ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Shabnam MOHARAMJOODİ

FARE EMBRİYONİK FİBROBLASTLARINDAN ELDE EDİLEN HÜCRELERE AİT KİSSPEPTİN VE NÖROKİNİN GEN EKSPRESYONLARININ PASAJ SAYISIYLA İLİŞKİSİ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA-2021

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARE EMBRİYONİK FİBROBLASTLARINDAN ELDE EDİLEN HÜCRELERE AİT KİSSPEPTİN VE NÖROKİNİN GEN EKSPRESYONLARININ PASAJ SAYISIYLA İLİŞKİSİ

Shabnam MOHARAMJOODİ

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Mehmet Bertan YILMAZ
Yıl: 2021Sayfa:83
Jüri : Prof. Dr. Mehmet Bertan YILMAZ
: Prof. Şule Sultan MENZİLETOĞLU YILDIZ
: Dr. Öğr. Üyesi Merve ÇAPKIN YURTSEVER

Fare embriyonik fibroblast (MEF), hücrelerinin kültürü, kolay erişilebilirliği, çoklu büyüme hızları ve çok sayıda deney yapılabiliyor olması nedeni ile gen işlevlerini test etmek için güçlü bir yöntemdir. Fare embriyonik fibroblast hücrelerinin indüklenmiş kök hücrelere dönüşebilme kapasitesinin yüksek olması ve ayrıca embriyonik dokulardan kolay elde edilebilir olmaları bunların tedavi amaçlı kullanımlarının önünü açmıştır. Pek çok hastalığın tedavisinde kullanılmak üzere ilaç keşfi için fayda sağlayacağı düşünülmektedir. Bu hastalıklardan bir tanesi puberte dönemindeki aksaklıklardır. Puberte dönemine geçiş sürecinde kisspeptin ve nörokinin protein ailesi etkin rol oynamaktadır. Bu çalışmada fare embriyonik dokulardan elde edilen fibroblast hücrelerine ait kisspeptin ve nörokinin gen ekspresyonlarının pasaj sayısıyla ilişkilendirilmesi gerçekleştirilmiştir. Çalışmamız pubertal bozukluğa sahip olan hastalarda pluripotent kök hücrelere indüklenme kapasitesi yüksek embriyonik fibroblast hücrelerini kullanarak ilaçsız ve minimal immün reaksiyona sahip bir tedaviyi amaçlamaktadır. Aynı zamanda ilerleyen dönemlerde bu yöntemin tedavi şekli açısından ülke ekonomisine katkı sağlayabileceğini düşünmekteyiz. Embriyo fibroblast hücrelerinin pubertal bozukluk tedavisinde kullanılmasıyla ilgili çok fazla çalışma bulunmadığından ve yeterli kaynak olmadığından dolayı yaptığımız çalışmanın bu boşluğu doldurmaya katkı sağlayabileceğine inanmaktayız. Bu çalışmada Embriyonik fibroblast hücre kültürü oluşturulmuştur, kültürün devamlılığı sağlanmıştır (pasajlanması) ve farklı pasaj dönemlerinde kisspeptin ve nörokinin gen ekspresyonları belirlenmiştir. Amacımız pluripotent kök hücrelere dönüşebilme kapasitesi yüksek MEF'lerde kisspeptin ve nörokinin ekspresyonlarını belirleyerek bunların özellikle pubertal hastalıkların kök hücre bazlı tedavisi için uygunluğunu araştırmaktır. MEF'lerde Kisspeptin ve Nörokinin ekspresyon tespit edilmedi fakat her ikisine de yönelik reseptörleri KISS1R ve TACR2 reseptör eksprese olduğunu ve bu ekspresyonunda pasaj sayısına bağlı olarak azaldığını tespit ettik.

Anahtar Kelimeler: Fare embriyonik fibroblast, kök hücre, kisspeptin, nörokinin

ABSTRACT

MSc THESIS

THE RELATİONSHİP OF KİSSPEPTİN AND NEUROKİNİN GENE EXPRESSİONS OF CELLS OBTAİNED FROM MOUSE EMBRYONİC FİBROBLASTS WİTH THE NUMBER OF PASSAGES.

Shabnam MOHARAMJOODİ

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY

Supervisor : Prof. Dr. Mehmet Bertan YILMAZ
Year: 2021, Pages: 83
Jury : Prof. Dr. Mehmet Bertan YILMAZ
: Prof. Şule Sultan MENZİLETOĞLU YILDIZ
: Asst. Prof. Dr. Merve ÇAPKIN YURTSEVER

Mouse embryonic fibroblast (MEF), The culture of cells is a powerful method for testing gene functions because of its easy accessibility, multiple growth rates, and multiple experiments. The high capacity of mouse embryonic fibroblast cells to transform into induced stem cells and their easy availability from embryonic tissues have paved the way for their therapeutic use. It is thought to be beneficial for drug discovery to be used in the treatment of many diseases. One of these diseases is disruptions in puberty. Kisspeptin and neurokinin protein family play an active role in the transition to puberty. In this study, the association of kisspeptin and neurokinin gene expressions of fibroblast cells obtained from mouse embryonic tissues with the number of passages was performed. Our study aims at a drug-free treatment with minimal immunoreaction using embryonic fibroblast cells with high capacity to induce pluripotent stem cells in patients with pubertal disorders. At the same time, we think that this method may contribute to the country's economy in terms of treatment method in the future. Since there are not many studies on the use of embryo fibroblast cells in the treatment of pubertal disorder and there are not enough resources, we believe that our study can contribute to filling this gap. In this study, embryonic fibroblast cell culture was established, the culture was maintained (passage) and Kisspeptin and neurokinin gene expressions were determined at different passage periods. Our aim is to determine kisspeptin and neurokinin expressions in MEFs with high capacity to transform into pluripotent stem cells and to investigate their suitability for stem cell-based treatment of pubertal diseases. Expression of Kisspeptin and Neurokinin could not be detected in MEFs, but we found that both directionality receptors KISS1R and TACR2 receptors were expressed and this expression decreased depending on the number of passages.

Keywords: Mouse embryo fibroblast, stem cell, kisspeptin, neurokinin

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Cinsel gelişim, artan doğrusal büyüme ve adrenal olgunlaşmayı içeren karmaşık bir biyolojik süreç olan ergenlik, hipotalamus gonadotropin salgılatıcı hormon salgılandığında başlar (Stephanie B. Seminara ve Wendy Kuohung, october 23, 2003). Ergenlik, uyarıcı sinyallerin artması ve GnRH nöronları üzerindeki engelleyici ipuçlarının azalmasıyla başlar, bu da hipotalamustan pulsatil GnRH salınımında sürekli bir artışa neden olur. Artan GnRH, aşağı akış bileşenlerini uyarır, bunun da tümü doğurganlığa katkıda bulunan gonadotropinler ve cinsiyet hormonlarında, gametogenezde, ikincil cinsiyet özelliklerinde ve hızlı gelişmede bir artışa neden olur.

Ergenlik başlangıcı, genetik ve çevresel değişkenleri yani gen-çevre etkileşimleri tarafından yönetilir. Erkekler ve kadınlar arasında farklılık gösterir. Hipogonadotropik hipogonadizm hastalarında GPR54 genindeki mutasyonların inaktive edilmesiyle kanıtlandığı gibi, kisspeptinler ve ilişkili reseptörleri düzgün bir şekilde etkileşime girene kadar puberte gerçekleşmeyecektir (Zeydabadi Nejad ve ark., 2017).

Kisspeptinler, Kiss-1 geni tarafından transkribe edilen bir öncül proteinden türeyen, hipotalamo-hipofizer-gonadal aksı etkileyerek puberte ve fertilitede önemli roller üstlendikleri düşünülen, farklı aminoasit uzunluklarındaki peptidlerdir (Jayasena ve ark., 2009; Özlem Nalbantoğlu1, 27.02.2019). Günümüzde, kisspeptinlerin hipotalamik salınımları sonucunda, gonadotropin salgılatıcı hormonun (GnRH) etkinliğinin artmasının puberte başlangıcındaki tetikleyici mekanizmanın önemli bir parçası olduğu düşünülmektedir. İnsanlarda, GPR54 reseptörünün özellikle plasenta, hipofiz, pankreas ve medulla spinaliste yüksek oranlarda eksprese edildiğinin görülmesinden dolayı endokrin fonksiyonları olabileceği düşünülmüştür (Jayasena ve ark., 2009; Özlem Nalbantoğlu1, 27.02.2019). Günümüzde, bir metastaz baskılayıcı gen olarak bilinen KISS-1 geninin kodladığı ve C terminallerinde ortak RF-amid (Arg-Phe-NH2) dizileri

taşıyan 54, 14, 13 ve 10 aminoasitlik bir dizi proteinin, GPR54 reseptörüne bağlanarak agonist etki gösterdikleri bilinmektedir (Plant, 2006). GPR54 mutasyonları sonucunda seksüel gelişim, üreme ve fertiliteyi etkileyen tüm farklı fenotipik gelişim bozuklukları, kisspeptin-GPR54 sisteminin GnRH nöronlarının aktif olduğu, fetal gelişim, neonatal yaşam, puberte ve erişkinlikte de gerekli olduğunu düşündürmektedir (Chan ve ark., 2009).

Kisspeptinlerin, GnRH bağımlı LH ve FSH salınımına neden oldukları GPR54 mutasyonlu fareler yanında sıçanlarda da gösterilmiş ve periferik yolla verilen metastinin (Metastin, insan plasentasından G-protein-bağlı plasentanın aynı kökenli ligandı olarak izole edilmiş yeni bir peptittir reseptör OT7T175 veya GPR54) dişi ve erkek sıçanlarda gonadotropin düzeylerini arttırdığı, prepubertal dişilerde ovülasyona neden olduğu bildirilmiştir (V M Navarro 1, 2005 Jan 6) (Matsui ve ark., 2004).

Hipotalamusta GnRH salınımı ile ilgili olduğu belirlenen bir diğer protein ise Neurokinindir. Bu sinyal peptidi taşikinin ailesinin bir ailesi olup omurgalı ve omurgasızlarda hücre içi sinyalizasyonda görev alır. İnsanda en iyi bilinen taşikininler substance P(SP),nörokinin A (NKA) ve nörokinin B'dir(NKB). Bunların hepsi yaygın olarak merkezi sinir sisteminde sentezlenirler. Substance P ve NKA'nın genelde nosisepsiyonda fonksiyonel olduğu düşünülürken, insan üreme ekseninde rol oynadığı belirlenen NKB ve reseptörü NK3R'yi kodlayan sırasıyla TAC3 ve TACR3 genleri insan ve kemirgenlerin (fare homoloğu TAC2 ve TACR2) merkezi sinir sisteminde yaygın olarak eksprese edildiği gibi böbrek, iskelet kası, akciğer ve diğer dokularda da sentezlenebilmektedir. Yakın zamanda yapılan nöroanatomik çalışmalarda NKB'nin özellikle infundibulumda bulunan hipotalamik nöronlarda özellikle cinsiyet stereoidlerine cevap oluşturan hipotalamusun arkuat nükleusunda sentezlendiği gösterilmiştir(Topaloglu ve Semple, 2011).

NKB ve reseptörü arkuat nükleusunda özellikle negatif geri bildirim mekanizmasına dayalı östradiol bağımlı GnRH salınımında aktif olarak rol

oynamaktadır (Ali Kemal Topaloglu 1, 2010 Aug; Topaloglu ve Semple, 2011). Bu patofizyolojik benzerliklerin yanı sıra arkuat nükleusunda NKB ve kisspeptin ekspresyonunun aynı hücrelerde rastlanması bunların yakın ilişki içerisinde olabileceklerini göstermektedir. Nitekim fareler üzerinde yapılan çalışmalarda NKB agonistinin kisspeptin ekspresyonunu arttırdığı ve dolayısıyla GnRH ve akabinde LH salınımını etkilediği gösterilmiştir (Lehman ve ark., 2010) (Cheng ve ark., 2010). Fakat TAC3 ve TACR3'ün fonksiyonu hakkındaki asıl gelişme Topaloğlu ve grubunun çalışmalarıyla ortaya çıkmıştır. Bu grup TAC3 ve TACR3 mutasyonu olan bir hastada hipogonadotropik hipogonadizm ve infertilite gözlendiği dolayısıyla bu proteinlerin pubertenin kontrol noktasında anahtar rol oynadığını belirlemişlerdir (Topaloglu ve ark., 2009) (A. Kemal Topaloglu, february 16, 2012). Fibroblastlar, çeşitli lokasyonlara, farklı görünümlere ve farklı aktivitelere sahip mezenkimal kökenli bir heterojen yerleşik hücre gurubudur. Doku hücreleri olarak her yerde dağılmaları nedeni ile, bu hücreler yeni aktive olmuş doğuştan vücutta bulunan immün hücreler tarafından salgılanan faktörlere yanıt vermeye ve dolayısıyla iltihaplanma ve bağışıklık sistemini incelemek için yararlı bir araç haline getirilmeye çalışılmaktadırlar (Qiu ve ark., 2016).

Fare embriyonik fibroblastlar (MEF), hücrelerinin kültürü, kolay erişilebilirliği, çoklu büyüme hızları ve çok sayıda deney yapılabiliyor olması nedeni ile gen işlevlerini test etmek için güçlü bir yöntemdir (Singhal ve ark., 2016) (Qiu ve ark., 2016). Fare embriyonik fibroblast hücrelerinin indüklenmiş kök hücrelere dönüşebilme kapasitesinin yüksek olması ve ayrıca embriyonik dokulardan kolay elde edilebilir olmaları bunların tedavi amaçlı kullanımlarının önünü açmıştır. Pek çok hastalığın tedavisinde kullanılmak üzere ilaç keşfi için fayda sağlayacağı düşünülmektedir. Bu hastalıklardan bir tanesi puberte döneminde yaşanan aksaklıklardır. Puberte dönemine geçiş sürecinde kisspeptin ve nörokinin protein ailesi etkin rol oynamaktadır (Lian-Qun Qiu*, Jul 05, 2016).

Kök hücreler, sınırsız çoğalabilme (Luciana Machado, June 27, 2013), kendilerini yenileyebilme, kendilerinden başka hücrelere farklılaşabilme ve hasarlı

dokuya verildiğinde dokuyu onarabilme özellikleri ile tanımlanan hücre tipidir (Biehl ve Russell, 2009) . Bol miktarda bulunmaları, kolay elde edilebilmeleri, birçok hücre tipine farklılaşarak çoğalabilmeleri, otolog veya allojenik alıcılara güvenli ve etkin bir şekilde nakledilebilmeleri nedeniyle rejeneratif tıp uygulamalarında tercih edilmektedir. Kök hücreler farklılaşma kapasitelerine göre totipotent, pluripotent, multipotent, oligopotent ve unipotent olarak adlandırılır (Can, 2008; Luciana Machado, June 27, 2013). .

Bu bağlamda amacımız pluripotent kök hücrelere indüklenme kapasitesi yüksek MEF'lerde kisspeptin ve nörokinin ekspresyonlarını belirleyerek bunların özellikle pubertal hastalıkların hücre bazlı tedavisi için uygunluğunu araştırmaktır.

