

GİRİŞ

Primer over yetersizliği (POI) , diğer bir tanımlamayla primer ovaryan yetmezlik (POF) , 40 yaşından önce ortaya çıkan , 4 -6 ay süren , sekonder amenore olarak tanımlanmaktadır. LH ve FSH değerleri yükselmiştir (FSH ,40 mIU/ml) , östrojen değerleri de menopozal dönemdeki seviyelere inmektedir . POI insidansı gün geçtikçe artmaktadır , kadınların % 1-3' ünde görülmektedir 2008 . günümüzde POI kadın infertilitesinin ana sebepleri içerisinde ve kadın sağlığını tehdit etmektedir. Bununla birlikte POI tedavisi için etkinliği ispatlanmış tedavi yöntemleri de çok sınırlıdır . Östrojen ,progesteron hormon replasman tedavisi klinikte şu an için postmenopozal semptomları yatıştırmak amacıyla kullanılmaktadır . Oosit donasyonu da fertilitate istemi olan POI hastalarında önerilebilir . Her iki yaklaşımın da uygulamada kendi kısıtlılıkları bulunmaktadır. Hormon replasman tedavisi over fonksiyonlarını sadece arttırabilir tamamen kür sağlamaz . Oosit donasyon tedavisi ise transfer edilen oositlerin **yetmezliği** ile sonuçlanabilir. Bu yüzden hastalığın fizyopatolojisinin daha iyi anlaşılması ,POI ' yi tedavi etmek için yeni yöntemler geliştirilmesini sağlayacaktır .

Kromozomal anomaliler POI ye en sık sebep olan faktör olarak kabul edilmektedir . Klinik pratikte X kromozom anomalileri özellikle de Xq terminal delesyonları en sık karşılaşılan mutasyonlardır . X kromozom delesyonunun primer ya da sekonder amenoreye yol açtığı gösterilmiştir. Bu gözlemler sonucunda normal ovaryan gelişim için gerekli olan genlerin X kromozomuna lokalize olduğu düşünülmektedir. Bunun yanı sıra POI hastalardan yapılan sitogenetik ve moleküler analizlerde POI içi kritik iki bölgede dengeli X kromozom translokasyonları saptanmıştır ; POF1 Xq26-Xqter . Tek genin inaktivasyonu ya da o bölgedeki genlerin zarar görmesi X kromozom gen delesyonlarının ya da translokasyonlarının nasıl ovaryan fonksiyonları etkilediğini açıklayabilir . Buna ek olarak Xq13-Xq21 bölgesindeki heterokromatin reorganizasyonları oosit ve folikül maturasyonu sırasında ekspresyon olan genleri downregüle eder ,bunun da X' e bağımlı POI'nin epigenetik değişimlere bağlı olarak da gelişebileceğini gösterir .

POI hastalarında ovaryan gelişim ve ovaryan fonksiyon devamlılığı ile alakalı genleri ve bölgeleri tanımlamak için X kromozom delesyonları ,translokasyonları ,veya mutasyonları kullanılmıştır. POI ile ilişkili X-bağımlı genler ; DACH-2 , XPNPEP2 ve PGRMC1 , CHM , COL4A6 , POF1B , DIAPH2 , FMR1 . Buna rağmen PGRMC1 ve FMR1 dışındaki genler henüz moleküler pertüberasyonlar açısından araştırılmamıştır . PGRMC1 için mutasyon taraması ve RNA ekspresyon çalışmalarında PGRMC1 deki mutasyonların mikrozomal sitokrom P450 aktivasyonu ve artmış ovaryan hücre apoptozuna sebep olarak POI'ye sebep olabileceği bulunmuştur . FMR1 oositlerde ekspresyon edilir ve RNA bağımlı protein translasyonu sağlar . Bir diğer çalışmada FMR1' in germ hücre proliferasyonunda da fonksiyonu olduğu gösterilmiştir.

POI' deki X bağımlı kromozom anomalilerinde yapılan yaygın çalışmalara rağmen , yeterli ve uygun çalışma modeli olmadığından POI fenotipine bağlı X kromozom anormallikleri ve moleküler mekanizmalar halen netleştirilememiştir. Yapılan çalışmalar selüler yeniden programlama ve olgun hücrelerin indüklenip pluripotent hücreler oluşturularak hastaya özel kök hücre tedavilerinin geliştirilmesini amaçlamaktadır. Bugüne kadar indüklenmiş pluripotent kök hücreler çeşitli hastalıkların tedavisi için kullanılmıştır . Bunlardan bazıları Amyotrofik lateral skleroz , Rett sendromu , spinal kaslar atrofisi , Angelman sendromu ve Timothy sendromudur . Hastalıkla ilişkili hücre tiplerine dönüştüklerinde ,çoğu indüklenmiş pluripotent hücre hastalığa spesifik fenotipler

göstermişlerdir. Bu çalışmada kök hücre diferansiyasyon potansiyelini anlamak için iki terminal Xq delesyonu olan POI hastasından indüklenmiş pluripotent hücre sırası üretilmiştir.

