

Konu 2

Reprodüktif Endokrinoloji Perspektifinden Kök Hücreler

Dr. Özgür ÖKTEM

GİRİŞ

Üreme biyolojisinin belkide en temel dogmalarından birisi oogenezin doğumdan önce tamamlandığı ve postnatal memeli over dokusunda yenilenmeyen belli ve fiks sayıda yumurta olduğudur. Ancak ne varki bu doktrin yakın zamanlarda yapılan ve memeli over dokusunda postnatal oogenezinin devam ettiğini gösteren çalışmalar ile sorgulanmaya başlamıştır. Bu bölümde germ hücreden oosit oluşumundan başlanarak germ kök hücre çalışmalarının sonuçları özetlenecektir.

Primordial Germ Hücreleri (PGC)

PGC oositlerin embryonik prekürsörleridir. Uzun zamandır germ hücrelerinin özelleşmesinin (germ cell specification) ekstraembryonik kaynaklı sinyaller vasıtası ile olduğu bilinmekteydi. Örneğin distal epiblast hücresi proksimal bölgeye transplante edildiğinde germ hücrelerine dönüşebilmekte iken, proksimal posterior epibalstlar distal bölgeye nakledildiklerinde sadece somatik hücreler oluşmaktadır [1]. Mevcut görüş PGC'lerin pluripotent proksimal epiblast hücrelerinden ekstraembryonik ektoderm kaynaklı bone morphogenetic proteinler (BMP) 4 ve 8 ile ekstraembryonik endoderm kaynaklı BMP-4 yardımı ile özelleştiği şeklindedir [2,3]. Çok yakın zamanda yapılan bir çalışmada anterior visceral endoderm BMP-4

sinyal yolunu antagonize ettiği bulunmuştur. Ekstraembryonik endodermden salınan BMP-8 anterior visceral endoderm gelişimini kısıtlayarak BMP-4 sinyali ile germ hücre spesifikasyonunu desteklemektedir [4]. Ardından kurucu PGC de önce fragilis isminde bir interferon ile uyarılan bir transmembrane protein aktivasyonu olmaktadır. **Fragilis** daha sonra **stella** isimli bir başka geni aktive ederek pluripotensinin korunup somatik hücre yazgısından kurtulmasını sağlamaktadır. Bunu da somatik hücrelerde bulunan **Hoxa1** ve **Hoxb1** genlerini downregüle ederek yaptığına inanılmaktadır [5]. Stella geni olmayan farelerin oositler vardır ancak fertilizasyon yetenekleri kısıtlıdır. Ayrıca bu proteinden yoksun embryolar nadiren blastokist aşamasına kadar gelmektedirler [6]. Sonraki çalışmalarda bunun neden olduğu ortaya çıkmıştır. Stella olmayan oositlerde tüm genomda anormal demetilasyon izlenmektedir. Normalde fertilizasyondan sonra parental genler arasında metilasyon açısından bir epigenetik asimetri mevcuttur. Yani paternal genler hemen tamamen demetile olurken maternal genler daha sonra ve kısmen olmaktadır. **Stella yokluğunda hem maternal hemde paternal genler demetile olmaktadır** [7].

Özelleşen hücreler ilk olarak ekstraembryonik mesoderm içinde yaklaşık 100 alkalinephosphatase-pozitif hücre olarak 3. gebelik haftasında ortaya çıkmaktadır [8]. Ardından başlayan gonada yolculuk esnasında germ hücreleri sadece hayatta kalmaya çalışmamalı hemde proliferasyon göstermelidirler. Migrasyon esnasındaki proliferasyon ile bu 100 prekürsör hücre gonadal primordiyuma 5-6. haftada ulaştıklarında sayıları bini bulmaktadır [9]. Bir tirozin kinaz reseptörü olan c-kit ve ligandi kit-ligand etkileşimi sayesinde germ hücrelerinin apoptozisten korunup proliferere olabildikleri düşünülmektedir [10]. C-kit PGC üzerinde eksprese olurken göç yolunda kit ligand bulunmaktadır. Yedinci haftaya kadar gonadal dokunun PGC ile kolonizasyonu tamamlanmaktadır. Bu dönemde testisi overden ayırmak mümkün değildir. PGC'lerinin devam eden proliferasyonu bu dönemin bir başka özelliğidir. PGC migrasyonuna neyin sebep olduğu hala tam