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım sırasında bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren, yardımlarını, zamanlarını ve hoşgörülerini eksik etmeyen, saygı değer hocalarım Sayın Prof. Dr. M. Bertan YILMAZ'a Sayın Doç. Dr. Mostafa NORIZADEH TAZEHKAND ve bu süreçte yardımlarını esirgemeyen Hale ÖKSÜZ'e laboratuvar çalışmalarım sırasında her türlü desteği gösteren değerli arkadaşlarim Seda AKBOLAT ve Semiha DOĞAN'a , tezimin tüm aşamalarında yanımda olan ve her türlü yardımı gösteren sevgili arkadaşlarıma desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

İyi ve kötü günlerimde varlığıyla mezun olmamı kolaylaştıran Dr. Raz Mohammad Morshid'e ve hayatımın her anında yanımda olan, sonsuz sevgi ve desteklerini her daim hissettiren aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ I
ABSTRACT II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET III
TEŞEKKÜR VII
İÇİNDEKİLER VIII
ÇİZERGELER DİZİNİ XII
ŞEKİLLER DİZİNİ XIV
GRAFİKLER DİZİNİ XVI
SİMGELER VE KISALTMALAR XVIII
1. GIRIŞ 1
1.1. Fibroblast 1
1.2. Fare embriyonik fibroblast (Mouse embryonic fibroblast; MEF) 2
1.3. Kisspeptin 3
1.3.1. Bağlam ve tarihçe: 3
1.3.2. Kisspeptin ve Cinsiyet Farklılaşması 7
1.3.3. Kisspeptin ve Ergenlik (puberte) 8
1.3.4. Hipofizde Kisspeptin 9
1.3.5. Yumurtalıkta Kisspeptin 10
1.3.6. Kisspeptin ve Gebelik 11
1.3.7. Kisspeptin ve Laktasyon 11
1.3.8. Kisspeptinin Epigenetik Düzenlenmesi 11
1.4. GnRH üretiminin düzenlenmesi 12
1.5. Neurokinin 13
1.5.1. Hipogonadotropik hipogonadizmde TACR3 ve TAC3'teki mutasyonlar 15
1.5.2. İnsanlarda NKB etkisinin kaybının fizyolojik sonuçları 17
1.5.3. NKB ve ergenlik zamanlamasında ortak genetik varyasyon 18

1.5.4. Kemirgenler 19
1.5.5. NKB ve GnRH puls üreteci 20
1.6. Kök hücre 23
1.6.1. Kök Hücre Kaderleri 26
1.6.2. Kök Hücre Kaynakları 27
1.6.3. Kök Hücreleri Tanımlayan Özellikler 29
1.6.4. Farklılaşma 30
1.6.5. Embriyonikli Olanlar 33
1.6.5.1. Embriyonik kök hücreler 33
1.6.5.2. Embriyonik Germ Hücreleri 34
1.6.5.3. Amniyotik Epitel Hücreleri 34
1.6.5.4. Amniyotik Sıvıdan Kaynaklanan Kök Hücreler 35
1.6.5.5. Göbek Kordon Kanı Kök Hücreleri 35
1.6.6. Embriyonik Olmayan 36
1.6.6.1. Kemik İliği Hematopoetik Kök Hücreler 36
1.6.6.2. Kemik İliği Stromal Kök Hücreler 36
1.6.6.3. Multipotent Yetişkin Progenitör Hücreler 37
1.6.6.4. Mezenkimal Kök Hücreler 37
1.6.6.5. Sinir Kök Hücreleri 37
1.6.6.6. Pankreas Kök Hücreleri 38
1.6.6.7. Cilt Kök Hücreleri 38
1.6.6.8. Kardiyak Kök Hücreler 39
1.6.6.9. Yağ Kök Hücreleri 39
1.6.6.10. Olfaktör Yetişkin Kök Hücreler 40
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 41
3. MATERYAL VE METOD 49
3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Kitler 49
3.2. Prosedür 50
3.3. RNA İZOLASYONU: 55

3.4. cDNA ya Çevirme....56
3.5. Kültür Ortamı....57
3.6. RNA izolasyonu ve kantitatifreal-time RT-PCR....57
3.7. Kullanılan Cihazlar....59
3.8. Hücrelerin Pasajlanması....59
3.9. Hücrelerin Dondurulması....60
4. BULGULAR VE TARTIŞMA....61
4.1. Bulgular....61
4.2. Grafikler....66
4.3. Tartışma....69
5. SONUÇLAR....75
KAYNAKLAR....77
ÖZGEÇMİŞ....83

ÇİZERGELER DİZİNİ **SAYFA**

Çizelge 4.1. P1 gen ekspresiyon sonuçları.....61
Çizelge 4.2. P2 gen ekspresiyon sonuçları.....62
Çizelge 4.3. P3 gen ekspresiyon sonuçları.....63
Çizelge 4.4. P4 gen ekspresiyon sonuçları.....64
Çizelge 4.5. P5 gen ekspresiyon sonuçları.....65

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 1.1. Yabanil embriyo gelişimi sırasında hücreler, yabanil embriyo gelişimi sırasında döllenmiş yumurtadan blastosiste, gastrulaya kadar çoğalır ve gelişir. Pluripotent, embriyonik kök hücreler, blastosistin iç hücre kütlesinden elde edilir. Multipotent kök hücreler, gelişmekte olan gastrulada bulunur veya pluripotent kök hücrelerden türetilir ve yalnızca ilgili germ tabakasındaki hücrelere yol açmakla sınırlıdır 25

Şekil 1.2. İnsan Blastokisti 34

Şekil 3.1. Çiftleşme plag göründükten 13-14 gün sonra dişi farelerden embriyolar alınır. Bu noktada, dişi açıkça hamile olmalıdır 51

Şekil 3.2. Deride bir kesi yapmak için makas kullanın, ardından cildi iki elinizle kavrayın ve karın duvarını ortaya çıkarmak için çekin. Farenin ayaklarını bant (veya pimler) (veya altlık) ile tahtaya sabitleyin 51

Şekil 3.3. Embriyoları yeni bir PBS plakasına aktarın; her üç embriyo için ayrı ayrı PBS bulunan falcon kullanılmalıdır. Embriyolardan kanı çıkarmak için falconu döndürün 52

Şekil 3.4. Bir elinizle forseps ile bir embriyo alın ve diğer elinizle gözlerinin üzerinden başını kesin. İkinci bir forseps ile kırmızı dokuyu (kalp ve karaciğer) çıkarın. Petri kabını yüzde 0,25 tripsin-EDTA ve embriyonun geri kalanıyla doldurun..... 53

Şekil 3.5. Embriyoların tamamı ayrıldıktan ve tripsin kaplı petri kabına yerleştirildikten sonra, onları makasla dilimleyin ve bir neşter bıçağı veya tıraş bıçağı kullanarak dokuyu 1-2 mm'lik parçalar halinde doğrayın. 10 ml'lik bir pipetle birkaç kez yukarı ve aşağı pipetleyin, ardından plakayı 37 °C'de 10 dakika doku kültürü inkübatörüne yerleştirin..... 53

Şekil 3.6. Bu ilk pasaj 54
Şekil 4.1. Fare embriyonik fibroblastlarından elde edilen hücreler(pasaj 1) 61
Şekil 4.2. Fare embriyonik fibroblastlarından elde edilen hücreler(pasaj 2) 62
Şekil 4.3. Fare embriyonik fibroblastlarından elde edilen hücreler (pasaj 3) 63
Şekil 4.4. Fare embriyonik fibroblastlarından elde edilen hücreler (pasaj 4) 64
Şekil 4.5. Fare embriyonik fibroblastlarından elde edilen hücreler(pasaj 5) 65

GRAFİKLER DİZİNİ **SAYFA**

Grafik 4.1. P1 grubu referans alınarak ve kontrol grubunu 1 kabul edilerek P2, P3, P4'ten katlı değişimleri hesaplanmıştır. 66
Grafik 4.2. P2 grubu referans alınarak ve kontrol grubunu 1 kabul edilerek P3, P4 grubu katlı değişimleri hesaplanmıştır. 66
Grafik 4.3. P3 grubu referans alınarak ve kontrol grubunu 1 kabul edilerek P4 grubu katlı değişimleri hesaplanmıştır. 67
Grafik 4.4. P3 grubu referans alınarak ve kontrol grubunu 1 kabul edilerek P4 grubu katlı değişimleri hesaplanmıştır. 67
Grafik 4.5. P1 grubu referans alınarak ve kontrol grubunu 1 kabul edilerek P1, P3, P4 grubunu katlı değişimleri hesaplanmıştır. 68
Grafik 4.6. P3 grubu referans alınarak ve kontrol grubunu 1 kabul edilerek P4 grubunu katlı değişimleri hesaplanmıştır. 68
Grafik 4.7. P2 grubu referans alınarak ve kontrol grubunu 1 kabul edilerek P3, P4 grubunu katlı değişimleri hesaplanmıştır. 69

SİMGELER VE KISALTMALAR

MEF : Fare Embriyonik Fibroblastı
GPR : G protein-bağlı reseptör
AVPV : Anteroventral Periventriküler Çekirdek
Arc : Arkuat Çekirdek
ADP : Anterodorsal Preoptik Çekirdek
NERS : Nöroendokrin Üreme Sisteminin
POA : Ön Optik Alanda
NKB : Nörokinin B
PcG : Polycomb Grubu
BDNF : Beyin Türevli Nörotrofik Faktörü
NK3R : Nörokinin 3 reseptörü
NKA : Nörokinin A
SP : TAC1 geni tarafından kodlanan P maddesi (substance P)
KNDy : Kisseptin Neurokinin B Dynorphin
iPS : Uyarılmış Pluripotent Kök Hücreler
ICM : İnnercellmass
gEK : Gerçek Embriyonik Kök Hücre
fEK : Fertil Embriyonik Kök Hücre
ntEK : Nükleer Transfer Embrionik Kök Hücre
pgEK : Partenogenetik Embriyonik Kök
ES : İnsan Embriyonik Kök Hücreleri
ICM : Embriyonun İÇ Hücre Kütlesinden
EG : Embriyonik Germ
AEC : Amniyotik Epitel Hücreleri
AP : Alkalin Fosfataz
BMSC : Kemik İliği Stromal Hücresi
MSC : Mezenkimal Kök Hücreler

NSC : Nöral Kök Hücreler

ADSC : Adipozdan Türetilen Kök Hücreler

1. GIRIŞ

1.1. Fibroblast

Fibroblastlar, yara onarımı ve iyileşmesinde kilit rol oynadığı düşünülen ve her yerde bulunan mezenkimal hücrelerin yanı sıra tükenmiş hücre bölmelerini yeniden doldurma yeteneğine sahip multipotent progenitörlerin depolarıdır (Singhal ve ark., 2016). Fibroblastlar, çok çeşitli yerleşim, görünüm ve işlevlere sahip mezenkimal kökenli çeşitli yerleşik hücreler topluluğudur.

Bu hücreler, doku hücreleri olarak yaygın dağılımları nedeniyle yeni aktive edilmiş doğuştan gelen bağışıklık hücreleri tarafından üretilen uyaranlara yanıt vermeye hazırdır, bu da onları iltihaplanma ve bağışıklık araştırmak için yararlı bir araç haline getirir (Qiu ve ark., 2016). Fibroblastların çoğalması ve bunların salgılanan matris bileşenlerinin sentezi, insan fibrotik bozukluğuna sebep olur (Singhal ve ark., 2016).

Fibroblast, hücre dışı matris üreten bir tür bağ dokusu hücresidir. Bu tanımda iki tip fibroblast vardır: kan damarlarını çevreleyen adventisyal fibroblastlar ve herhangi bir spesifik yapı ile yakından bağlantılı olmayan interstisyel fibroblastlar. Mezenkimal ve stromal hücre kelimeleri, bağ dokusunda bulunan hücreleri tanımlamak için sıklıkla birbirinin yerine kullanılır. Hücre dışı matris oluşumu, bu kriterler için bir ön koşul gibi görünmemektedir. Birçok organın, hücre dışı matris oluşturabilen çok sayıda yerleşik mezenkimal hücre popülasyonu içermesi, belirsizliği artırır. Deri yaralarından granülasyon dokusu kasılması ilk olarak 1960'larda belgelenmiştir. Daha sonra, doku iyileşmesi sırasında, fibroblastların, hücre dışı matrisin kademeli dönüşümü ile meşgul oldukları nispeten sessiz durumlarından, miyofibroblastlar olarak bilinen proliferatif ve kontraktil bir fenotipe bir geçiş yaptıkları ortaya çıkmıştır.

Bu hücreler, düz kas hücrelerinin belirli fenotipik özelliklerini sergiler ve in vitro olarak kasılabilir. 1990'larda birçok bölgeden birkaç araştırmacı, karaciğer, böbrek ve akciğer de dahil olmak üzere bir dizi başka dokuda doku onarımı veya

hasar yanıtı sırasında miyofibroblastların mevcut olduğunu keşfetti. Miyofibroblastik hücreler, normal iyileşme süreçleri sırasında skar dokusu oluşmaya başladığında kaybolur. Bu hücre ölümü apopitoz şeklinde olur. (Ian A. Darby, 2007).

Dokuda yaşayan fibroblastlar: kardiyak fibroblastlar, böbrek fibroblastları, karaciğer fibroblastları, akciğer Fibroblastları, iskelet kası fibroblastları (Swonger ve ark., 2016).

1.2. Fare embriyonik fibroblast (Mouse embryonic fibroblast; MEF)

Embriyolar zengin bir fibroblast kaynağıdır ve fare embriyonik fibroblastları (MEF'ler), fizyolojik etkilerini incelemek için rutin olarak üretilir. MEF'ler genellikle tripsinizasyon ve embriyonun baş, kuyruk, uzuvlar ve iç organlar çıkarıldıktan sonra hücre kültürü ortamına tohumlanmasıyla üretilir. Birkaç geçişten (pasaj) sonra ortaya çıkan kültürlerin genellikle oldukça homojen popülasyonlar olduğu görülür. MEF kültürleri, çeşitli hücre tiplerinden oluşan çok çeşitli bir popülasyondan oluşur (Singhal ve ark., 2016).

Ayrıca, embriyonik kök hücreleri farklılaşmamış halde tutan temel biyoaktif moleküllerin üretimi nedeniyle, fare embriyonik fibroblastı (MEF), embriyonik kök hücreleri sürdürmek için bir besleyici katman olarak sıklıkla kullanılmıştır. MEF hücreleri, embriyonik büyümeyi destekleyen biyoaktif maddeler üretir ve bu maddelerin erken embriyo gelişimine yardımcı olduğuna inanılır (Jasmin ve ark., 2016) Erişim kolaylığı, yüksek büyüme oranları ve çok sayıda test gerçekleştirme yeteneği nedeniyle, fare embriyonik fibroblast (MEF) hücrelerinin kültürü, gen fonksiyonunu test etmek için yararlı bir yöntemdir (Qiu ve ark., 2016). Fare embriyonik fibroblast hücrelerinin indüklenmiş kök hücrelere dönüşebilme kapasitesinin yüksek olması ve ayrıca embriyonik dokulardan kolay elde edilebilir olmaları bunların tedavi amaçlı kullanımlarının önünü açmıştır (Yang ve ark., 2015). Pek çok hastalığın tedavisinde kullanılmak üzere ilaç keşfi için fayda sağlayacağı düşünülmektedir (Lian-Qun Qiu*, Jul 05, 2016). Bu

hastalıklardan biri de ergenlik dönemindeki aksamalardır. Puberte dönemine geçiş sürecinde kisspeptin ve nörokinin protein ailesi etkin rol oynamaktadır.

1.3. Kisspeptin

1.3.1. Bağlam ve tarihçe:

Kisspeptinler, Kiss-1geni tarafından transkribe edilen bir öncül proteinden türeyen, hipotalamo-hipofizer-gonadal aksı etkileyerek puberte ve fertilitede önemli roller üstlendikleri düşünülen, farklı aminoasit uzunluklarındaki peptidlerdir (Jayasena ve ark., 2009; Özlem Nalbantoğlu1, 27.02.2019).

Bir kanser baskılayıcı gen olan KISS1'in daha önce kanserin yayılmasında önemli bir rolü olduğu düşünülüyordu. KISS1 ve reseptörü KISS1R'nin, insanlarda ve diğer hayvanlarda ergenliğin başlangıcında ve üreme fizyolojisinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı artık gösterilmiştir. Kanser baskılayıcı gen olan KISS1, herkesin nerede keşfedildiğini bildiğini (veya tahmin edebileceğini) garanti etmek için tuhaf bir şekilde adlandırılmış olabilir (elbette ünlü Hershey Kisses'ın evi olan Hershey, Pennsylvania'da). Bununla birlikte, KISS1 gen bulgusunun önemi artık çikolata lokmasının çok ötesine uzanıyor (Gottsch ve ark., 2009).

Kiss-1 geni ilk olarak insan malign melanoma hücre kültürlerinde “tümör metastaz baskılayıcı” bir gen olarak 1996 yılında izole edilip duyurulurken, kisspeptin peptidlerinden fazla aminoasit dizisine sahip olan kisspeptin-54, insan melanom ve meme kanseri hücre kültürlerinde hücre çoğalmasını inhibe etme özelliklerinden ötürü metastin olarak adlandırılmıştır (Dennis K. Leea ve Andrew D. Howarde, 21 December 1998; Jeong-Hyung Lee, December 4, 1996). 1996 yılında, KISS1 geni keşfedildi ve Galanin reseptör 2 geni ile küçük bir dizi benzerliğine sahip olan Kisspeptin reseptör geni KISS1R 1999 yılında keşfedildi, ancak 2003 yılına kadar reseptör üreme fizyologlarının dikkatini çekmedi. KISS1 geni, kanserin yayılmasını önleme potansiyeli nedeniyle metastin olarak bilinen 54 amino asitlik bir proteine bölünebilen hidrofobik 145 amino asitli bir proteini

kodlar. Hem 145 hem de 54 amino asit proteinleri, onları her yerde bulunmaya ve proteozom bozulmasına duyarlı hale getiren bir bölge içerir, bu da sınırlı bir yarı ömre sahip olduklarını gösterir. Kisspeptinler, KISS1 geni tarafından ifade edilen ortak bir öncü proteinin proteolitik yan ürünleridir (Gottsch ve ark., 2009).

İnsanlarda, GPR54 reseptörünün özellikle plasenta, hipofiz, pankreas ve medulla spinaliste yüksek oranlarda eksprese edildiğinin görülmesinden dolayı endokrin fonksiyonları olabileceği düşünülmüştür. Günümüzde, bir metastaz baskılayıcı gen olarak bilinen KISS-1 geninin kodladığı ve C terminallerinde ortak RF-amid (Arg-Phe-NH2) dizileri taşıyan 54, 14, 13 ve 10 aminoasitlik bir dizi proteinin, GPR54 reseptörüne bağlanarak agonist etki gösterdikleri bilinmektedir (Plant, 2006).

GPR54 mutasyonları sonucunda seksüel gelişim, üreme ve fertiliteyi etkileyen tüm farklı fenotipik gelişim bozuklukları, kisspeptin-GPR54 sisteminin GnRH nöronlarının aktif olduğu, fetal gelişim, neonatal yaşam, puberte ve erişkinlikte de gerekli olduğunu düşündürmektedir (Chan ve ark., 2009).

Küçük peptitlerin daha büyük peptitten nasıl ayrıldığı veya daha kısa peptitlerin biyoyararlı olup olmadığı bilinmemektedir. Buna rağmen, bu peptitlerin her biri, güçlü reseptör bağlanmasıyla sonuçlanan benzer bir C-terminali konumu içerir. Daha büyük peptit türler arasında değişir, ancak 10 amino asit C-terminali peptiti yüksek oranda korunur ve KISS1R'ye bağlanır ve onu aktive eder. Hem KISS1 hem de KISS1R genleri, plasenta, beyin, hipofiz, gonadlar, karaciğer, pankreas, bağırsaklar, aort, koroner arter ve göbek damarı dahil olmak üzere çeşitli organlarda bulunur. KISS1R ilk olarak bilim insanları tarafından G protein-bağlı reseptör (GPR) 54 veya farelerde ifadesini ilk bozan Paradigm Therapeutics araştırmacıları tarafından "Harry Potter" kod adı olarak biliniyordu (Gottsch ve ark., 2009).