MATERYAL METOD

Hastalar

Bu çalışmaya prematüre ovaryan yetmezliği olan iki hasta dahil edilmiş. Hastaların verdikleri cilt hücre örnekleri, indüklenmiş kök hücre oluşturmak amacıyla kullanılmıştır.

Hasta 1

28 yaşındaki ilk hasta, sekonder amenore tanısıyla refere edilmiş bir hastadır. İlk periodunu 14 yaşında geçirmiş ve 23 yaşına kadar düzenli adet görmüş olan bu hastanın 23 yaşında açıklanamayan amenore başlangıcı olmuş. Laboratuvar değerlendirmesinde artmış FSH düzeyi (64.59 mIU/ml) ve normal sınırlarda LH ve östriol düzeyi görülmüş.

Hasta 2

34 yaşındaki ikinci hasta, sekonder amenore tanısıyla refere edilmiş bir hastadır. İlk menarş yaşı 14 olan bu hasta 15 yaşına kadar düzensiz adet görmüş ve amenore ilk olarak 17 yaşında baş göstermiş. Laboratuvar değerlendirmesi artmış serum FSH ve azalmış serum östriol seviyeleri göstermiş. Dış genital yapıları normal olan bu hastanın pelvik ultrasonografisinde iki taraflı küçük overler ve küçük uterus izlenmiş. Kromozom analizi ise 46, X, del(X)(q26)9qh+ karyotipini doğrulamış.

Hücre hazırlanması

Hastaların cilt fibroblastları lokal anestezi ile insizyonel biyopsi şeklinde alınmış. Alınan hücreler uygun mediumlarda yerleştirilmiş ve kültürde üreme sağlanmış. Daha sonra üreyen hücreler lentiviral vektörlerle enfekte edilmiş. Enfekte hücrelerden indüklenmiş kök hücrelerin elde edilmesi için, hücreler hibrid kültür ortamında bekletilmiş ve radyasyona maruz bırakılmış fare embriyonik fibroblastlara aktarılmış. Kültür mediumları her gün uygun maddelerle replase edilmiş ve yenilenmiş. Hücrelerin enfekte edilmesinden 15-20 gün sonra hücre kılanları seçilmiş ve uygun mediyuma koyulmuş. VASA-GFP ekspresyonu yapan ve yapmayan hücreler ayrılmış ve in vitro germ hücre oluşturmaları için 12 gün indüklenmiş. İndüklenen hücreler floresans aktive hücre ayırıcı (FACS) ile ayrılmış ve VASA proteini ekspresyonu, erken germ hücre markerları ve Xq26.3-q28 arasında bulunan genlerin varlığı için incelenmiş.

İstatistiksel analiz

Bağımsız değişkenler için t testi ortalama değerlerinde karşılaştırılması için kullanılmıştır. Değişkenliğin homojenliğini bağımsız değişkenler için t-testinden önce analiz edilmiş. İstatistiksel anlamlılık için P değeri, 0.05 olarak kabul edilmiş ve P değerleri çift kuyruklu olarak kabul edilmiş.

SONUÇLAR

*iPSC tanımlama ve türetme

POI(prematür ovaryan yetmezlik) olan iki hastanın doku örneklerinden fibroblast hücre sırası oluşturulup, normal insan fibroblastları hEF, POI olanlar POI ve POI2 olarak tanımlandı. İPSC oluşturmak için lentivirüslerle insan OCT4, NANOG, SOX2, LIN28 genleri içeren fibroblast hücreleri ile temas ettirildi. 20 gün sonra hESCs(insan embriyonik kök hücre) görünümde 3 hücre kültürü elde edildi. Üç kültür de benzer karakterdeydi. Hepsinde AKP(alkalin fosfataz) aktivitesi pozitif olup, nükleer transkripsiyon faktör olarak OCT4, pluripotent spesifik yüzey antijen olarak SSEA4 ve TRA-I-60 eksprese etmekteydi. Üç hücre kültüründe de yüksek telomeraz aktivitesi saptandı ki bu hücrelerin ölümsüzlük yeteneğine sahip olması demektir. Ancak bu hücrelerin kendini yenileme ve POI hastaları ve sağlıklı donör hücrelerinden yeniden programlama markerlarına bakılmamıştır. Ancak bu hücrelerin gelişim potansiyeli değerlendirildi. iPSC hücre kolonlarının üçü de tüm primer germ tabakalarına dönüşme potansiyeline sahipti. İPSC klonlarının kenini reprogramlama özelliğine bakıldığında kendi karyotipini koruduğu bu açıdan kromozomal stabiliteye sahip oldukları gözlemlendi.

