد های ویروسی مقایسه شده و آن ها بهتر از روش های موجود برنامه ریزی مجدد ویروسی قادر به حفظ یکپارچگی ژنوم بودند(136). اگرچه برخی تحقیقات نشان داده اند که بیشتر تغییرات ژنتیکی در کلون های سلول های بنیادی پرتوان القایی ناشی از برنامه ریزی مجدد نیستند، بلکه نتیجه تاریخچه جهشی ناشی از سلولهای فردی هستند(137). بر این اساس می توان گفت که پایداری ژنوم در سرتاسر برنامه ریزی مجدد امکان پذیر است و امکان تولید سلول های بنیادی پرتوان القایی بدون جهش ژنی با روش های موجود وجود دارد(138). به طور کلی، عبور از موانع اپی ژنتیکی در سلول های سوماتیک برای برنامه ریزی مجدد موفق لازم است با این حال سیستم های تحویل مختلف منجر به تغییرات اپی ژنتیکی در سلول های پرتوان حاصله می شوند.

رویکرد های ادغام کننده	رویکرد های غیر ادغام کننده	بدون وکتور
مرگ سلول	کارایی پایین	کارایی غیر قطعی و نامطمئن
فاکتور های رونویسی باقی مانده	سینتیک کند	توانایی غیر قطعی
خاموش سازی تراژن ها	دامنه باریک اختصاصی عمل کردن سلول	
موتاژنز الحاقی	قابلیت تکثیر ضعیف(صحت پایین)	

شکل 3: موانع موجود بر سر راه سیستم های با و بدون وکتور ها برای تولید سلول های بنیادی پرتوان القایی

نتیجه گیری و مطالعات آینده

برنامه ریزی مجدد سلوماتیک برای اولین بار از طریق سیستم های ژن رسانی به وسیله ادغام ویروس ها حاصل شد برای استفاده و کاربرد این سیستم ها در زمینه بالینی، موانع شامل مرگ سلول ، بیان تراژن ها، ایمنوژنیسیته و موتاژنز الحاقی بایستی برای تولید سلول های بنیادی پرتوان القایی عاری از ویروس و عاری از تراژن، برطرف شوند. یک هدف مهم تحقیقات برنامه ریزی مجدد، حذف یا کاهش ادغام تراژن از زمان ظهور فناوری سلول های

sina-pub.ir

بنیادی پرتوان القایی می باشد. هیچ گونه استاندارد طلایی برای راهبرد برنامه ریزی مجدد سلول های بنیادی پرتوان القایی وجود ندارد زیرا این رویکرد های غیر ادغامی محدودیت هایی نظیر کارایی برنامه ریزی مجدد پایین، سینتیک برنامه ریزی مجدد کند، دامنه پایین اختصاصی بودن سلول و تکرار ضعیف می باشد(79). به این ترتیب، رویکرد های برنامه ریزی مجدد ژن رسانی، از راهبرد های اصلی برای تولید سلول های بنیادی پرتوان القایی برای تحقیقات اولیه هستند. وکتور های قابل حذف، قابل کاربرد برای بیشتر سیستم های مبتنی بر ویروس می باشند: وقتی که کارایی وکتور های حذف شده، miRNA، انتقال پروتین مستقیم و مولکول های کوچک بهبود می یابد، مسیر های جایگزین از رویکرد های مفید برای اجتناب از تغییرات ژنوم می باشد. موانع برای غلبه در همه سیستم ها برای تولید سلول های بنیادی پرتوان القایی در شکل 3 خلاصه شده اند. علاوه بر سیستم های تحویل ذکر شده، این مقادیر تحت تاثیر سن دهنده، ترکیب متفاوت عوامل برنامه ریزی مجدد، انواع سلول های سوماتیک و تعداد سلول های هدف قرار دارند. در عین حال، سیستم های برنامه ریزی مجدد بر موانع اپی زنتیکی غلبه کرده و منجر به اختصارات اپی ژنتیکی می شود. با در نظر گرفتن عوامل ذکر شده برای برنامه ریزی مجدد موجود و موفق، بهینه سازی پروتکل های برنامه ریزی مجدد همراه با تحلیل جامع سلول های بنیادی پرتوان القایی تولید شده امکان تسهیل کاربرد های بالینی فناوری سلول های بنیادی پرتوان القایی و تولید سلول های مطلوب برای پزشکی ترمیمی را می دهد.

خلاصه اجرایی

سیستم های برنامه ریزی مختلف و تولید سلول های بنیادی پرتوان القایی

فناوری سلول های بنیادی پرتوان القایی با سیستم های مختلف برنامه ریزی مجدد بهبود یافته است

کارایی پایین برنامه ریزی مجدد و مراحل اصلاح ژنومیک مانع از کاربرد بالینی سلول های بنیادی پرتوان القایی می شود

یک هدف اصلی تحقیقات برنامه ریزی مجدد، حذف و کاهش ادغام تراژنی از زمان ظهور فناوری سلول های بنیادی پرتوان القایی است

وضعیت اپی ژنتیک و تولید سلول های بنیادی پرتوان القایی

عبور از موانع اپی ژنتیکی در سلول های سوماتیک برای برنامه ریزی مجدد موفق اجباری است

sina-pub.ir

وضعیت اپی ژنتیک را می توان در فرایند برنامه ریزی مجدد تغییر داد

نتیجه گیری و مطالعات اینده

مزایا و معایب سیستم های برنامه ریزی مجدد فعلی به دانشمندان در تولید سلول های بنیادی پرتوان القایی درجه بالینی کمک می کند

پیشرفت و بهبود در زمینه وکتور های فعلی و اکتشاف وکتور های جدید بایستی به طور دقیق مورد بررسی قرار گیرد

مرجع سینا sina-pub.ir