Kisspeptinlerin, GnRH bağımlı LH ve FSH salınımına neden oldukları GPR54 mutasyonlu fareler yanında sıçanlarda da gösterilmiş ve periferik yolla verilen metastinin dişi ve erkek sıçanlarda gonatropin düzeylerini arttırdığı,

prepubertal dişilerde ovülasyona neden olduğu bildirilmiştir (V M Navarro 1, 2005 Jan 6) (Matsui ve ark., 2004).

Kisspeptin-KISS1R sinyali, 2003 yılında iki ayrı gruptan yapılan çalışmalarla üreme biyologlarının hemen dikkatine sunuldu. Nicolas De Roux ve meslektaşlarının yanı sıra Stephanie Seminara ve meslektaşları, aylar içinde normal cinsel gelişim gösteremeyen hastalarında hipotalamik hipogonadizmin genetik temelini belirlediler. KISS1R'deki mutasyonlar, genomik çalışmalarına göre zayıf pubertal gelişim ile bağlantılıydı. Bu mutasyon ilk olarak çok sayıda akraba evliliklerinde ve birkaç sayıda da akraba dışı evlilikte belgelenmiştir; daha sonra, durum Kiss1r delesyon mutasyonları ile farelerde tekrarlandı ve bunun aslında nedensel ajan olduğu fikrine güvenilirlik eklendi. Herhangi bir fark edilebilir sonuç olmaksızın pubertal olgunlaşma aktivasyonu üzerinde önemli etkileri olan tek bir reseptör gen mutasyonunun keşfi, eski bir çözülmemiş sorunu yeniden ele alma konusundaki ilgiyi ateşledi: Ergenlik sırasında hipotalamik-hipofiz-gonadal eksen nasıl aktive edilir?

İki tane önemli, doğrulayıcı keşif bu heyecanı körükledi: ilki, Kiss1'de (Kiss1r ligandını kodlayan) delesyon mutasyonları olan fareler normal olarak olgunlaşamaması ve ikincisi, KISS1R'nin "aktive edici" mutasyonuna sahip insanların erken ergenlik yaşıyor olması. KISS1 ve KISS1R'nin keşfinden bu yana, kisspeptin sinyalizasyonu üzerine, bazıları kanser biyolojisi ve ergenlik fizyolojisinin çok ötesine geçen birkaç yayın ortaya çıkmıştır.

KISS1 geninin kanser hücresi metastazını önlediği belirlenmiştir ve daha sonra plasentada yüksek oranda eksprese edildiği doğrulanmıştır. O zamandan beri, KISS1 gen ekspresyonunun, KISS1'in kanser yayılmasını engellediği mekanizma olarak kabul edilen matris metalloproteinaz aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir. KISS1 muhtemelen plasentasyonda ve preeklampsinin patofizyolojisinde rol oynayabilir. Kiss1 (veya kisspeptin proteini) balık, koyun ve maymunlarda benzer bölgelerde bulunur ve anteroventral periventriküler çekirdek (AVPV), arkuat çekirdek (Arc), anterodorsal preoptik çekirdek (ADP), amigdala bulunur.

kemirgenlerin beyinlerindeki stria terminalisin (BnST) çekirdeği. Ayrıca, Kiss1r kisspeptin reseptörü, GnRH nöronlarının çoğunluğu tarafından ifade edilir.

Kisspeptinler, GnRH nöronlarını doğrudan aktive edebilir (belki dolaylı olarak) ve kemirgenler, primatlar, sığırlar ve balıklar dahil olmak üzere çok çeşitli türlerde güçlü GnRH/LH salgılanmasını sağlayabilir. Puberte ilerledikçe AVPV'de Kiss1 mRNA seviyeleri yükselir ve GnRH nöronları, Kiss1/GnRH apozisyonlarının sıklığındaki bir artıştan veya sinyal iletimini kontrol eden Kiss1r'nin bilinmeyen bir "olgunlaşmasından" kaynaklanabilecek olan, kisspeptin eylemlerine karşı daha duyarlı hale gelir. Son olarak, kisspeptin tedavisi, puberte öncesi maymunlarda GnRH/LH üretimini artırabilir ve hatta bazı türlerde puberte başlangıcını geciktirebilir.

Kiss1 mRNA ekspresyonu, hipotalamusun AVPV ve Arc'ındaki gonadal seks hormonları tarafından farklı şekilde düzenlenir ve Kiss1 ekspresyonu, hipofiz gonadotroplarında, büyük olasılıkla östrojen reseptörü (ER) alfa yoluyla indüklenir. Farenin AVPV'sindeki Kiss1 ifadesi, dişilerin erkeklerden daha fazlasını ifade etmesiyle cinsel olarak farklılaşır. Dişi sıçanlarda Kiss1 ekspresyonunun cinsel olarak dimorfik modeli, doğum öncesi kritik dönemde testosteron maruziyeti ile tersine çevrilebilir. Kisspeptin-Kiss1r sinyali, AVPV'deki ve yumurtalıktaki Kiss1 mRNA ekspresyonu, LH salgılanmasından önce en büyük olan, yumurtlama öncesi LH artışı için önemli olduğu görünmektedir.

Ayrıca, Kisspeptine karşı antiserum, sıçanlarda LH artışını inhibe edebilir, bu da Kisspeptin sinyalleşmesinin yumurtlama öncesi GnRH/LH artışının üretilmesi için önemli olduğunu gösterir. Bu sonuca rağmen, Kisspeptin GnRH sinyalinin hikayenin tamamını oluşturmadığı görülüyor, çünkü Kiss1r'den yoksun fareler, bir GnRH/LH salgılanması ile bir östradiol tehdidine yanıt verme hakkını koruyor. Kiss1r'nin yokluğunda (gonadal seks hormonları değiştirildiğinde), yollar telafi edebilir veya genetik lezyonu "düzeltmek" için telafi edici mekanizmalar ortaya çıkabilir. Kiss1 mRNA ifadesi emzirme sırasında hem ARC hem de

AVPV'de aşağı regüle edilir ve Kiss1 ifadesi belirli memelilerde ve balıklarda mevsimsel olarak değişir.

Kisspeptinlerin normal hayvanlarda glukoz aracılı insülin sekresyonu üzerindeki etkisi belirsiz olsa da, kisspeptinin diyabetik sıçanlarda gonadotropin sekresyonunu düzelttiği görülmektedir. Arc'taki Kiss1 mRNA'sı da aynı şekilde leptin eksikliği olan erkek farelerde azalır, ancak bu leptin tedavisi ile kısmen düzeltilebilinir. Kisspeptin enjeksiyonları ayrıca leptin antikorları ile tedavi edilen sıçanlarda gonadotropin üretimini arttırır, bu da kisspeptinin nöroendokrin üreme ekseninde leptin sinyallemesinde rol oynadığını gösterir. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada Kisspeptin sinyalinin vazokonstriksiyonu etkilediği bulunmuştur ve Kiss1 mRNA ekspresyonu yağ dokusunda kontrol edilmektedir, bu da kisspeptinin metabolizma ve üreme arasında biyolojik bir bağlantı olabileceğini düşündürmektedir (Gottsch ve ark., 2009).

1.3.2. Kisspeptin ve Cinsiyet Farklılaşması

Erkek ve dişi hayvanlar, nöroendokrin üreme sisteminin (NERS) farklı mimarisi ve fizyolojisine sahiptir. Kisspeptin sistemi, doğum sonrası T salgısını düzenlediği için beyin cinsiyet farklılaşması için önemli görülmektedir. Kisspeptin nöronları, farklı türlerin hipotalamusunda farklı şekilde dağılmıştır. Memelilerde bu nöronların iki ana alanı vardır: Ön optik alanda (POA) bir rostral ve kavisli çekirdekte (ARC) bir kaudal; ARC, POA'dan orantılı olarak daha fazla kisspeptin nöronuna sahiptir. Kemirgenlerdeki POA alanları Anteroventral Periventriküler Çekirdekte (AVPV) bulunur.

Bazı türlerde hipotalamusta cinsiyet farklılıkları gözlemlenmiştir, örneğin, sıçan AVP'si cinsel olarak dimorfiktir, dişiler erkeklere kıyasla daha yüksek miktarda KISS1 nöronuna sahiptir. Bu cinsel dimorfizm, beyindeki diğer cinsiyet farklılıkları gibi, büyük olasılıkla perinatal kritik dönemde testosteron (veya metabolitleri) maruziyeti ile üretilir. Son araştırmalar, erkek ve dişi

gonadektominin hipotalamusta Kiss1 mRNA ekspresyonunu arttırdığını ve seks steroid restorasyonunun bu etkiyi tersine çevirdiğini göstermiştir.

KISS1 nöronları ayrıca seks steroid reseptörlerini eksprese eder ve gonadal seks steroidleri tarafından kontrol edilir ve östrojenin GnRH nöronları üzerindeki etkilerine aracılık eder. GnRH üretimi, gonadal seks steroid geribildirimleri tarafından düzenlenir, ancak GnRH nöronları karşılık gelen reseptörleri eksprese etmez. AVPV, dişi kemirgenlerde E2 pozitif geri beslemeye aracılık eder, bu da yumurtlama öncesi bir GnRH/LH artışına neden olur. Sirkadiyen ipuçları ayrıca AVPA'yı da etkiler, bu sayede AVPV'deki hormonal ve zamansal sinyaller alan KISS1 nöronları, zamanında LH salgılanmasına neden olur. AVPV'nin aksine, arkuat çekirdek, erkek ve dişiler arasında hiçbir fark göstermez. Ayrıca, fareler, keçiler, koyunlar ve sığırlarda yapılan yeni araştırmalar, ARC KISS1 nöronlarının nörokinin B (NKB) ve dynorphin'i de eksprese ettiğini göstermektedir; bu nöronların tümüne KNDy nöronları denir.

Bu üç nöropeptit, GnRH'nin pulsatil salınımını kontrol etmek için beraber işbirliği yapabilir. KISS1 nöronlarının bu iki popülasyonunun GnRH artışı sırasında devreye girdiği öne sürülmesine rağmen, tonik veya bazal GnRH üretimi sırasında sadece ARC KISS1 nöronları aktive olur (Zeydabadi Nejad ve ark., 2017).

1.3.3. Kisspeptin ve Ergenlik (puberte)

Cinsel gelişim, artan doğrusal büyüme ve adrenal olgunlaşmayı içeren karmaşık bir biyolojik süreç olan ergenlik, hipotalamus gonadotropin salgılatıcı hormon salmaya başladığında başlar (Stephanie B. Seminara ve Wendy Kuohung, october 23, 2003).

Ergenlik, uyarıcı sinyallerin artması ve GnRH nöronları üzerindeki engelleyici ipuçlarının azalmasıyla başlar, bu da hipotalamustan pulsatil GnRH salınımında sürekli bir artışa neden olur. Artan GnRH nabzı, aşağı akış bileşenlerini uyarır, bu da tümü doğurganlığa katkıda bulunan gonadotropinler ve

cinsiyet hormonlarında, gametogenezde, ikincil cinsiyet özelliklerinde ve hızlı gelişmede bir artışa neden olur. Ergenlik başlangıcı, genetik ve çevresel değişkenlerin yanı sıra gen-çevre etkileşimleri tarafından yönetilir ve erkeklerle kadınlar arasında farklılık gösterir. Hipogonadotropik hipogonadizm hastalarında GPR54 genindeki mutasyonların kisspeptini inaktive ettiği kanıtlandığı gibi, kisspeptinler ve ilişkili reseptörleri düzgün bir şekilde etkileşime girmezse puberte gerçekleşmez.

Endojen KissPeptin ritmikliği ve duyarlılığı ergenlik boyunca yükselir; primatlarda ve kemirgenlerde juvenil pubertal geçiş sırasında hem KISS1 nöronlarının sayısında hem de Kiss1 mRNA miktarında bir artış vardır. Yeni araştırmaya göre, ergenlikten önce Polycomb grubu (PcG) genlerinin (KISS1 susturucuları) artan metilasyonu, PcG proteinlerini KISS1 promotöründen tahliye etti. Ayrıca, KISS1 geninin epigenetik kontrolü, bir GnRH/gonadotropin dalgalanmasının oluşumunda östrojen pozitif feedback ile ilişkilendirildi. (Zeydabadi Nejad ve ark., 2017).

1.3.4. Hipofizde Kisspeptin

Hipotalamo-hipofizer-gonadal aks, üreme yeteneğinin kazanılması ve sürdürülmesine aracılık eden, diğer sistemlerle kompleks ilişkileri olan merkezi bir sistem olarak bilinmektedir. Puberte sırasında bu sistemin nasıl aktive olduğu uzun yıllar gizemini korumuş ve anlaşılamayan yönleri ile popüler bir araştırma alanı olma özelliğini hala yitirmemiştir. Günümüzde, kisspeptinlerin hipotalamik salınımları sonucunda, gonadotropin salgılatıcı hormonun (GnRH) etkinliğinin artmasının puberte başlangıcındaki tetikleyici mekanizmanın önemli bir parçası olduğu düşünülmektedir (Jayasena ve ark., 2009; Özlem Nalbantoğlu1, 27.02.2019).

Hipofizde KISS1 ve GPR54 eksprese eden hücrelerin varlığına ilişkin kanıtlar kesin değildir. Kisspeptinin, sıçan hipofiz hücrelerinde ve koyun, sığır ve domuz hipofizlerinden üretilen birincil hücre kültürlerinde in vitro LH üzerinde

orta düzeyde uyarıcı etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Örneğin KISS1 ve GPR54'ün sıçan gonadotroplarında eksprese edildiği ve steroidler tarafından farklı şekilde kontrol edildiği gösterildi. KISS1 ekspresyonu dişilerde E2 tarafından arttırılırken, GPR54 ekspresyonu GnRH tarafından yükseltiliyor ve E2 maruziyeti ile aşağı regüle ediliyor. Kisspeptin sinyalinin moleküler bir çalışmasına göre, Kisspeptin farelerde LHβ ve FSHβ gen ekspresyonunu arttırır. Bu indüksiyon, protein kinaz C'ye bağımlıdır.

Kisspeptin ayrıca peripubertal erkek ve dişi sıçanların gonadotrop ve somatotroplarında LH ve GH üretimi üzerinde küçük uyarıcı etkilere sahiptir. Bu gonadotropların in vivo olarak doğrudan kisspeptinin hedefi olmadığı anlamına gelebilir. Verilere göre, kisspeptin ve GnRH birlikte uygulanması LH salgısını arttırır. Kisspeptin'in hipofiz ve gonadotropin salınımı üzerindeki doğrudan uyarıcı etkilerinin GnRH'ye göre daha düşük olduğu ve kisspeptin'in gonadotropin salınımı üzerindeki ana uyarıcı etkisinin hipotalamus aracılığıyla olduğunu göstermektedir.

1.3.5. Yumurtalıkta Kisspeptin

GnRH, üreme sisteminde hem LH hem de FSH sentezini uyarır, yavaş GnRH pulsatilitesi (2 ile 3 saatte bir atım) FSH salgılanmasını destekler ve yüksek atım frekansları (saatte > 1 atım) LH salgılanmasını destekler. Regl döngüsü sırasında, hipofiz gonadotropinlerinin farklı sentezini kontrol eden GnRH salınım frekansı değişir. GnRH sekresyonunu doğrudan veya dolaylı olarak birçok faktör etkiler. GnRH, özellikle yumurtlama öncesi LH artışı sırasında, gonadal steroid geribildirimi ile tipik olarak azalır.

Foliküler fazın sonuna doğru artan östrojen seviyeleri, progesteron reseptörlerini aktive etmenin yanı sıra, AVPV'deki KISS1 nöronlarını uyararak GnRH darbelerinin frekansını ve genliğini artırarak LH artışı ve yumurta oluşumu ile sonuçlanır. Yumurta oluşumunu takiben, progesteron seviyeleri yükseldiğinde, GnRH atımlarının sıklığı azalır ve FSH üretimi artar. Ayrıca, yumurta oluşumu öncesi LH artışı, kisspeptin sinyallemesi ile birlikte, fosfatidilinositol 3-kinaz/AKT

(PI3K/AKT) yolu aracılığıyla oositin hayatta kalmasını destekleyen granüloz hücrelerde Beyin Türevli Nörotrofik Faktörü (BDNF) arttırır.

1.3.6. Kisspeptin ve Gebelik

Hamilelik sırasında, çoğunlukla plasentada üretilen insan plazmasındaki kisspeptin konsantrasyonunda önemli bir artış olmuştur. Histokimyasal incelemeye göre sinsityotrofoblastlarda Kiss1 mRNA bulundu; bu bulgular, Kisspeptin'in trofoblast istilasının kontrolünde bir rol oynayabileceğini göstermektedir.

Ayrıca, kemirgenlerde plasenta hem KISS1 hem de KISS1R'nin en büyük ifadesine sahiptir. Araştırmalarda, kisspeptinin, belirli MMP'lerin etkisini engelleyerek trofoblast göçünü düzenlediği farkedilmiştir. Kiss1 ve Kiss1R mRNA'ları ayrıca insan aortunda, koroner arterde ve göbek damarında olduğu kadar plasenta, hipofiz, periferik kan lökositleri, böbrek ve pankreasta da bulunur.