memelilerde overde belli ve yenilenmeyen sayıda oosit bulunduğudur. İlk olarak 1870'lerde ortaya atılan bu doktrin 1950'lerde daha da kristallenmiştir [19]. Son yıllarda bir seri çalışmada bu dogma sorgulanmaya başlanmıştır [20-22]. Aslında postnatal oogenezin varlığı 1923'te farede [23], ve 1932'de insan overinde iddia edilmişti [24]. İlki 2004'te yapılan yeni çalışma serisinde ise kemik iliği ve periferik kandan elde edilen germ hücrelerinden oositlerin rejenere olduğu fare modelinde gösterilmiştir. Çalışmalarının çıkış noktası kemoterapi ile overleri sterilize edilmiş farelerde kantitatif olarak sağlıklı ve atretik foliküller sayılmış, kemoterapiden 2 ay sonra kontroller ile arasındaki fark kaybolacak kadar folikül sayılarında hızlı bir artış olduğunu farketmeleridir. Üstelik kemik iliği kök hücre transplantasyonu kemoterapi ile sterilize edilmiş fare overinde oosit yapımını başlatmıştır. Yeşil floresan protein (GFP) eksprese eden transjenik fareden periferik kan kök hücre transplantasyonu sonrası GFP pozitif primordiyal foliküller kemoterapi ile sterilize edilmiş over içinde tespit edilmiştir. Kemik iliği transplantasyonu siklofosamid ile sterilize edilmiş fare overinde fertilitiyi korumuş ancak doğan farelerin hepsi donör germ hücrelerinden menşey almışlardır. Bu sonuçlar bilim camiasında büyük tartışmalar başlatmıştır. Kimileri over yüzey epitelinde bulunan germ hücrelerinin migrasyon göstererek periferik kana geçip kemik iliği hücrelerinde germ hücre belirteçlerinin tespit edilmesinden sorumlu olduğunu iddia ederken [25-26] diğerleri bu hücrelerin aslında immün kaynaklı hücreler olduğunu [27]; folikül sayımlarının yanlış olduğunu [28]; 2 gün gibi kısa bir sürede folikül sayılarının artmaya başlamasının mümkün olmayacağını zira normal fizyolojik şartlarda bu işlemin aylar aldığını belirtmekte [26]; veya insan overinde sağlıklı ve atretik folikülleri sayarak ve moleküler belirteçler bakarak aktif mayoz veya germ hücre yenilenmesi izlediklerini belirtmişlerdir [29]. Tüm bu tartışmalar sürerken çok yakın zamanda oosit ve canlı fare yavruları germ kök hücrelerden elde edilmiştir [30]. Çalışmada germ kök hücreleri fareden izole edilip 6 ay ve daha fazla süre ile

kültüre edilmiştir. Ardından bu hücreler GFP ile transfekte edilmiş ve kemoterapi ile sterilize edilmiş fare overine transplante edilmiştir. Nakledilen bu hücreler oogenez başlatmış ve GFP taşıyan fareler doğmuştur.

Değerlendirme ve sonuç

Bu sonuçlar over dokusunda germ kök hücrelerinin varlığına kuvvetle delalet etmektedir. Halihazırda bu hücrelerin insan overlerinde de olup olmadığını ve/veya prematür menopoza önlemede kullanılıp kullanılmayacağını bilmiyoruz. Anak ilginç olarak klinikte kemik iliği nakli sonrası başarılı gebelik ve canlı doğumlar kanser hastalarında [31], Fanconi anemisinde [32] ve Hodgkin lymphomada [33] bildirilmiş ve olog kök hücre nakli sonrası fertilitenin geri döndüğü rapor edilmiştir [33,34]. Üstelik sağlıklı gönüllülerden alınan kemik iliği örneklerinde germ hücre belirteçleri tespit edilmiştir [21].

Ayrıca embryonik ve somatik kök hücrelerden gametler elde edilmesi kök hücre çalışmalarının devrimsel nitelikte sonuçlara gebe olacağı sinyallerini vermektedir. Germ hücre-oosit ve folikül oluşumu gibi üreme biyolojisinin en temel konularında moleküler düzeyde bilgilerimiz arttıkça infertilitenin çözümü konusunda daha başarılı sonuçlara ulaşılabileceği umudu kuvvetlenmektedir.

KAYNAKLAR

1. Tam, P.P. and S.X. Zhou, The allocation of epiblast cells to ectodermal and germ-line lineages is influenced by the position of the cells in the gastrulating mouse embryo. *Dev Biol*, 1996. 178(1): p. 124-32.
2. Lawson, K.A., et al., Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev*, 1999. 13(4): p. 424-36.
3. Ying, Y. and G.Q. Zhao, Cooperation of endoderm-derived BMP2 and extraembryonic ectoderm-derived BMP4 in primordial germ cell generation in the mouse. *Dev Biol*, 2001. 232(2): p. 484-92.
4. Ohinata, Y., et al., A signaling principle for the specification of the germ cell lineage in mice. *Cell*, 2009. 137(3): p. 571-84.
5. Saitou, M., S.C. Barton, and M.A. Surani, A molecular programme for the specification of germ cell