*iPSClerin VASA-GFP dönüşümü ve germ hücre farklılaşma indüksiyonu

Önceki çalışmalarda VASA özellikle germ hücrelerde eksprese edildiğinden bahsedilmiştir. Buna dayanarak GFP ile konjuge VASA ları farklılaşmamış iPSClerle birleştirdik ve 15 gün sonra sublinelar hazırladık. Sonuç olarak bu sublineların orijinal fibroblast karyotiplerini koruduğunu gördük. Sublineların germ hücrelere farklılaşma olasılığını keşfettikten sonra VASA-GFP habercisini karışık hücre kültürlerinden germ hücreleri saflaştırmada kullandık. Sonuçlar erken evre germ hücrelerin farklılaşabildiğini ve izole edilebildiğini gösterdi.

*Xq26.3-q28 deki gen ekspresyonu

Kromozom analizleri POI hastalarında Xq26.3-q28 genlerinde delesyon olduğunu göstermiştir. Sonuçlarda X kromozom delesyonunun dedelesyona uğramış bölgede lokalize olan kök hücre diferansiyasyonu ile ilgili genlerin ekspresyonunda değişime sebep olabilmektedir.

TARTIŞMA

X kromozomu mikrodelesyonu olan POF hastalarında iki adet iPSC dizisi oluşturduk. Bu iPSC ler bir çok açıdan hESC ler ile benzerdi.(örn:morfoloji,in vitro diferansiyasyon, teratoma formasyonu ,pluripotent genlerin ekspresyonu) Ayrıca POF-iPSC lerin BMP4 ve Wnt3a eklenmesi ile germ hücrelere dönüşebileceğini doğruladık. Bu çalışma bilgilerimiz dahilinde, POF lulardaki iSPC lerin germ hücrelere dönüşebilme potansiyelinin gösterildiği ilk çalışmadır. Bu çalışmadan elde edilen bulgular POF un moleküler mekanizmasının aydınlatılması hakkında önemli bilgiler vermesi ile beraber gelecekte uygulanabilecek tedaviler için ön ayak olmuştur.

Lentiviral 4-faktör sisteminin somatik hücreleri yeniden programlayabildiği gösterilmiştir. Bu sistemi kullanarak POF lulardan iPSC leri ve sağlıklı fibroblastları %0.01 den az etkinlikle oluşturduk. Ayrıca analiz edilen her iPS klonunun 5 ila 13 kopyada her faktörden içerdiği ve bu 4 faktörü oluşturan kopyaların da oranlarının her iPS klonu için değiştiğini bu çalışmada gösterdik. Fakat pluripotensi ve kendini yenileme yeteneği olarak bu iPSC dizileri arasında fark bulamamız çalışmada dikkat çekmiştir. Analiz ettiğimiz 3 iPSC dizisi uzun süreli kültür ve tamamen yeniden kodlanması için seçildi ve bu esnada entegre faktörlerin sessizleştiği ve böylece iPS karakterini

etkileyebildiği düşünöldü. Bu sonuçlar stabil hale gelen yeniden programlanabilen hücrelerdeki tüm 4 transgenik genin sessizleştirdiğini gösteren RT-PCR sonuçları ile uyumluydu . Bu iPSC hücreleri etkili bir şekilde yeniden programlanabilir ve 4 transgenin ekspresyonuna bağılı olmadan kendini yenileyebilir. VASA(in vivo olarak germ cell marker) nin spesifitesi stabil VASA-GFP röportörünün hESC veya iPSC transfeksiyonunu sağılar. Bazı çalışmaları ise VASA-GFP röportörü belirteçlerinin germ hücrelerine efektif olarak in vitro ortamda diferansiye olduğunu göstermiştir. Bizim çalışmamızda POI1-iPS-V.1,POI2-,PS-V.1 ve hEF-iPS-V.1nin hepsi diferansiasyon sonrası 12.günde yeşil flurosanlı hücreler oluşturmuş ve GFP –pozitif hücrelerin yüzdesi POI-iPS-V.1 ve POI2-iPS-V.1 arasında aynı olarak görülürken hEF-iPS-V.1 e göre daha az oranda görölmüştür. Bu sonuç parsiyel Xq delesyonunun, germ hücre diferansiasyon potansiyelini azaltmasına bağılı olarak olabilir. Fakat bazı araştırmacılar genetik farklılıklar ve yeniden programlama işlemlerine bağılı olarak ortaya çıkan hücrese farklılıkların bireysel iPSC dizilerinin değışken biyolojik durumların oluşmasına neden olduğunu belirtmişlerdir.(Bock ve ark.2011;Boulting ve ark. 2011;Kim ve Svendsen ,2011) Sonuç olarak daha fazla iPSC dizisinin ,daha gerçekçi yeniden programlanabilen iPSC bağımlı hasta modeli oluşturabilmek açısından değıerlendirilmesi gerekir .Bizim sonuçlarımız 2 iPSC dizisinin 2 farklı POF hastasından alınması ile elde edilmiştir. Böylece germ hücrelere dönüşme potansiyeli daha az olan iki dizi ,kromozomal anomalilerin muhtemel etyoloji içinde olabileceğini düşündürmektedir.