1.3.7. Kisspeptin ve Laktasyon

Hamilelik sırasında artan plazma Kisspeptini, oksitosin üretimini hızlandırabilir, ancak oksitosin reseptör ekspresyonu ve duyarlılığı doğumdan önce düşük kalır. Bununla birlikte, farelerde prolaktin tedavisi, hipotalamusta kisspeptin ekspresyonunu önemli ölçüde azaltır ve daha düşük GnRH salınımı ile sonuçlanır. Ayrıca, sıçanların emzirme sırasında hipotalamusta ve LH salgısında daha düşük Kiss1 mRNA seviyeleri vardır, bu da östrus döngüsünün bozulmasına neden olur. Laktasyon, yavruların gelişimini ve hayatta kalmasını sağlarken hemen hemen tüm memelilerde kısırlığa neden olur ve kisspeptin ekspresyonunun yeterli azalması laktasyonel anovülasyona yol açar.

1.3.8. Kisspeptinin Epigenetik Düzenlenmesi

KISS1 geni hem merkezi hem de çevresel organlarda eksprese edilmesine rağmen, KISS1 geninin zamansal ve lokal ekspresyonunu yöneten süreçler tam olarak bilinmemektedir. KISS 1 ifadesindeki değişiklikler, kadın cinsel

farklılaşmasında, ergenliğin başlangıcında ve ilerlemesinde rol oynayabilir. AVPV'deki KISS1 geni kadınlarda erkeklerden daha güçlü bir şekilde ifade edilir ve kadınlara özgü GnRH/LH salgılanmasından sorumludur. Daha önce belirtildiği gibi, doğum öncesi kritik dönemde testosteron maruziyeti, AVPV KISS1 gen ekspresyonunda cinsel dimorfizmi teşvik ediyor gibi görünmektedir (Zeydabadi Nejad ve ark., 2017).

1.4. GnRH üretiminin düzenlenmesi

Yakın tarihli insan genetik çalışmaları, nörokinin 3 reseptörü (NK3R) aracılığıyla nörokinin B (NKB) sinyalinin hipotalamustan pulsatil GnRH salgısının normal gelişimsel aktivasyonu için gerekli olduğunu ortaya koymuştur. Artan sayıda fonksiyon kaybı mutasyonlu hasta tanımlandığından, yüksek plasental ekspresyona ve geç gebelikte yüksek plazma NKB seviyelerine rağmen normal gebelik için periferik NKB'nin gerekli olmadığına dair kanıtlar ortaya çıkmıştır.

Yine de, GnRH uyarı üretecinin işlevinde NKB'nin rolüyle ilgili birçok önemli soru yanıtlanmayı beklemektedir. Farklı türler arasında hipotalamik-hipofiz-gonadal (HPG) olgunlaşması için NKB/NK3R gereksinimindeki farklılıklar ve bunların NKB ile stimülasyona farklı tepkileri, daha yüksek çözünürlüklü çalışmalar için bir zorluk teşkil etmektedir. Bir nöroendokrin eksenin üreme kontrolünde kritik rolü, 1970'lerin başında, hipotalamik gonadotropin salgılatıcı hormonun (GnRH) saflaştırıldığı ve hipofiz bezinden gonadotropinlerin salgılanmasını uyardığı gösterildiğinde anlaşılmıştır. Sadece birkaç yüz GnRH nöronu vardır. GnRH nöronu sinir gövdeleri anterior hipotalamusta dağılmıştır ve aksonlar medyan eminenste birleşir ve burada koordineli, pulsatil bir şekilde GnRH salgılarlar.

Bu GnRH nöronları, üreme ile ilgili çeşitli hormonal ve çevresel yukarı akış ipuçlarını birleştiren son ortak kanal olarak hizmet eder. İlginç bir şekilde, insanlarda ve diğer primatlarda HPG ekseni uteroda ve yaşamın ilk aylarında ikincil baskılamadan önce aktiftir ve bu erken gelişimsel aktivasyon erkek

bebeklerin tam erkekleşmesi için gereklidir. Bununla birlikte, GnRH salgılanmasındaki "juvenil duraklama" (juvenile pause) denilen şeyin altında yatan mekanizmalar ve aslında bunun pubertede yeniden aktivasyonu tam olarak anlaşılamamıştır.

GnRH'ye karşı hipofiz duyarlılığını sürdürmek için GnRH sekresyonunun pulsatilitesi kesinlikle gereklidir. Ayrıca, agonadal insanlar ve rhesus maymunları üzerinde yapılan çalışmalar, HPG fonksiyonunun puberte öncesi baskılanmasının, seks steroidleri tarafından geri bildirim olmadığında bile meydana geldiğini göstermiştir ve hipotalamusta farmakolojik yollarla kolayca yeniden aktive edilebilen GnRH içeren nöronların varlığına rağmen mediobazal hipotalamustaki aksiyon potansiyellerinin dalgaları, ergenlikte artan GnRH sekresyonu ile paraleldir.

Toplu olarak bu bulgular, jüvenil duraklamanın, GnRH nöronlarının olgunlaşmamışlığından ziyade nöral olarak belirlenmiş bir fonksiyonel staz durumunu temsil ettiğini göstermektedir. Bu nedenle, insan üreme fonksiyonunun gelişimsel düzenlemesini sağlayan ve onu beslenme ve çevresel ipuçlarına sürükleyen kesin mekanizmaları anlama çabaları, bu nöral GnRH darbe üretme sisteminin nöroanatomisini ve düzenlemesini anlama girişimleri etrafında kristalize olmuştur (Topaloglu ve Semple, 2011).

1.5. Neurokinin

Hipotalamusta GnRH salınımı ile ilgili olduğu belirlenen bir diğer protein ise Nörokinindir. Nörokininler, hem omurgalı hem de omurgasız filumlarında yaygın olarak bulunan antik sinyal molekülleri olan sinyal peptitlerinin taşikinin ailesine aittir. En iyi bilinen insan taşikininleri, her ikisi de aynı TAC1 geni tarafından kodlanan P maddesi (SP) ve nörokinin A (NKA) ve TAC3 tarafından kodlanan nörokinin B'dir. Hepsi CNS'de geniş ölçüde eksprese edilir ve birbiriyle yakından ilişkili üç G protein bağlı nörokinin reseptöründeki etki yoluyla hedef hücreler üzerinde etkiler gösterir. Nörokinin reseptörleri 1, 2 ve 3'ün (NK1R,

NK2R, NK3R: insanlarda sırasıyla TACR1, TACR2 ve TACR3 tarafından kodlanan) hiçbiri SP, NKA veya NKB için tamamen spesifik değildir, ancak bir dereceye kadar seçicilik gösterirler ve TACR3/NK3R , in vivo olarak NKB için olası aynı kökenli reseptör olarak görülmektedir .

SP ve NKA'nın ağırlıklı olarak nosisepsiyonda işlev gördüğüne inanılmaktadır, ancak NKB'nin baskın işlevi, NKB veya reseptörünün tam işlev kaybı olan insanlarda yakın zamanda bulunana kadar net değildi. İnsanlarda ve kemirgenlerde CNS'de yaygın olarak ifade edilmesine rağmen, hem TAC3 hem de TACR3, diğer dokular arasında plasenta, böbrek, iskelet kası ve akciğerde periferik olarak ifade edilir, pulmoner inflamasyon, kognisyon ve preeklampsi dahil olmak üzere çeşitli süreçlerde yer almıştır. Merkezinde genetik olarak kanıtlanmış rolü olan kisspeptinden farklı olarak İnsan HPG ekseninin kontrolü önceki çalışmalara dayanarak beklenmiyordu, nörokinin B'nin üreme fonksiyonunun kontrolünde rolü, birçok bulgunun negatif olmasına rağmen, yaklaşık 20 yıldır araştırmaya konu olmuştur. 1992'den beri çalışmalar NKB için bir GnRH sekresyonunu ele almıştı, ancak buna dair hiçbir kanıt bulunamadı.

Daha yakın yıllarda, özellikle Rance laboratuvarından yapılan dikkatli nöroanatomik çalışmalar, infundibular veya arkuat çekirdekteki anahtar hipotalamik nöronlarda, seks steroidlerine oldukça duyarlı olan NKB ekspresyonunu göstermiştir. Ayrıca NK3R'lerin, NKB immünoreaktivite alanlarına yakın bir konumda oldukları medyan eminenste GnRH sinir uçlarında eksprese edildiği gösterilmiştir. Bununla birlikte, tek bir çalışma merkezi NKB'nin östrojende LH üretimini baskılayabileceğini öne sürmesine rağmen, kemirgenlerdeki çoğu farmakolojik çalışma NKB'nin veya analoglarının GnRH sekresyonu üzerinde olumlu bir etkisini göstermediği için, bu tür anatomik gözlemlerin fonksiyonel korelasyonu net değildir (Topaloglu ve Semple, 2011).

1.5.1. Hipogonadotropik hipogonadizmde TACR3 ve TAC3'teki mutasyonlar

Bu, 2008'de insanlarda NKB veya nörokinin 3 reseptörünün işlev kaybının derin nIHH'ye yol açtığını ve böylece HPG ekseninin normal olgunlaşmasında NKB eylemi için kritik gerekliliği kanıtladığını bulmanın bağlamıydı. Bu keşif, nIHH'den etkilenen ve diğerlerinin yanı sıra GNRH1, GNRHR, KISS1 ve KISS1R'deki mutasyonların hariç tutulduğu birden fazla üyesi olan akraba evliliklerinin incenmesiyle bulundu.

Hücre kültüründe incelendiklerinde, tüm mutantlar, NKB'ye yanıt olarak sitozolik kalsiyumda bir artışa aracılık etme kabiliyetini ciddi şekilde azalttı. Kalan ailelerden birinde, nispeten geniş bir kromozom 12 alanı nIHH'ye neden olmakla suçlandı ve bu yaklaşık 100 gen kodlamasına rağmen, TAC3 bunların arasındaydı. Bu ailede sekanslamada, bilinen taşikininler arasında evrensel olarak korunan kanonik taşikinin motifi Phe-X-Gly-Leu-Met-NH2'yi bozan, olgun NKB dekapeptitinin korunmuş terminal metionini treonine mutasyona uğratan bir homozigot mutasyon bulundu. İn vivo NKB'nin, yakından ilişkili nörokinin A peptidinin tam aktivitesi için gerekli olduğu gösterilen C-terminal amidasyonu ile post-translasyonel olarak modifiye edildiği bilinmektedir.

İn vitro, amidlenmemiş mutant NKB, doğal NK3R'yi uyarmak için önemli bir yeteneğe sahip değilken, amidlenmiş mutant NKB, doğal NKB'den yaklaşık 10 kat daha düşük bir EC50'ye sahiptir. Bu indeks çalışmasından bu yana, diğer popülasyonlarda daha fazla araştırma, TACR3 veya TAC3'teki mutasyonların insanlarda nIHH'nin yaygın nedenlerinden biri olduğunu doğrulamıştır. Afrika'da bir genetik kurucu etkiye atfedilen, nIHH'li üç ilişkisiz hastada NKB ekspresyonunun tamamen kaybıyla sonuçlanan TAC3'te bir homozigot ek yeri mutasyonu ve TACR3'te bir homozigot ek yeri mutasyonu ile üç kardeşte NK3R'nin kesilmesiyle sonuçlanmıştır nIHH. Aynı zamanda, bugüne kadarki en büyük çalışmada, Gianetti ve ark. 19 probandda TACR3'te ve bir multipleks ailede TAC3'te mutasyonlar bildirmiştir.

Bu çalışma, analiz edilen çoğu etnik grupta nIHH'de yaklaşık %5'lik bir TACR3 veya TAC3 mutasyon prevalansı önerdi; bu prevalans KISS1R mutasyonları için görülenden önemli ölçüde daha yüksekti. İnsan TAC3 ve TACR3 mutasyonlarının ilk raporlarında kesinlikle otozomal resesif bir kalıtım paterni ile tam penetran nIHH ile ilişkili oldukları gösterildi. Ancak Gianetti ve ark. tarafından yapılan çalışmada, TACR3'te heterozigot mutasyonları olan 7 nIHH örneği rapor edilmiştir. nIHH ile ilişkili tüm bu heterozigot TACR3 mutasyonları için fonksiyon kaybının deneysel kanıtı sağlanmasa da, birçoğu erken kesme mutasyonlarıydı, bu nedenle heterozigotluğun büyük olasılıkla %50 fonksiyon kaybına veya etkin haploins yetmezliğine karşılık geldiğini varsaymak mantıklıdır. Ayrıca, bu varyantların hiçbirinin, nIHH ile ilişkili olduğu bilinen diğer genlerdeki fonksiyon varyantlarının kaybıyla birlikte kalıtsal olmadığı bulundu.

Bu nedenle, TACR3'teki mutasyonların otozomal dominant negatif kalıtım modeliyle nIHH ile sonuçlanabilmesi resmi olarak mümkün olmaya devam etmektedir, ancak niHH içinde iyi kurulmuş oligogenisite paradigması göz önüne alındığında, nIHH'yi bu aşamada tek başına TACR3'teki heterozigot mutasyonlara güvenle atfetmek mümkün değildir (Topaloglu ve Semple, 2011).

Bu patofizyolojik benzerliklerin yanı sıra arkuatnükleusunda NKB ve kisspeptin ekspresyonunun aynı hücrelerde rastlanması bunların yakın ilişki içerinde olabileceklerini göstermektedir. Nitekim fareler üzerinde yapılan çalışmalarda NKB agonistinin kisspeptin ekspresyonunu arttırdığı ve dolayısıyla GnRH ve akabinde LH salınımını etkilediği gösterilmiştir(Lehman ve ark., 2010) (Cheng ve ark., 2010). Fakat TAC3 ve TACR3'ün fonksiyonu hakkındaki asıl gelişme Topaloğlu ve grubunun çalışmalarıyla ortaya çıkmıştır. Bu grup TAC3 ve TACR3 mutasyonu olan bir hastada hipogonadotropikhipogonadizm ve infertilite gözlendiği dolayısıyla bu proteinlerin pubertenin kontrol noktasında anahtar rol oynadığını belirlemişlerdir (Topaloglu ve ark., 2009) (A. Kemal Topaloglu, february 16, 2012).

1.5.2. İnsanlarda NKB etkisinin kaybının fizyolojik sonuçları

NKB/NK3R eksikliğinin birkaç ilginç fenotipik özelliği genişleyen insan genetik çalışmaları ile ortaya çıkmıştır. İlk olarak, homozigot TAC3 mutasyonlarına sahip 2 kız kardeş, biri daha önceki seks hormonu tedavisinden sonra, spontane olarak gebe kaldı ve gebeliklerden biri başarılı bir şekilde sona erdi. Homozigot, fonksiyonel olarak boş TAC3 mutasyonuna rağmen başarılı hamilelik, plasenta ve diğer üreme dokularında yüksek seviyelerde eksprese edilmesine rağmen NKB'nin plasentasyon veya hamilelik için gerekli olmadığını gösterdi.

Aynı mutasyonlara sahip başka bir kız kardeş düzenli bir regl döngüsüne sahipken, son etkilenen kız kardeş, bir progesteron yüklemesinden sonra pozitif bir geri çekilme kanamasına sahipti, ancak spontane regl döngüsü yoktu. NKB fonksiyonunun kaybıyla ilişkili niHH'deki bu tür sızıntının diğer taşikininler tarafından bir dereceye kadar telafi edilmesiyle açıklanması mümkündür. P maddesi gibi, P maddesinin önemli Era-pozitif infundibular nöronlarda NKB ile birlikte ifade edildiği gözlemiyle desteklenen bir öneridir. İkinci önemli bir gözlem, mikrofallusun erkek hastalarda evrensel olarak bulunması ve kriptorşidizm çok yaygın olarak görülmemesine rağmen, intrauterin HPG aktivasyonu için NKB etkisinin gerekli olduğunu ortaya koymasıdır. Son olarak, Gianetti ve ark.'nın çalışmasındaki hastaların yüksek bir kısmında, HH'nin geri dönüşümlü olduğu ve hastaların yaklaşık %80'inde seks steroidi veya gonadotropin tedavisinin kesilmesinden sonra pulsatil GnRH salgısının devam ettiği bildirilmiştir.

Bu yüksek tersine çevrilebilirlik prevalansı, büyük, genetik olarak seçilmemiş bir kohortta gözlenen %10 oranından belirgin şekilde daha yüksektir. Kohortumuzda, her ikisi de TACR3'te aynı yeni homozigot yanlış anlamlı mutasyona sahip bağımsız multipleks ailelerden iki kadın da seks steroid tedavisinin kesilmesinden sonra doğurganlık kanıtı gösterdi. Bu özel mutasyonun Polyphen-2 analizinde daha önce yayınlanmış mutasyonlarımızdan daha az zarar verici olduğu tahmin edildi.

Buna karşılık, bu vakaların benzer şekilde tedavi edilen erkek ve kız kardeşleri, geri döndürülebilirlik kanıtı göstermedi. Bu, TACR3 mutasyonlu vakalarımızda %10-15'lik bir geri dönüş oranına karşılık gelir. Gruplar arasındaki bariz farkın tamamen şans oyunuyla mı ilgili olduğu, yoksa etnik köken, sevk ve takip tarzlarındaki farklılıklar mı yoksa dahil olan spesifik mutasyonlarla mı ilgili olduğu henüz belirlenmemiştir. Bu, daha fazla çalışma için önemli bir alandır. Bu nedenle insan genetiği, NKB/NK3R'nin utero ve ergenlikte insan HPG aktivasyonu için gerekli olduğuna dair ikna edici kanıtlar sağlamıştır, ancak cinsel olgunluğun güçlü bir şekilde indüklenmesinden sonra GnRH puls üretecinin sürekli aktivitesi için zaman zaman gerekli olmayabileceğini öne sürmektedir.