- fate in mice. *Nature*, 2002. 418(6895): p. 293-300.
6. Payer, B., et al., Stella is a maternal effect gene required for normal early development in mice. *Curr Biol*, 2003. 13(23): p. 2110-7.
 7. Nakamura, T., et al., PGC7/Stella protects against DNA demethylation in early embryogenesis. *Nat Cell Biol*, 2007. 9(1): p. 64-71.
 8. Mc, K.D., et al., Histochemical observations on the germ cells of human embryos. *Anat Rec*, 1953. 117(2): p. 201-19.
 9. Motta, P.M., S. Makabe, and S.A. Nottola, The ultrastructure of human reproduction. I. The natural history of the female germ cell: origin, migration and differentiation inside the developing ovary. *Hum Reprod Update*, 1997. 3(3): p. 281-95.
 10. Donovan, P.J., Growth factor regulation of mouse primordial germ cell development. *Curr Top Dev Biol*, 1994. 29: p. 189-225.
 11. Motta, P.M. and S. Makabe, Elimination of germ cells during differentiation of the human ovary: an electron microscopic study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 1986. 22(5-6): p. 271-86.
 12. Oktem, O. and K. Oktay, The ovary: anatomy and function throughout human life. *Ann N Y Acad Sci*, 2008. 1127: p. 1-9.
 13. Merchant-Larios, H. and B. Centeno, Morphogenesis of the ovary from the sterile W/W^v mouse. *Prog Clin Biol Res*, 1981. 59B: p. 383-92.
 14. Baltus, A.E., et al., In germ cells of mouse embryonic ovaries, the decision to enter meiosis precedes premeiotic DNA replication. *Nat Genet*, 2006. 38(12): p. 1430-4.
 15. Hubner, K., et al., Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science*, 2003. 300(5623): p. 1251-6.
 16. Toyooka, Y., et al., Embryonic stem cells can form germ cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(20): p. 11457-62.
 17. Geijsen, N., et al., Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells. *Nature*, 2004. 427(6970): p. 148-54.
 18. Dyce, P.W., L. Wen, and J. Li, In vitro germline potential of stem cells derived from fetal porcine skin. *Nat Cell Biol*, 2006. 8(4): p. 384-90.
 19. Waldeyer, W., Eierstock und EiEngleman. Leipzig, 1870.
 20. Johnson, J., et al., Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*, 2004. 428(6979): p. 145-50.
 21. Johnson, J., et al., Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. *Cell*, 2005. 122(2): p. 303-15.
 22. Lee, H.J., et al., Bone marrow transplantation generates immature oocytes and rescues long-term fertility in a preclinical mouse model of chemotherapy-induced premature ovarian failure. *J Clin Oncol*, 2007. 25(22): p. 3198-204.
 23. Allen, E., Ovogenesis during sexual maturity. *Am J Anat*, 1923: p. 439- 481.
 24. Simkins, C., Development of the human ovary from birth to sexual maturity. *Am J Anat* 1932. 51: p. 465-505.
 25. Bukovsky, A., et al., Origin of germ cells and formation of new primary follicles in adult human ovaries. *Reprod Biol Endocrinol*, 2004. 2: p. 20.
 26. Bukovsky, A., M. Svetlikova, and M.R. Caudle, Oogenesis in cultures derived from adult human ovaries. *Reprod Biol Endocrinol*, 2005. 3: p. 17.
 27. Eggan, K., et al., Ovulated oocytes in adult mice derive from non-circulating germ cells. *Nature*, 2006. 441(7097): p. 1109-14.
 28. Greenfeld, C. and J.A. Flaws, Renewed debate over postnatal oogenesis in the mammalian ovary. *Bioessays*, 2004. 26(8): p. 829-32.
 29. Liu, Y., et al., Germline stem cells and neo-oogenesis in the adult human ovary. *Dev Biol*, 2007. 306(1): p. 112-20.
 30. Zou, K., et al., Production of offspring from a germline stem cell line derived from neonatal ovaries. *Nat Cell Biol*, 2009. 11(5): p. 631-6.
 31. Sanders, J.E., et al., Pregnancies following high-dose cyclophosphamide with or without high-dose busulfan or total-body irradiation and bone marrow transplantation. *Blood*, 1996. 87(7): p. 3045-52.
 32. Dalle, J.H., M.A. Champagne, and M. Duval, Pregnancy after bone marrow transplantation in Fanconi anaemia. *Br J Haematol*, 2007. 137(1): p. 76; author reply 76.
 33. Oktay, K., Spontaneous conceptions and live birth after heterotopic ovarian transplantation: is there a germline stem cell connection? *Hum Reprod*, 2006. 21(6): p. 1345-8.
 34. Hershlag, A. and M.W. Schuster, Return of fertility after autologous stem cell transplantation. *Fertil Steril*, 2002. 77(2): p. 419-21.