POF kadınlarda daha önce yapılan X kromozomunun sitogenetik ve moleküler karakterizasyonu POI da iki kritik bölge olduğunu göstermiştir:POI1 Xq26-q28 ve POI2 Xq13.3-q22(Sala ve ark.1997;Portnoi ve ark.2006 ;De Vos ve ark.2010;İlao ve ark.2012) Birçok çalışmada POF için bir grup muhtemel gen tanımlanmıştır:bunlar FMR1(309550)(Coulam ve ark1986),FMR2 (300806)(Persani et al. 2010),POF1B (300603)(Dixit ve ark.2010) ve DACH2(300608)(Berletch ve ark.2011)Fakat bu genlerin ovaryan fizyolojideki fonksiyonları hala tam açıklanamamakta ve bu genler POF ve X kromozomu delesyonu arasındaki korelasyonu açıklamakta yetersiz kalmaktadır. Ferreira ve ark(Ferreira ve ark.2010) POF fenotipine neden olan moleküler mekanizmanın over bağımlı genlerdeki haployetersizliğin silinmiş bölgelerde ve başarısız X inaktivasyonu sonucu olduğunu öne sürmüşlerdir. Biz burada X kromozomundaki silinmiş bölgelerde bulunan bazı genlerde ekspresyon seviyesinde POI-iPSC bağımlı PGC lerde belirgin azalma olduğunu gösterdik ki daha önceki çalışmalarda diferansiye germ hücrelerinde yüksek ekspresyon gösterilmiştir.(Tilgner ve ark .2010) Böylece biz bu genleri POF için aday genler olarak öne sürebiliyoruz. RBMX aktif bir X kromozomu olmakla beraber Y kromozomundaki RBMY nin homologudur ve POF de kritik bir yere sahiptir.(Xq26.3)(Delbridge ve ark.1999)RBMX spermatogenezde erkek spesifik fonksiyonları sağılar.(Abid ve ark.2013)RBMX delesyonu azospermi veya ciddi oligospermi ile karakterizedir. RBMX ekspresyonu bialleliktir ve X kromozomu inaktivasyonundan kaçır.(Delbridge ve ark 1999)Bu bize Xq26.3-q28 delesyonunun azalmış RBMX ekspresyonuna yol açabileceğini gösterir. RBMX in hücre bölünmesinde rolü vardır ve belki de apoptozis ile de bağılantılı olabileceğı düşünölmektedir.(Adamson ve ark 2012;Matsunaga ve ark.2012)Bu çalışmada , POI-iPSC ler azalmış germ hücre diferansiasyon potansiyeli ve normal iPSC lerle karşılaştırıldığında azalmış FAM122C,RBMX ve IKBKG ekspresyonu göstermişlerdir. Bu fenotipin en az parsiyel olarak 3 gen gerektirip gerektirmediğinin belirlenmesi için ileri çalışmaları gerekmektedir.

Sonuç olarak ,bizim sonuçlarımız insan germ hücrelerinin POI-iPSC lerden diferansiye edilebileceğini ve izole edilebileceğini göstermiştir. Ayrıca POI-iPSC lerden diferansiye olan GFP-pozitif hücrelerin azalmış FAM122C,RBMX ve IKBKG ekspresyonu yaptıklarını ,ve bu hücrelerin X kromozomunun silinmiş bölgesinde bulunduğunu ve normal iPSC lerle karşılaştırıldığında diferansiye germ hücrelerinde daha yüksek oranda ekspresyon yaptıklarını gözlemledik. POI-iPSC lerin

uygunluğu ve kullanılabilirliği bu hasta modelinde bizim POF tanısı koymamızda ,anlamamızda ve tedavisinde olan bilgilerimizi arttırmıştır.