1.5.3. NKB ve ergenlik zamanlamasında ortak genetik varyasyon

TACR3 geninin yakınındaki ortak nükleotid varyantlarının, genel popülasyonda ergenliğin zamanlamasını küçük bir dereceye kadar etkileyebileceği yönünde bir öneri de olmuştur. Menarş yaşıyla ilgili genom çapında ilişkilendirme çalışmalarının yakın tarihli bir meta-analizinde, 87.000 kadında dahil olmak üzere ergenlik zamanlaması için güvenilir bir vekil, 30 lokus, bu tür hipoteze dayalı olmayan genetik çalışmalarda pozitif olarak kabul edilen genom çapında anlamlılık seviyelerine ulaşmıştır. Bununla birlikte, seks steroidi biyosentezi ve metabolizmasında (GNRHR, KISS1R, KISS1, TACR3 ve TAC3 dahil) yer alan 16 aday genin etrafındaki sinyaller için verilerin hipoteze dayalı sorgulamasında, yalnızca iki SNP, biri TACR3'ten 19 kb yukarı akış (rs17034046, $P = 3.4) 10^{-7}$) ve ESR1'den bir 110 kb yukarı akış (en yüksek isabet rs9383922, $P = 2,2\ 10^{-6}$), çoklu test için düzeltme yapıldıktan sonra menarş yaşı ile önemli ölçüde ilişkiliydi. Bu, genel popülasyonda pubertal zamanlamada önemli bir varyasyon kaynağı olarak TACR3'e yakın ortak varyasyonu dahil ederek TACR3'teki nadir genetik varyasyon çalışmalarına katkıda bulunur.

Sonuç olarak insanda en iyi bilinen taşikininler substance P(SP),nörokinin A (NKA) ve nörokinin B'dir(NKB) ve bunların hepsi yaygın olarak merkezi sinir

sisteminde sentezlenirler. Substance P ve NKA'nın genelde nosisebsiyonda fonksiyonel olduğu düşünülürken, insan üreme ekseninde rol oynadığı belirlenen NKB ve reseptörü NK3R'yi kodlayan sırasıyla TAC3 ve TACR3 genleri insan ve kemirgenlerin (fare homoloğu TAC2 ve TACR2) merkezi sinir sisteminde yaygın olarak eksprese edildiği gibi böbrek, iskelet kası, akciğer ve diğer dokularda da sentezlenebilmektedir. Yakın zamanda yapılan nöroanatomik çalışmalarda NKB'nin özellikle infindubulumda bulunan hipotalamik nöronlarda özellikle cinsiyet streoidlerine cevap oluşturan hipotalamusun arkuatnükleusunda sentezlendiği gösterilmiştir. NKB ve reseptörü arkuatnükleusunda özellikle negatif geri bildirim mekanizmasına dayalı östradiol bağımlı GnRH salınımında aktif olrak rol oynamaktadır (Ali Kemal Topaloglu 1, 2010 Aug; Topaloglu ve Semple, 2011)

1.5.4. Kemirgenler

Fareler deneysel olarak en izlenebilir model olmasına rağmen hayvanlar, mevcut kanıtlar $Tacr3^{-/-}$ farelerinin son derece normal doğurganlığa sahip olduğunu gösterir (Kung ve diğerleri, 2004) ve (Dr Jeffrey Stock, Pfizer, kişisel iletişim) şimdiye kadar bildirilen hiçbir Tac2 (insan TAC3'ünün fare otoloğu) nakavt fare yoktur. NKB'nin oynadığı roldeki insan-fare farkının bu açık kanıtı, her ikisi de cinsel olgunlaşma başarısızlığı gösteren Kiss1r ve Kiss1 nakavt farelerin fenotipleriyle çelişmektedir. Bununla birlikte, ilk raporlar bunun tamamlanmış olduğunu öne sürse de (Seminara ve diğerleri, 2003), daha yakın tarihli araştırmalar, dişi $Kiss1^{-/-}$ ve $Kiss1r^{-/-}$ farelerinin önemli bir bölümünün vajinal östrus sergilediğini ve bazı erkek $Kiss1^{-/-}$ ve $Kiss1r^{-/-}$ fareleri spermatogenez sergilediğini (Lapatto ve diğerleri, 2007), bunun da insan ergenliğinde de kisspeptin gereksiniminde bir dereceye kadar türler arası farklılığa işaret ettiğini gösterir. Nakavt ile uyumlu olarak farelerde farmakolojik çalışmalar NKB'nin GnRH sekresyonu üzerinde uyarıcı bir etkisi olduğuna dair herhangi bir kanıt sağlayamadı. Bu nedenle, farklı genetik geçmişlere sahip Tacr3 ve Tac2 nakavt farelerde üreme fonksiyonunun daha resmi değerlendirmesi, kesin sonuçlara

varılmadan önce garanti edilse de, mevcut kanıtlar, murin üremesinde NKB'nin mekanik çalışmalarını insanlara tahmin etme girişimlerine güçlü bir uyarıda bulunmaktadır.

Sıçanlarda yapılan çoğu çalışmada ya NKB'nin ya da bozulmamış hayvanlarda veya hipotalamik eksplantlarda LH salgılanması üzerindeki analoglar veya yüksek doz östrojen ile hazırlanmış yumurtalıkları alınmış sıçanlarda LH salgılanmasının baskılanması gösterildi. Bununla birlikte, çok yakın tarihli bir çalışma, NKB agonisti senktid'in, daha fizyolojik bir östrojen konsantrasyonu ile hazırlanmış yumurtalıkları alınmış hayvanlarda LH üretiminin güçlü bir şekilde uyarılmasını sağlayabildiğini ileri sürmüştür. Bu, aşağıda tartışılan koyun çalışmalarında olduğu gibi, NKB eyleminin hormonal bağlamının etkisi için kritik olduğunu göstermektedir (Topaloglu ve Semple, 2011).

1.5.5. NKB ve GnRH puls üreteci

Her ne kadar gonadal seks steroidleri üzerinde kritik geri bildirim eylemleri uygulasalar da hipotalamik GnRH salınımı, GnRH nöronlarının kendileri sıçanlarda, koyunlarda ve primatlarda ne progesteron ne de östrojen reseptörlerini (ERa) ifade etmez. Ayrıca postmenopozal kadınlar, ERa içeren infundibular nöronların hipertrofisini gösterir ve bu hücreler ayrıca TAC3'ü aşırı eksprese eder, bu da NKB ekspresyonunun kadınlarda ERa yoluyla inhibe edildiğini gösterir. Benzer şekilde östrojen kemirgenlerde Tac2 gen ekspresyonunu baskılar, kavisli NKB nöronları koyun ve kemirgenlerde cinsel olarak dimorfiktir ve NKB gen ekspresyonu sıçan östrus döngüsüne göre değişir.

Bu bulgular toplu olarak kavisli/infundibular NKB hücrelerinin seks steroid ortamına duyarlı olduğunu göstermektedir. Ayrıca, merkezi düzenlemenin kilit yönleri kisspeptin sinyalizasyonunu çok andırır. Bu nedenle, postmenopozal kadınlarda ve yumurtalıkları alınmış maymunlarda infundibüler kisspeptin nöronları hipertrofiktir, bunlar ERa ifade eder ve kavisli çekirdekte Kiss1 ekspresyonu ekzojen östrojen tarafından baskılanır, bunların hepsi

infundibular/arkuat kisspeptin nöronlarının östrojen negatif geri beslemede bir rol oynadığını düşündürür.

Bu raporların ışığında, önemliydi ancak şaşırtıcı değildi. Goodman ve arkadaşları, koyun kavisli çekirdeğinin Kiss1 nöronlarının NKB ve ayrıca dynorphin'i birlikte ifade ettiğini gösterdiğinde. Benzer KNDy (Kisseptin Neurokinin B Dynorphin) nöronları farelerde, sıçanlarda ve keçilerde de tanımlanmıştır. Birkaç çalışmada NKB ve kisspeptin için büyük ölçüde örtüşen boyama göz önüne alındığında, infundibular çekirdekte kisspeptin, dynorphin ve NKB dağılımına ilişkin önceki bireysel açıklamaların büyük ölçüde bu KNDy nöronlarına karşılık geldiği ve bu nöronların nöroanatomik ilişkilerini ve işlevini anlaması muhtemel görünmektedir. Artık birçok laboratuvarın merkezinde GnRH puls üretecini anlama çabaları yer almaktadır.

Sıçanda Krajewski ve ark. nöronları eksprese eden NKB'nin dört ana yolunu tanımladı (1) iki taraflı arkuat nükleus içindeki lokal yol, (2) lateral palizat bölgesi dahil medyan eminense yol, (3) rostral olarak çoklu hipotalamik çekirdeğe uzanan bir periventriküler yol, stria terminalinin septal bölgesi ve yatak çekirdeği ve dorsomedial çekirdeğe dorsal ve (4) yanal hipotalamusa ve medial ön beyin demetine ventral hipotalamik yola çıkıntılar.

Bunlar arasında ilk iki grup, GnRH sekresyonunun düzenlenmesiyle en bariz ilgili olanlardır. Aslında birkaç grup, farklı türlerde KNDy liflerinin, seks steroidine yanıt veren KNDy nöronlarının iki taraflı koordineli aktivitesine izin vermesi önerilen kapsamlı tekrarlayan kollateral otosinaptik projeksiyonlara sahip olduğunu doğrulamıştır. Sıçan Wakabayashi ve ark. GnRH salınımının meydana geldiği medyan eminensin dış tabakasına KNDy liflerinin keçi açısından zengin projeksiyonlarında gözlenir. NK3R'nin hem arkuatta hem de medyan eminenste bulunması, bu ağdaki iletişimin NKB,NK3R sinyallemesi yoluyla gerçekleştiğini göstermektedir.

Medyan eminens ile ilgili ultrastrüktürel çalışmalar, NKB varislerinin klasik sinapslar olmaksızın GnRH aksonları ile doğrudan temas halinde olduğunu

göstermiştir. Bu veriler, NKB'nin sinaptik olmayan iletim yoluyla GnRH salgısını modüle ettiğini ima eder. Medyan eminensteki GnRH aksonlarının ve terminallerinin yakınsamasının, ergenliği başlatmak için gerekli olan pulsatil GnRH sekresyonunun senkronizasyonu için son bir koordinasyon bölgesini temsil ettiği varsayılır. Birlikte ele alındığında, mevcut veriler bir ağ seks steroidine yanıt veren nöronlar, kisspeptin, NKB, Dyn ve ERa'yı birlikte eksprese eden kavisli çekirdekte bulunur ve bu nöronlar muhtemelen birbirleriyle ipsi- ve kontralateral olarak iletişim kurar ve dolayısıyla aktivitelerini NKB-NK3R sinyali yoluyla senkronize eder.

Bu nöronlar ayrıca, GnRH'nin pulsatil sekresyonunu üretmek için medyan eminensteki GnRH terminallerine de yansır. Bu, bu nöronların GNRH puls üretecini temsil ettiği spekülasyonuna yol açmıştır. Yakın zamanda, NKB ve dinorfinin, kavisli çekirdekteki KNDy nöronları üzerindeki otosinaptik etkilerini, Kisspeptinin pulsatil sekresyonunun senkronize edilmesinde ve şekillendirilmesinde ve dolayısıyla medyan eminenstan GnRH'nin salınmasını içeren bir model önerilmiştir. Daha spesifik olarak, GnRH puls üreteci içinde NKB'nin uyarıcı tahrikinin kademeli olarak arttığı ve bu, dinorfin sinyallemesi tarafından sağlanan engelleyici tonu aştığında, KNDy nöronlarının aktive edildiği öne sürülmüştür.

Bu ilk aktivasyon, bileşen nöronların senkronize depolarizasyonunu uyarmak için ağdaki hücreler arasında yayılan NKB/NK3R sinyalinin aracılık ettiği bir geri besleme mekanizması tarafından güçlendirilir. Bunu, NKB'nin neden olduğu depolarizasyonu söndüren kappa-opioid reseptörü olan reseptörü aracılığıyla etki eden dynorphin'in aracılık ettiği gecikmiş inhibisyonları takip eder. Bu döngü süresiz olarak tekrarlanır, böylece pulsatil kisspeptin salınımı ve aşağı akış GnRH salgısı üretilir. Bu tür pulsatil GnRH salınımının sadece kisspeptin ile (sürekli yerine) aralıklı stimülasyonla sağlanabileceği iyi bilinmektedir (Topaloglu ve Semple, 2011).

1.6. Kök hücre

Kök hücreler sınırsız çoğalabilme, kendilerini yenileyebilme (Luciana Machado, June 27, 2013), kendilerinden başka hücrelere farklılaşabilme (Biehl ve Russell, 2009) hasarlı dokuya verildiğinde dokuyu onarabilme özellikleri ile tanımlanan hücre tipidir. Bol miktarda bulunmaları, kolay elde edilebilmeleri, birçok hücre tipine farklılaşarak çoğalabilmeleri, otolog veya allojenik alıcılara güvenli ve etkin bir şekilde nakledilebilmeleri nedeniyle rejeneratif tıp uygulamalarında tercih edilmektedir (Can, 2008; Luciana Machado, June 27, 2013).

Hücrelerin "kök hücre" tanımına girebilmesi için iki temel özelliği sergilemeleri gerekir. İlk olarak, kök hücreler, köken hücrenin tıpatıp aynısını üretmek için sınırsız kendini yenileme yeteneğine sahip olmalıdır. Bu özellik, kontrolsüz bir şekilde bölünen kanser hücreleri için de geçerlidir, oysa kök hücre bölünmesi yüksek oranda düzenlenir.

Bu nedenle, kök hücreler için ek gereksinime dikkat etmek önemlidir, sağlıklı hayvanın bir parçası haline gelen özel bir hücre tipine farklılaşabilirler. İki ana kök hücre sınıfı vardır: yetişkin vücudundaki herhangi bir hücreye dönüşebilen pluripotent ve daha sınırlı bir hücre popülasyonu haline gelmekle sınırlı multipotent (Biehl ve Russell, 2009).

Bir hücreyi kök hücre olarak tanımlayabilmek için 5 adet ölçüt vardır.

- Kök hücreler, uzun süre bölünebilme ve kendi kendini yenileme yeteneğine sahiptirler. Hücrelerin uzun süre bölünebilmelerini belirleyen faktörlerden birisi, kromozomların ucunda bulunan telomer adı verilen ve binlerce kez tekrarlanan kısa DNA tekrar dizileridir (TTAGGG). Telomerler kromozom uçlarının parçalanmasını, diğer kromozomlarla kaynaşmasını engelleyerek kromozomların yapısal bütünlüğünün korunmasını sağlar.
- Kök hücreler özelleşmemişlerdir. Özelleşmiş hücrelere dönüşmek üzere kaynak oluşturabilirler.

- Kök hücreler, özelleşmemiş hücrelere kaynaklık edebilirler ve birden fazla hücre tipine farklılaşabilirler. Bunun en iyi örneğini döllenmiş yumurta hücresinde görebiliriz.
- Kök hücreler; doku hasarına sahip alıcı bireye, nakil işlemi sonrasında hedef dokuda işlev gösterecek şekilde çoğalabilirler. Buna en iyi örnek, olarak hematopoetik kök hücrelerde, karaciğer öncül hücrelerinde ve sinir kök hücrelerinde gösterilmiştir.
- Kök hücreler, in vivo şartlarda doku hasarının olmadığı durumlarda bile farklılaşmamış kuşaklara katkı sağlayabilirler. Buna en iyi örnek, embriyonik veya erişkin kök hücrelerinin (nöral, mezenkimal) blastosiste enjekte edildiklerinde farklı hücre tiplerine kaynaklık edebilmeleridir (Catherine M. Verfaillie, 2002; KARAŞAHİN, 2012).

Uzmanlaşmanın birkaç aşaması vardır. Gelişim potansiyeli her adımda azalır, bu da unipotent bir kök hücrenin pluripotent bir kök hücre kadar çok hücre tipine farklılaşamayacağı anlamına gelir (Zakrzewski ve ark., 2019).

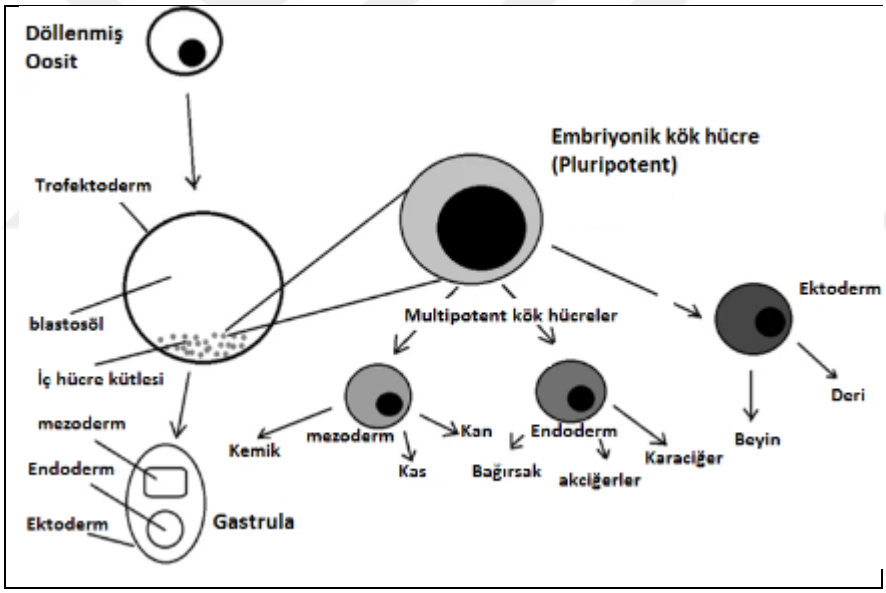
Unipotent kök hücre: Unipotent kök hücreler yalnızca tek hücre tipine dönüşebilen kök hücrelerdir (Catherine M. Verfaillie, 2002; KARAŞAHİN, 2012).Unipotent kök hücreler, en dar farklılaşma yetenekleri ve tekrar tekrar bölünme özelliği ile karakterize edilir. İkinci özellikleri onları rejeneratif tıpta terapötik kullanım için umut verici bir aday yapar. Bu hücreler yalnızca bir hücre tipi oluşturabilir, örn: dermatositler.

Oligopotent kök hücre: Oligopotent kök hücreler birkaç hücreye farklılaşabilen hücre türleridir. Bir miyeloid kök hücre, beyaz kan hücrelerine bölünebilen ancak kırmızı kan hücrelerine bölünemez bu nedenle oligopotent kök hücreye bir örnektir (Zakrzewski ve ark., 2019).

Totipotent kök hücre: Embriyoya ait, ilerleyen safhalarda tüm doku ve organların kaynağını oluşturabilme yeteneğine sahip kök hücrelerdir (Catherine M. Verfaillie, 2002; KARAŞAHİN, 2012).Totipotent kök hücreler bölünebilir ve tüm organizmanın hücrelerine farklılaşabilir. Totipotens en yüksek farklılaşma

potansiyeline sahiptir ve hücrelerin hem embriyo hem de ekstraembriyonik yapılar oluşturmasını sağlar. Bir totipotent hücre örneği, bir spermin bir yumurtayı döllemesinden sonra oluşan bir zigottur. Bu hücreler daha sonra ya üç germ tabakasından herhangi birine dönüşebilir ya da bir plasenta oluşturabilir. Yaklaşık 4 gün sonra blastosistin iç hücre kütlesi pluripotent hale gelir.Bu yapı pluripotent hücrelerin kaynağıdır (Zakrzewski ve ark., 2019).

Pluripotent kök hücre: Pluripotent kök hücreler, vücuttaki tüm hücre tiplerine farklılaşma yeteneğine sahip oldukları için bu şekilde adlandırılmıştır. Doğal gelişimde, pluripotent kök hücreler, sonunda vücudun özel dokularına yol açan daha özelleşmiş multipotent kök hücrelere farklılaşmadan önce embriyoda çok kısa bir süre için mevcuttur.



Şekil 1.1. Yabanil embriyo gelişimi sırasında hücreler, yabanil embriyo gelişimi sırasında döllenmiş yumurtadan blastosiste, gastrulaya kadar çoğalır ve gelişir. Pluripotent, embriyonik kök hücreler, blastosistin iç hücre kütlesinden elde edilir. Multipotent kök hücreler, gelişmekte olan gastrulada bulunur veya pluripotent kök hücrelerden türetilir ve yalnızca ilgili germ tabakasındaki hücrelere yol açmakla sınırlıdır (Zakrzewski ve ark., 2019).

Bu daha sınırlı multipotent kök hücreler birkaç alt tipte gelir: Bazıları yalnızca belirli bir germ hattının hücreleri (endoderm, mezoderm, ektoderm) ve diğerleri, yalnızca belirli bir dokunun hücreleri olabilir. Başka bir deyişle, pluripotent hücreler sonunda, kendileri bir dizi bölünmeden daha da sınırlı özel hücrelere geçen multipotent kök hücrelere farklılaşarak vücudun herhangi bir hücresi haline gelebilirler.

1.6.1. Kök Hücre Kaderleri

Kök hücrelerin tanımlayıcı iki özelliğine (sınırsız kendini yenileme ve farklılaşma yeteneği) dayanarak, dört sonuca veya kadere sahip oldukları tanımlanabilir. Multipotent kök hücreler için ortak bir kader, bölünmeden veya farklılaşmadan hareketsiz kalmak ve böylece kök hücre havuzundaki yerini korumaktır.

Bunun bir örneği, kemik iliğinde vücuttan aktive edici sinyaller bekleyen kök hücrelerdir. Kök hücrelerin ikinci bir kaderi, tıpkı ana hücre gibi iki yavru kök hücrenin hücre bölünmesinden ortaya çıktığı simetrik kendi kendini yenilemesidir. Bu, farklılaşmış soy ile sonuçlanmaz, ancak sonraki bölünmelerde özelleşmiş hücrelerin gelişebileceği kök hücre havuzunu arttırır.

Üçüncü kader, asimetrik kendini yenileme, bir kök hücre, biri ebeveynin bir kopyası, diğeri somatik veya progenitör hücre olarak adlandırılan daha özel bir hücre olan iki yavru hücreye bölündüğünde meydana gelir. Asimetrik kendini yenileme, gelecek için kök hücre havuzunu korurken, doğal doku gelişimi/rejenerasyonu için ihtiyaç duyulan farklılaşmış neslin üretilmesiyle sonuçlanır.

Dördüncü kader, bir kök hücrenin, her ikisi de ana hücreden farklı iki hücreyi üretmek için bölündüğü şeydir. Bu, kök hücre havuzunda net bir kayıp ile farklılaşmış neslin daha fazla çoğalmasına neden olur.

Kök hücrelerin kaderini belirleyen faktörler yoğun araştırmaların odak noktasıdır. Ayrıntıların bilinmesi klinik olarak faydalı olabilir.

1.6.2. Kök Hücre Kaynakları

Pluripotent: Günümüzde araştırmalarda kullanılan pluripotent kök hücreler esas olarak embriyolardan gelmektedir ve bu nedenle embriyonik kök hücreler adı verilmektedir. Birkaç günlük preimplantasyon embriyoları, iç hücre kütlesinde sadece %10-15 oranında pluripotent hücre içerir.

Bu pluripotent hücreler izole edilebilir, ardından pluripotentlerini sürdürürken birçok çoğalma döngüsü için bilinmeyen indükleyici ajanlar sağlayan bir "besleyici" hücre tabakası üzerinde kültürlenebilir. Son zamanlarda, iki farklı bilim insanı grubu, proliferasyon, morfoloji ve gen ekspresyonu gibi embriyonik kök hücrelerle aynı özelliklerin bazılarını paylaşan "uyarılmış pluripotent kök hücreler" (iPS) elde etmek için moleküler manipülasyon yoluyla yetişkin hücreleri pluripotent duruma geri döndürdü (belirli yüzey işaretleri ve eksprese edilen proteinler şeklinde). Her iki grup da transkripsiyon faktörleri için genleri yetişkin hücrelere taşımak için retrovirüsler kullandı.

Bu genler kopyalandı ve yetişkin çekirdeği tekrar embriyonik durumuna yeniden programlamak için tasarlanmış diğer genlerin ekspresyonunu düzenleyen proteinlere çevrildi. Her ikisi de Sox2 ve Oct4 olarak bilinen embriyonik transkripsiyon faktörlerini tanıttı. Bir grup ayrıca Klf4 ve cMyc4'ü ekledi ve diğer grup Lin28 ve Nanog'u ekledi. Diğer faktör kombinasyonları da muhtemelen işe yarayacaktır, ancak ne yazık ki, ne retroviral taşıyıcı yöntemin ne de onkojenik transkripsiyon faktörü c-Myc'nin kullanımının insan tedavisi için onaylanması olası değildir.

Sonuç olarak, genleri hücrelere iletmek için tamamen kimyasal bir yaklaşım ve daha güvenli transkripsiyon faktörleri deneniyor. Bu deneylerin sonuçları umut verici görünüyor.

Multipotent: Multipotent kök hücreler klinik kullanım için uygun bir seçenek olabilir. Bu hücreler, belirli bir germ tabakası için tüm progenitör hücreler haline gelecek plastisiteye sahiptir veya belirli bir dokunun sadece bir ya da iki özel hücre tipiyle sınırlandırılabilir. En yüksek farklılaşma potansiyeline sahip

multipotent kök hücreler, gastrulasyon sırasında gelişen embriyoda bulunur (insanlarda 14-15 gün, farelerde 6.5-7. gün).

Bu hücreler, kendi özel germ tabakasının tüm hücrelerini meydana getirirler, bu nedenle, farklılaşma kapasitelerinde hala esnekliğe sahiptirler. Pluripotent kök hücreler değildirler çünkü her üç germ tabakasının hücresi olma yeteneklerini kaybetmişlerdir. Plastisite spektrumunun alt ucunda, deri kök hücreleri veya kas kök hücreleri gibi yalnızca bir özel hücre tipi haline gelebilen unipotent hücreler bulunur. Bu kök hücreler tipik olarak kendi organlarında bulunur ve farklılaşma kapasiteleri sınırlı olsa da, bu sınırlı progenitör hücreler, yaşlanan veya hasarlı hücreleri yenileyerek doku bütünlüğünü korumada hayati bir rol oynar. Bir dizi farklılaşma kapasitesini işgal eden birçok başka multipotent kök hücre alt tipi vardır.

Örneğin, gastrulanın mezoderminden türetilen multipotent hücreler, onları kas ve bağ dokusu ile sınırlayan bir farklılaşma aşamasına girerler; bununla birlikte, daha fazla farklılaşma, yalnızca bağ dokusuna yönelik artan uzmanlaşma ile sonuçlanır ve hücreler yalnızca kıkırdak veya yalnızca kemiğe yol açana kadar bu böyle devam eder.

Kemik iliğinde bulunan multipotent kök hücreler en iyi bilinir, çünkü bunlar 1960'lardan beri terapötik olarak kullanılmaktadır (potansiyelleri daha sonraki bir bölümde daha ayrıntılı olarak tartışılacaktır). Son araştırmalar ile plasenta ve göbek kordon kanı gibi daha fazla plastisiteye sahip multipotent kök hücreler için yeni kaynaklar bulundu. Ayrıca, yakın zamana kadar kök hücrelerden yoksun olduğu düşünülen kalbin artık kardiyak miyosit olma potansiyeline sahip kök hücreler içerdiği bilinmektedir. Benzer şekilde, beyinde nöro-progenitör hücreler bulunmuştur. Kardiyak kök hücreler o kadar az sayıdadır ki, incelenmesi zordur ve işlevleri tam olarak belirlenememiştir.

1.6.3. Kök Hücreleri Tanımlayan Özellikler

Pluripotent: Amerika Birleşik Devletleri'nde insan embriyonik kök hücreleri için Federal fon kısıtlı olduğundan, birçok bilim insanı bunun yerine fare modelini kullanmaktadır. Mürin ve insan pluripotent kök hücreleri, süresiz olarak kendini yenileme ve her üç germ tabakasının hücre tiplerine farklılaşma yeteneklerinin yanı sıra, pek çok ortak noktaya sahiptir.Memelilerde paylaşılan genomik diziler ve hücre içi yapı verilen türler arasında bu kadar çok pluripotens özelliğinin korunması şaşırtıcı olmamalıdır.

Hem fare hem de insan hücreleri kültürde süresiz olarak çoğalır, yüksek bir çekirdek/sitoplazma oranına sahiptir, diğer canlı hücrelerden türetilen büyüme faktörlerinin desteğine ihtiyaç duyar ve benzer yüzey antijenleri, transkripsiyon faktörleri ve enzimatik aktivite (yani yüksek alkalin fosfataz aktivitesi) sergiler. Bununla birlikte, fare ve insan pluripotent hücreleri arasındaki farklar, ince olsada çok önemlidir. Yetişkin hücrelerden (Oct3/4 ve Sox2) pluripotensi indüklemek için yukarıda bahsedilen transkripsiyon faktörleri paylaşılsa da, bunları düzenlemek için gereken hücre dışı sinyaller farklıdır.

Fare embriyonik kök hücreleri lösemi önleyici faktöre ve kemik morfogenetik proteinlerine ihtiyaç duyarken, insan sürekli pluripotens için sinyal proteinleri Noggin ve Wnt'ye ihtiyaç duyar. Pluripotent hücreleri tanımlamak için kullanılan yüzey belirteçleri, yapışma molekülü SSEA'nın (farede SSEA-1, insanlarda SSEA-3 ve 4) varyantlarında görüldüğü gibi iki tür arasında biraz farklılık gösterir. Bu nedenle, fare hücrelerinde pluripotens araştırması değerli olsada, insan tedavisiyle doğrudan bir korelasyon olması olası değildir. Son olarak, fare ve insan kök hücreleri arasındaki büyük fark, araştırmaya eşlik eden ahlaki ve etik ikilemlerdir. Bazı insanlar insan embriyonik kök hücreleriyle çalışmanın etik açıdan sorunlu olduğunu düşünürken, çok az insanın fare modelleriyle çalışma konusunda çekinceleri vardır.

Bununla birlikte, insan ve fare hücreleri arasındaki biyolojik farklılıklar göz önüne alındığında, çoğu bilim insanı, yalnızca kemirgenler üzerinde çalışarak insan tedavisi ile ilgili verilerin gözden kaçırılacağına inanmaktadır.

Multipotent: Hücre yüzey belirteçleri tipik olarak multipotent kök hücreleri tanımlamak için de kullanılır. Örneğin, mezenkimal kök hücreler, bağlı hücre tiplerinin belirteçlerini ifade eden hücreleri ortadan kaldırarak, soy negatif zenginleştirme olarak adlandırılan bir adım ve ardından sca-1 ve c- ifade eden hücreleri daha fazla ayırarak tüm kemik iliği aspiratından saflaştırılabilir.

Mezenkimal kök hücreleri gösteren kit yüzey belirteçleri hem soy negatif zenginleştirme adımı hem de sca-1/c-Kit izolasyonu, akış sitometrisi kullanılarak gerçekleştirilebilir ve aşağıdaki incelemede daha ayrıntılı olarak tartışılmaktadır. c-Kit yüzey belirteci, yakın zamanda keşfedilen kardiyak kök hücreleri miyokardın geri kalanından ayırt etmek için de kullanılır. Kardiyovasküler araştırmalarda son zamanlarda yapılan pek çok çalışma, hangi belirteçlerin (prekardiyak miyositlere) yol açacak erken multipotent hücreleri gösterdiğini bulmaya odaklanmıştır. Spesifik mezodermal işaretleyici Kdr'ye sahip hücreler, kardiyak miyositleri, endotelyal hücreleri ve vasküler düz kas hücrelerini içeren kardiyovasküler sistemin progenitör hücrelerine yol açar ve bu nedenle kardiyovasküler soy spesifikasyonuna sahip en erken hücreler olarak kabul edilir. Bu erken aşamadaki hücreler hala kolayca çoğalır ve yine de kardiyovasküler sistemin hücreleri olmaya mahkumdur ve bu nedenle terapötik olarak büyük değere sahip olabilir.

1.6.4. Farklılaşma

Pluripotent: Bilim insanları hala kök hücrelerin farklılaşmasını belirli hücre tiplerine güvenilir bir şekilde yönlendirmek için mücadele ediyor. Bu amaçla kuluçka faktörlerinden oluşan sanal bir alfabe çorbası kullandılar (çeşitli büyüme faktörlerini, kimyasalları ve hücrelerin üzerinde büyüdüğü karmaşık substratları denemek dahil) ama şimdiye kadar sadece orta düzeyde bir başarı elde ettiler. Bu karmaşıklığın bir örneği olarak, kardiyak miyositlere doğru farklılaşmayı sağlamak

için böyle bir yaklaşım, kimyasal aktivin A ve büyüme faktörü BMP-4'ü kullanmaktır. Bu iki faktör pluripotent kök hücrelere hem konsantrasyon hem de zamansal olarak sıkı kontrollü bir şekilde uygulandığında, kardiyak miyositlere farklılaşmada artan verimlilik görülür, ancak yine de hücrelerin sadece %30'unun kardiyak olması beklenebilir.

Multipotent: Multipotent hücreler ayrıca hücre tedavisi için başlangıç noktası olarak, yine belirli, istenen bir soy yönünde farklılaşmayı indüklemek için büyüme faktörleri ve/veya kimyasalların karışım ile kullanılmıştır. Mezenkimal kök hücreleri nöronal hücrelere dönüştürmek için retinoik asit kullanımı veya kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin kardiyak miyosit belirteçlerini eksprese etmesini sağlamak için büyüme faktörü-β'yi dönüştürmek gibi bazı protokoller basittir.

Diğerleri, kültürdeki hücreler tarafından salgılanan bilinmeyen faktörlerin eklenmesi gibi karmaşık veya kötü tanımlanmıştır. Fiziksel olduğu kadar kimyasal ipuçları da kök hücrelerin farklılaşmasına neden olur. Hücrelerin kültürlendiği substratın sertliğini basitçe değiştirmek, kök hücreleri nöronal, miyojenik veya östeojenik soylara yönlendirebilir. Hücreler fiziksel ve kimyasal ortamlarda evrimleşirler, bu nedenle kök hücrelerin optimal farklılaşması için muhtemelen her ikisinin bir kombinasyonu gerekli olacaktır. Hücre ortamındaki fiziksel ipuçlarının önemi, bu serinin son incelemesinde daha ayrıntılı olarak tartışılacaktır. İdeal olarak, kök hücrelerin terapötik olarak kullanılması için, hücrelerin iyi kontrol edilen ve iyi tanımlanmış bir varlık olması için verimli, tek tip protokoller oluşturulmalıdır (Biehl ve Russell, 2009).

Genel tanım olan “kök hücre” birçok farklı hücre tipini kapsar. Genel olarak, "embriyonik" ve "yetişkin" değiştiricileri, kök hücreleri geldikleri hayvanın gelişim aşamasına göre ayırt etmek için kullanılır, ancak yeni araştırmalar tamamen farklılaşmış yetişkin hücrelerin nasıl geri döndürüleceğini keşfettikçe bu terimler yetersiz kalmaktadır. Yetişkin kök hücreler, daha doğrusu “vücuttan” anlamına gelen “somatik” kök hücreler olarak adlandırılır. Embriyonik kök

hücreler fetüste, plasenta, göbek kordonu kanında ve bebeklerde bulunur (Biehl ve Russell, 2009).

Embriyonik kök hücre: Kök hücre tipleri arasında yer alan embriyonik kök hücreler ,canlı organizmada bulunan her çeşit hücre ve dokuya dönüşebilme kapasitesi nedeniyle doku mühendisliği ve rejeneratif tıp alanında önemle üzerinde durulan bir kök hücre grubudur (KANSU, 2006; ŞİMŞEK, 2012).

Embriyonik kök hücreler , implantasyon öncesi erken gelişim döneminde , blastosist aşamasına ulaşmış embriyolardan elde edilirler . Bu aşamadaki bir embriyo iki farklı hücre tipinden oluşur. Dış kısımda bulunan ve trofektoderm adı verilen hücreler implantasyon sonrası plasenta yapısını oluşturmaktadırlar. İç Kısımda bir kitle halinde bulunan innercellmass (ICM) hücreleri ise fetüs yapısını oluştururlar. Embriyonik kök hücreler iç kısımdaki bu hücrelerin özel immünolojik ve mekanik özel besiyeri ve büyüme faktörü içeren ortamlarda inkübasyonu ile elde edilmektedirler (MARTIN, December 1981).

Embriyonik kök hücreler ploripotent hücreler olup ,uygun sinyallerle uyarıldıklarında vücutta yaklaşık 200 hücre tipine dönüşebilme kapasitesine sahiptirler .Embriyonik kök hücreleri çok önemli iki özellikleri sayesinde rejeneratif tıbbın odak noktası haline gelmişlerdir:

1. Kendini yenileme süreci ile farklılaşmaksızın prolifere olma becerisi
2. Farklılaşma için indüklendiklerinde özelleşmiş hücre türleri oluşturma potansiyeli (İskender ve ark., 2014; Smith, 2001).

Günümüzde üç farklı kaynaktan embriyonik kök hücre elde edilebilmektedir.

1. İnvitrofertilizasyon ünitelerinden kullanılmayan embriyolardan elde edilen embriyonik kök hücreler: bu hücreler gerçek embriyonik kök (gEK) hücre veya fertil embriyonik kök (fEK)hücre olarak isimlendirilir.

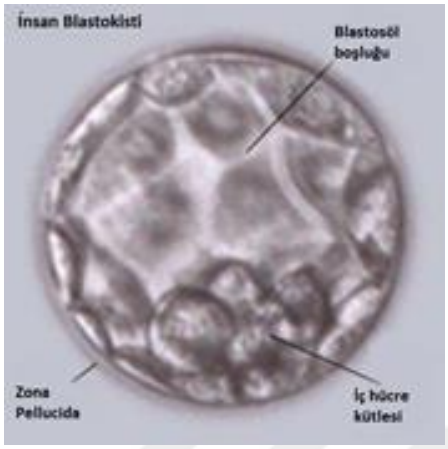
2. Somatik nükleer transfer metoduyla elde edilen embriyonik kök hücreler : Bu metotla yumurta hücresinin çekirdeği ince iğne yardımı ile çıkartılıp ,yerine vücut somatik hücre çekirdeği nakledilir.Yeniden programlanan yumurta hücresi aktif edilip çoğalmaya bırakılır.Bu metotla elde edilen hücre nükleer transfer embriyonik kök (ntEK) hücre olarak isimlendirilir (Tachibana ve ark., 2013).
3. Döllenmemiş yumurta hücrelerinden parthenojenez parthenojenez ile elde edilen embriyonik kök hücrelere: Bu hücreler partenogenetik embriyonik kök (pgEK) hücre denir. Elde edilen embriyoya parthenot denir (Daughtry ve Mitalipov, 2014).

1.6.5. Embriyonikli Olanlar

1.6.5.1. Embriyonik kök hücreler

İnsan embriyonik kök hücreleri (ES hücreleri), kendi kendini yenileyen ve tüm hücre tiplerine farklılaşan farklılaşmamış hücrelerdir. ES hücrelerinin fareden türetilmesi ilk olarak 1981'de rapor edildi ve 1998'de insan ES hücre dizilerinin türetmeleri rapor edildi. Embriyonik kök hücreler, embriyonun iç hücre kütlesinden (ICM) izole edilir. ICM hücreleri herhangi bir hücre tipi oluşturma potansiyeline sahiptir, ancak implantasyondan sonra bu hücreler diğer hücre tiplerine farklılaşır.

ES hücreleri, blastosist fazı sırasında embriyonun iç hücre kitlesinden immün cerrahi ile izole edilebilir ve genellikle embriyonik fibroblast hücrelerinden oluşan besleyici katmanlarda büyütülür. Son raporlar, bu hücrelerin bir besleyici katman kullanılmadan büyütülebileceğini göstermiştir. Bu hücreler, farklılaşmamış durumlarını 80 geçiş boyunca koruyarak kültürde uzun ömürlülük göstermiştir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, insan hESC'lerinin keratinositler, kondrosit ve osteosite farklılaştığını göstermiştir.



Şekil 1.2. İnsan Blastokisti(Zare ve ark., 2014)

1.6.5.2. Embriyonik Germ Hücreleri

1998'de, elde edilen insan dokusunun gonadal sırtından türetilen germ hücrelerinin izolasyonu, kültürü ve karakterizasyonu gösterildi. Embriyonik germ (EG) hücreleri, ilkel fetal dokudaki ilkel germ hattı hücrelerinden türetilir. Potansiyel kader aralığı, embriyonik kök hücrelere kıyasla nispeten sınırlı olacaktır, çünkü EG hücreleri evrim sürecinde çok daha ileridedir (5-9 hafta). Fetal doku, biriken progenitörler sağlayabilir, ancak büyük ölçekli kaynak bulma ve bu tür hücreleri kullanan ürünlerin inşası olasılığı şüphelidir.

Ayrıca, bu hücrelerin in vivo davranışı iyi anlaşılmamıştır; ektopik doku oluşumu, tümör indüksiyonu veya diğer olağandışı gelişmeler dahil olmak üzere istenmeyen sonuçlardan kaçınmak için çok fazla araştırma yapılması gerekecektir.

1.6.5.3. Amniyotik Epitel Hücreleri

Amniyotik epitel hücreleri (AEC'ler), plasentadaki amniyotik zardan türetilir. Bu hücreler, pluripotent embriyonik kök hücrelerde ve Oct4, Nanog ve alkalin fosfataz (AP) gibi embriyonik germ hücrelerinde bulunan belirteçleri ifade eder. Ayrıca, bu hücreler, üç germ katmanından hücre soylarında ESC'ler ve EGC'ler olarak farklılaşır. İmmün yetmezliği olan hayvanlara nakledildiğinde

belirgin pluripotens veya teratojenik potansiyel kaybı olmaksızın yüksek oranda çoğaldıkları gözlemi nedeniyle, amniyotik sıvı kök hücreleri, hESC'lere daha güvenli bir alternatif olarak kabul edildi.

1.6.5.4. Amniyotik Sıvıdan Kaynaklanan Kök Hücreler

2007 yılında amniyotik sıvıdan multipotent kök hücre izolasyonu yapıldı. Bu farklılaşmamış hücrelerin bazı embriyonik kök hücre belirteçlerini ifade ettiği bulundu. Bu hücreler, iki tip kök hücre, ESC'ler ve ESC olmayanlar arasında vasat bir aşama gösterir. Amniyotik sıvıdan türetilen kök hücrelerin yoğun şekilde genişlediği bulundu. Bu sonuç, uzun telomerleri iki katına çıkaran ve 250'den fazla popülasyon iki katına çıkaran bir besleyici katman kullanmaya gerek kalmadan elde edildi. Bu hücreler in vivo olarak teratomlar oluşturdu. Bu hücreler, üç ana embriyonik germ tabakasından herhangi birine karşılık gelen fonksiyonel hücrelere farklılaşma yeteneğine sahiptir.

Bu hücreler adipojenik, osteojenik, miyojenik, endotelyal, nöronal ve hepatik hücrelere yol açabilir. Bu kadar yaygın ve kolay erişilebilir bir kaynaktan genetik ve fenotipik olarak sabit pluripotent hücreleri türetme yeteneği, gelecekte rejeneratif terapiye potansiyel olarak vurgu yapacaktır.

1.6.5.5. Göbek Kordon Kanı Kök Hücreleri

1980'lerde göbek kordonu kanı kök hücreleri, HSCS'nin önemli bir kaynağı olarak kabul edildi. Plasentadan ve göbek kordonundan alınan kan, değerli bir hematopoietik kök hücre kaynağıdır. Kordon kanı kök hücre teknolojisi, embriyonik ve diğer yetişkin kök hücrelere göre çeşitli nedenlerle birçok avantaja sahiptir; (A) kordon kanı, teorik olarak her doğumda toplanabilen potansiyel olarak sınırsız bir kök hücre kaynağı gösterir; (B) kordon kanının denenmiş ve test edilmiş teknoloji kullanılarak işlenmesi ve saklanması nispeten basittir ve sıvı nitrojen içinde dondurulduktan sonra biyolojik olarak stabildir; (C) Kordon kanı

toplama invaziv olmayan bir yöntemdir. Kordon kanı toplanmazsa biyolojik atık olarak atılır; ve (D) kordon kanı düşük enfeksiyon riski taşır.

1.6.6. Embriyonik Olmayan

1.6.6.1. Kemik İliği Hematopoetik Kök Hücreler

Hematopoietik kök hücreler spesifik morfolojik özelliklere sahiptir. Hücre yüzeyi belirteçleri kan akışında ve hedef dokularda etiketlenmelerine ve izlenmelerine veya laboratuvarda izole edilmelerine ve kültürlenmelerine izin verir. Hematopoetik kök hücreler, tüm kemik iliğinin %0.05'inden daha azını temsil eder, ancak tüm kan oluşturan soyları yeniden oluşturma potansiyeline sahiptir.

1.6.6.2. Kemik İliği Stromal Kök Hücreler

Bilim insanları, kemik iliği stromasını bağ dokusu hücrelerinin heterojen bir popülasyonu olarak tanımladılar. Bu hücreler yapısal olarak kemik iliği hematopoezini destekler. Heterojen hücrelerin bu yapısı, kemik iliği hücrelerini destekleyen hematopoietik kök hücrelerin nişini oluşturur. Kemik iliği stromal hücresi (BMSC'ler) terimi, bağ dokuları oluşturma potansiyeli olan izole edilmiş kemik iliği hücrelerine uygulanır. Bu BMSC'ler arasında, mezenşimi oluşturabilen farklılaşmamış multipotent hücrelerin bir alt popülasyonu vardır. Bu hücreler tüm postnatal dokularda bulunur ve mezenkimal kök hücreler olarak tanımlanır. Bu hücreler, laboratuvarda kemik, bağ, yağ, kıkırdak ve kas dahil olmak üzere çoklu mezenkimal hücre soylarına farklılaşır. BMSC'ler veya MSC'ler, yoğunluk gradyanlı santrifüjleme ile ayrıldıktan sonra genellikle mononükleer kemik iliği tabakasından izole edilir. Bu mononükleer hücreler, %10-15 fetal buzağı veya otolog serum içeren kültür ortamında kültürlenir. BMSC'ler doku kültürü plastiğine yapışır ve küçük yapışık fibroblast benzeri hücreler bırakır. Bu hücreler hızla bölünür ve çoğalır.

1.6.6.3. Multipotent Yetişkin Progenitör Hücreler

Yetişkin kemik iliği heterolog bir popülasyona sahiptir. Multipotent yetişkin progenitör hücreler olarak adlandırılır ve embriyonik kök hücrelerden izole edilmiş veya bunlarla yakından ilişkili bir kök hücre popülasyonunu düzenler.

1.6.6.4. Mezenkimal Kök Hücreler

Mezenkimal kök hücreler (MSC'ler) kendini yenileme ve birden fazla hücreye farklılaşma yeteneğine sahiptir. MSC'ler multipotenttir ayrıca yağ, deri ve kemik iliği içeren çeşitli dokulardan kolayca türetilir. Günümüzde, kemik iliği ve diş eti, MSC'lerin ana kaynakları olarak kabul edilir. Bu hücreler görünüşte fibroblastlardır ve birçok pasaj için yerleştirilebilirler. Mezenkimal kök hücre popülasyonları güçlü bir şekilde yapışıktır. Mezenkimal kök hücreler, kıkırdak, kemik, yağ ve damar dokusunun yeniden şekillenmesinden sorumlu olan birçok bağ dokusu hücresine dönüşebilir.

MSC'ler dolaşımdaki kandan ayrıca sinovyium, yağ dokusu, trabeküler kemik, dermis, diş özü ve akciğer gibi çeşitli hematopoietik olmayan dokulardan elde edilebilir. İnsan yetişkin mezenkimal kök hücreleri, hematopoietik olmayan, kendi kendini yenileme kapasitesine ve çok soylu farklılaşma potansiyeline sahip yapışık fibroblast benzeri hücrelerdir. İzole MSC'ler Thy-1 (CD90), SH-2/endoglin (CD105), SH-3/4 (CD73), b-1-integrin (CD29) ve CD44 gibi yüzey belirteçlerine sahiptir ve hematopoietik belirteçler için negatiftir: CD34, CD14 ve CD45.

1.6.6.5. Sinir Kök Hücreleri

Nöral kök hücreler kendini yenileyebilir ve glial ve nöronal soylar üretme kapasitesine sahiptir. Nöronal kök hücreler, embriyoların ve yetişkinlerin beyinlerinden izole edilmiştir.Yetişkin nöral kök hücreler, başta oligodendrositler, astrositler ve nöronlar olmak üzere beynin hücre tiplerine farklılaşma potansiyeline sahiptir ve Parkinson hastalığı için nakillerde kullanılır. Bu hücreler multipotent

olabilir. Beyin hasarı modellerinde, nöral kök hücreler (NSC'ler) bu nörojenik bölgelerde çoğalır ve hasar bölgesine doğru göç eder.

1.6.6.6. Pankreas Kök Hücreleri

Memeli yetişkin pankreasının üç doku tipi vardır, duktal tree, ekzokrin asini ve Langerhans'ın endokrin adacıkları. Yetişkin kemirgen ve insan pankreasındaki kanallar ve adacıklar içinde multipotent hücre progenitörleri tanımlanmıştır. Pankreatik kök hücreler (PSC'ler), nestin kök hücre belirteçleri, ATP bağlayıcı kaset taşıyıcı (ABCG2) ve KIT sunan insan fetal pankreasından türetilmiştir.

1.6.6.7. Cilt Kök Hücreleri

Deri vücuttaki en büyük organdır. Deri, embriyonik ektoderm germ tabakasından elde edilir. 2001 yılında, multipotent hücrelerin dermisten izolasyonu rapor edildi. Bu hücreler, nöronlar, glia, düz kas ve adipositler dahil olmak üzere hem nöral hem de mezodermal hücreler üretmek için kültürde çoğaldı ve farklılaştı. Nestin Pozitif, deriden türetilen öncül (GEMİler) farklı bir kök hücre türüdür. SKP'ler tarafından üretilen çoğu sinir hücresi, periferik nöronlara ve Schwann hücrelerine benzer. Bu nedenle, SKP'ler embriyonik nöral krest ile ilgili bir öncüyü temsil eder. SKP'ler, 1-2 cm kadar küçük sünnet derisi örneği ve kafa derisinden alınan küçük punch biyopsileri dahil olmak üzere insan dokusundan elde edilebilir.

SKP'ler, sinir sisteminin rejeneratif tıbbı için kullanılabilen mevcut bir nöral öncül kaynağıdır. Bazı araştırmalar, saç köklerinin üst bölgesinin, yani çıkıntı bölgesinin, doku hasarından sonra saç köklerinin uzun süreli büyümesinden ve epidermisin yenilenmesinden sorumlu olan multipotent kök hücrelerin nişini oluşturduğunu göstermiştir. Daha spesifik olarak, CD34, K5 ve 6 integrini eksprese eden çıkıntı alanı içindeki multipotent epitel kök hücreleri (bESC'ler) çoğalabilir ve

foliküler epitelin yanı sıra ciddi yaralanmadan sonra IFE ve yağ bezlerini oluşturan yeni hücrelere yol açabilir.

Yetişkin memeli kıl folikülündeki çıkıntı alanı ayrıca, embriyonik nöral krest kök hücrelerine benzer çeşitli özellikler gösteren bir pluripotent epidermal nöral krest kök hücre (eNCSC) popülasyonu içerir. Çıkıntı alanındaki pluripotent eNCSC'ler ayrıca kendi kendini yenileyebilir ve melanositler, nöronlar, Schwann hücreleri, düz kas hücreleri ve kondrositler dahil olmak üzere in vivo olarak birden fazla hücreye yol açabilir.

1.6.6.8. Kardiyak Kök Hücreler

Kardiyak kök hücreler farklılaşmamıştır ve memelilerin yetişkin kalbinde bulunur. Bu hücreler, yetişkin kalp içinde devam eden hücrelerin onarımı ve ikamesi için endojen mekanizmalara aracılık eder. Kardiyak progenitör hücreler multipotenttir ve in vivo olarak kök hücrelerin önemli özelliklerine sahip olan kardiyomiyositlere ve koroner damarlara yol açar. Kardiyak kök hücreler, hastalardan izole edilebilir ve çok sayıda hücre üretmek için ex vivo olarak kültürlenebilir.

Yakın tarihli bir rapor, MI sonrası kardiyak kök hücrelerin sayısının arttığını, ancak kronik adımda sayıların düştüğünü ve artık kardiyak kök hücrelerin daha az rejeneratif kapasiteye sahip olduğunu göstermiştir. İnsan kardiyak kök hücrelerinin klinik denemesi yoktur.

1.6.6.9. Yağ Kök Hücreleri

İnsan yağ dokusu, multipotent kök hücre kaynağıdır. Adipozdan türetilen kök hücreler (ADSC'ler), in vitro olarak kondrojenik, adipojenik, osteojenik, hepatik ve nörojenik soylar dahil olmak üzere çeşitli diğer hücre hatlarına farklılaşmak üzere indüklenebilir. Çalışmalar, bu hücrelerin transkripsiyonel düzeyde fenotip ve genotipinin BMSC'lerinkiyle tamamen benzer olduğunu gösterdi. ADSC'ler rejeneratif tıp için iyi bir kaynaktır ve popülasyonun ikiye

katlanması ve yavaş yaşlanma ile uzun süreler boyunca korunabilir. Kemik iliği iyi bir kök hücre kaynağı olmasına rağmen, türetilmesi invaziv bir yöntemdir ve türetilen hücre sayısı düşük ve yaşa bağlı olabilir. Ek olarak, kemik iliğinden elde edilen mononükleer hücrelerin sadece %0.01-0.001'i koloni oluşturan birimlere yol açar, ancak yağ dokusu çok miktarda kök hücre verebilir ve bol miktarda elde edilebilinir.

1.6.6.10. Olfaktör Yetişkin Kök Hücreler

Olfaktör yetişkin kök hücreleri, koku alma hissine katılan burnun astarı olan insan koku alma mukoza hücrelerinden izole edilmiştir (Zare ve ark., 2014)

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Fare embriyonik fibroblast, MEF hücreleri, embriyonik büyümeyi destekleyen biyoaktif maddeler üretir ve bu maddelerin erken embriyo gelişimine yardımcı olduğuna inanılır (Jasmin ve ark., 2016) Erişim kolaylığı, yüksek büyüme oranları ve çok sayıda test gerçekleştirme yeteneği nedeniyle, fare embriyonik fibroblast (MEF) hücrelerinin kültürü, gen fonksiyonunu test etmek için yararlı bir yöntemdir (Qiu ve ark., 2016). Embriyolar zengin bir fibroblast kaynağıdır ve fare embriyonik fibroblastları (MEF'ler), fizyolojik etkilerini incelemek için rutin olarak üretilir. MEF'ler genellikle tripsinizasyon ve embriyonun baş, kuyruk, uzuvlar ve iç organlar çıkarıldıktan sonra hücre kültürü ortamına tohumlanmasıyla üretilir. Birkaç geçişten (pasaj) sonra ortaya çıkan kültürlerin genellikle oldukça homojen popülasyonlar olduğu görülür. MEF kültürleri, çeşitli hücre tiplerinden oluşan çok çeşitli bir popülasyondan oluşur (Singhal ve ark., 2016).

Fibroblastlar, düz kas hücrelerinin belirli fenotipik özelliklerini sergiler ve in vitro olarak kasılabilir. 1990'larda birçok bölgeden birkaç araştırmacı, karaciğer, böbrek ve akciğer de dahil olmak üzere bir dizi başka dokuda doku onarımı veya hasar yanıtı sırasında miyofibroblastların mevcut olduğunu keşfetti. Miyofibroblastik hücreler, normal iyileşme süreçleri sırasında skar dokusu oluşmaya başladığında kaybolur. Bu hücre ölümü apopitoz şeklinde olur (Ian A. Darby, 2007). Deri yaralarından granülasyon dokusu kasılması ilk olarak 1960'larda belgelenmiştir. Daha sonra, doku iyileşmesi sırasında, fibroblastların, hücre dışı matrisin kademeli dönüşümü ile meşgul oldukları nispeten sessiz durumlarından, miyofibroblastlar olarak bilinen proliferatif ve kontraktil bir fenotipe bir geçiş yaptıkları ortaya çıkmıştır(Ian A. Darby, 2007).

Kiss-1 geni ilk olarak insan malign melanoma hücre kültürlerinde “tümör metastaz baskılayıcı” bir gen olarak 1996 yılında izole edilip duyurulurken, kisspeptin peptidlerinden fazla aminoasit dizisine sahip olan kisspeptin-54, insan melanom ve meme kanseri hücre kültürlerinde hücre çoğalmasını inhibe etme

özelliklerinden ötürü metastin olarak adlandırılmıştır (Dennis K. Leea ve Andrew D. Howarde, 21 December 1998; Jeong-Hyung Lee, December 4, 1996).

1996 yılında, KISS1 geni keşfedildi ve Galanin reseptör 2 geni ile küçük bir dizi benzerliğine sahip olan Kisspeptin reseptör geni KISS1R 1999 yılında keşfedildi, ancak 2003 yılına kadar reseptör üreme fizyologlarının dikkatini çekmedi. KISS1 geni, kanserin yayılmasını önleme potansiyeli nedeniyle metastin olarak bilinen 54 amino asitlik bir proteine bölünebilen hidrofobik 145 amino asitli bir proteini kodlar. Hem 145 hem de 54 amino asit proteinleri, onları her yerde bulunmaya ve proteozom bozulmasına duyarlı hale getiren bir bölge içerir, bu da sınırlı bir yarı ömre sahip olduklarını gösterir. Kisspeptinler, KISS1 geni tarafından ifade edilen ortak bir öncü proteinin proteolitik yan ürünleridir (Gottsch ve ark., 2009).

Kisspeptin-KISS1R sinyali, 2003 yılında iki ayrı gruptan yapılan çalışmalarla üreme biyologlarının hemen dikkatine sunuldu. Nicolas De Roux ve meslektaşlarının yanı sıra Stephanie Seminara ve meslektaşları, aylar içinde normal cinsel gelişim gösteremeyen hastalarında hipotalamik hipogonadizmin genetik temelini belirlediler.

Ergenlik, uyarıcı sinyallerin artması ve GnRH nöronları üzerindeki engelleyici ipuçlarının azalmasıyla başlar, bu da hipotalamustan pulsatil GnRH salınımında sürekli bir artışa neden olur. Artan GnRH nabzı, aşağı akış bileşenlerini uyarır, bu da tümü doğurganlığa katkıda bulunan gonadotropinler ve cinsiyet hormonlarında, gametogenezde, ikincil cinsiyet özelliklerinde ve hızlı gelişmede bir artışa neden olur. Ergenlik başlangıcı, genetik ve çevresel değişkenlerin yanı sıra gen-çevre etkileşimleri tarafından yönetilir ve erkeklerle kadınlar arasında farklılık gösterir. Hipogonadotropik hipogonadizm hastalarında GPR54 genindeki mutasyonların kisspeptini inaktive ettiği kanıtlandığı gibi, kisspeptinler ve ilişkili reseptörleri düzgün bir şekilde etkileşime girmezse puberte gerçekleşmez.

Endojen KissPeptin ritmikliği ve duyarlılığı ergenlik boyunca yükselir; primatlarda ve kemirgenlerde juvenil pubertal geçiş sırasında hem KISS1 nöronlarının sayısında hem de Kiss1 mRNA miktarında bir artış vardır. Yeni araştırmaya göre, ergenlikten önce Polycomb grubu (PcG) genlerinin (KISS1 susturucuları) artan metilasyonu, PcG proteinlerini KISS1 promotöründen tahliye etti. Ayrıca, KISS1 geninin epigenetik kontrolü, bir GnRH/gonadotropin dalgalanmasının oluşumunda östrojen pozitif feedback ile ilişkilendirildi. (Zeydabadi Nejad ve ark., 2017).

Hipofizde KISS1 ve GPR54 eksprese eden hücrelerin varlığına ilişkin kanıtlar kesin değildir. Kisspeptinin, sıçan hipofiz hücrelerinde ve koyun, sığır ve domuz hipofizlerinden üretilen birincil hücre kültürlerinde in vitro LH üzerinde orta düzeyde uyarıcı etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Örneğin KISS1 ve GPR54'ün sıçan gonadotroplarında eksprese edildiği ve steroidler tarafından farklı şekilde kontrol edildiği gösterildi. KISS1 ekspresyonu dişilerde E2 tarafından arttırılırken, GPR54 ekspresyonu GnRH tarafından yükseltiliyor ve E2 maruziyeti ile aşağı regüle ediliyor. Kisspeptin sinyalinin moleküler bir çalışmasına göre, Kisspeptin farelerde LHβ ve FSHβ gen ekspresyonunu arttırır. Bu indüksiyon, protein kinaz C'ye bağımlıdır.

Kisspeptin ayrıca peripubertal erkek ve dişi sıçanların gonadotrop ve somatotroplarında LH ve GH üretimi üzerinde küçük uyarıcı etkilere sahiptir. Bu gonadotropların in vivo olarak doğrudan kisspeptinin hedefi olmadığı anlamına gelebilir. Verilere göre, kisspeptin ve GnRH birlikte uygulanması LH salgısını arttırır. Kisspeptin'in hipofiz ve gonadotropin salınımı üzerindeki doğrudan uyarıcı etkilerinin GnRH'ye göre daha düşük olduğu ve kisspeptin'in gonadotropin salınımı üzerindeki ana uyarıcı etkisinin hipotalamus aracılığıyla olduğunu göstermektedir.

Hamilelik sırasında, çoğunlukla plasentada üretilen insan plazmasındaki kisspeptin konsantrasyonunda önemli bir artış olmuştur. Histokimyasal incelemeye göre sinsityotrofoblastlarda Kiss1 mRNA bulundu; bu bulgular, Kisspeptin'in

trofoblast istilasının kontrolünde bir rol oynayabileceğini göstermektedir(Zeydabadi Nejad ve ark., 2017).

Hipotalamusta GnRH salınımı ile ilgili olduğu belirlenen bir diğer protein ise Nörokinindir. 1992'den beri çalışmalar NKB için bir GnRH sekresyonunu ele almıştı, ancak buna dair hiçbir kanıt bulunamadı. Daha yakın yıllarda, özellikle Rance laboratuvarından yapılan dikkatli nöroanatomik çalışmalar, infundibular veya arkuat çekirdekteki anahtar hipotalamik nöronlarda, seks steroidlerine oldukça duyarlı olan NKB ekspresyonunu göstermiştir. Ayrıca NK3R'lerin, NKB immünoreaktivite alanlarına yakın bir konumda oldukları medyan eminenste GnRH sinir uçlarında eksprese edildiği gösterilmiştir. Bununla birlikte, tek bir çalışma merkezi NKB'nin östrojende LH üretimini baskılayabileceğini öne sürmesine rağmen, kemirgenlerdeki çoğu farmakolojik çalışma NKB'nin veya analoglarının GnRH sekresyonu üzerinde olumlu bir etkisini göstermediği için, bu tür anatomik gözlemlerin fonksiyonel korelasyonu net değildir (Topaloglu ve Semple, 2011).

Hipogonadotropik hipogonadizmde TACR3 ve TAC3'teki mutasyonları 2008'de insanlarda NKB veya nörokinin 3 reseptörünün işlev kaybının derin nIHH'ye yol açtığını ve böylece HPG ekseninin normal olgunlaşmasında NKB eylemi için kritik gerekliliği kanıtladığını bulmanın bağlamıydı. Bu keşif, nIHH'den etkilenen ve diğerlerinin yanı sıra GNRH1, GNRHR, KISS1 ve KISS1R'deki mutasyonların hariç tutulduğu birden fazla üyesi olan akraba evliliklerinin incenmesiyle bulundu. İn vitro, amidlenmemiş mutant NKB, doğal NK3R'yi uyarmak için önemli bir yeteneğe sahip değilken, amidlenmiş mutant NKB, doğal NKB'den yaklaşık 10 kat daha düşük bir EC50'ye sahiptir. Bu indeks çalışmasından bu yana, diğer popülasyonlarda daha fazla araştırma, TACR3 veya TAC3'teki mutasyonların insanlarda nIHH'nin yaygın nedenlerinden biri olduğunu doğrulamıştır. Afrika'da bir genetik kurucu etkiye atfedilen, nIHH'li üç ilişkisiz hastada NKB ekspresyonunun tamamen kaybıyla sonuçlanan TAC3'te bir homozigot ek yeri mutasyonu ve TACR3'te bir homozigot ek yeri mutasyonu ile üç

kardeşte NK3R'nin kesilmesiyle sonuçlanmıştır nIHH. Aynı zamanda, bugüne kadarki en büyük çalışmada, Gianetti ve ark. 19 probandda TACR3'te ve bir multipleks ailede TAC3'te mutasyonlar bildirmiştir.

Bu çalışma, analiz edilen çoğu etnik grupta nIHH'de yaklaşık %5'lik bir TACR3 veya TAC3 mutasyon prevalansı önerdi; bu prevalans KISS1R mutasyonları için görülenden önemli ölçüde daha yüksekti. İnsan TAC3 ve TACR3 mutasyonlarının ilk raporlarında kesinlikle otozomal resesif bir kalıtım paterni ile tam penetran nIHH ile ilişkili oldukları gösterildi. Ancak Gianetti ve ark. tarafından yapılan çalışmada, TACR3'te heterozigot mutasyonları olan 7 nIHH örneği rapor edilmiştir. nIHH ile ilişkili tüm bu heterozigot TACR3 mutasyonları için fonksiyon kaybının deneysel kanıtı sağlanmasa da, birçoğu erken kesme mutasyonlarıydı, bu nedenle heterozigotluğun büyük olasılıkla %50 fonksiyon kaybına veya etkin haploins yetmezliğine karşılık geldiğini varsaymak mantıklıdır. Ayrıca, bu varyantların hiçbirinin, nIHH ile ilişkili olduğu bilinen diğer genlerdeki fonksiyon varyantlarının kaybıyla birlikte kalıtsal olmadığı bulundu.

Bu nedenle, TACR3'teki mutasyonların otozomal dominant negatif kalıtım modeliyle nIHH ile sonuçlanabilmesi resmi olarak mümkün olmaya devam etmektedir, ancak niHH içinde iyi kurulmuş oligogenisite paradigması göz önüne alındığında, nIHH'yi bu aşamada tek başına TACR3'teki heterozigot mutasyonlara güvenle atfetmek mümkün değildir (Topaloglu ve Semple, 2011).

Bu patofizyolojik benzerliklerin yanı sıra arkuatnükleusunda NKB ve kisspeptin ekspresyonunun aynı hücrelerde rastlanması bunların yakın ilişki içerinde olabileceklerini göstermektedir. Nitekim fareler üzerinde yapılan çalışmalarda NKB agonistinin kisspeptin ekspresyonunu arttırdığı ve dolayısıyla GnRH ve akabinde LH salınımını etkilediği gösterilmiştir(Lehman ve ark., 2010) (Cheng ve ark., 2010). Fakat TAC3 ve TACR3'ün fonksiyonu hakkındaki asıl gelişme Topaloğlu ve grubunun çalışmalarıyla ortaya çıkmıştır. Bu grup TAC3 ve TACR3 mutasyonu olan bir hastada hipogonadotropikhipogonadizm ve infertilite gözlendiği dolayısıyla bu proteinlerin pubertenin kontrol noktasında anahtar rol

oynadığını belirlemişlerdir (Topaloglu ve ark., 2009) (A. Kemal Topaloglu, february 16, 2012). İnsanlarda NKB etkisinin kaybının fizyolojik sonuçları:

NKB/NK3R eksikliğinin birkaç ilginç fenotipik özelliği genişleyen insan genetik çalışmaları ile ortaya çıkmıştır. İlk olarak, homozigot TAC3 mutasyonlarına sahip 2 kız kardeş, biri daha önceki seks hormonu tedavisinden sonra, spontane olarak gebe kaldı ve gebeliklerden biri başarılı bir şekilde sona erdi. Homozigot, fonksiyonel olarak boş TAC3 mutasyonuna rağmen başarılı hamilelik, plasenta ve diğer üreme dokularında yüksek seviyelerde eksprese edilmesine rağmen NKB'nin plasentasyon veya hamilelik için gerekli olmadığını gösterdi.

Aynı mutasyonlara sahip başka bir kız kardeş düzenli bir regl döngüsüne sahipken, son etkilenen kız kardeş, bir progesteron yüklemesinden sonra pozitif bir geri çekilme kanamasına sahipti, ancak spontane regl döngüsü yoktu. NKB fonksiyonunun kaybıyla ilişkili niHH'deki bu tür sızıntının diğer taşikininler tarafından bir dereceye kadar telafi edilmesiyle açıklanması mümkündür. P maddesi gibi, P maddesinin önemli Era-pozitif infundibular nöronlarda NKB ile birlikte ifade edildiği gözlemiyle desteklenen bir öneridir. İkinci önemli bir gözlem, mikrofallusun erkek hastalarda evrensel olarak bulunması ve kriptorşidizm çok yaygın olarak görülmemesine rağmen, intrauterin HPG aktivasyonu için NKB etkisinin gerekli olduğunu ortaya koymasıdır. Son olarak, Gianetti ve ark.'nın çalışmasındaki hastaların yüksek bir kısmında, HH'nin geri dönüşümlü olduğu ve hastaların yaklaşık %80'inde seks steroidi veya gonadotropin tedavisinin kesilmesinden sonra pulsatil GnRH salgısının devam ettiği bildirilmiştir.

Bu yüksek tersine çevrilebilirlik prevalansı, büyük, genetik olarak seçilmemiş bir kohortta gözlenen %10 oranından belirgin şekilde daha yüksektir. Kohortumuzda, her ikisi de TACR3'te aynı yeni homozigot yanlış anlamlı mutasyona sahip bağımsız multipleks ailelerden iki kadın da seks steroid tedavisinin kesilmesinden sonra doğurganlık kanıtı gösterdi. Bu özel mutasyonun Polyphen-2 analizinde daha önce yayınlanmış mutasyonlarımızdan daha az zarar

verici olduğu tahmin edildi. Bu nedenle insan genetiği, NKB/NK3R'nin utero ve ergenlikte insan HPG aktivasyonu için gerekli olduğuna dair ikna edici kanıtlar sağlamıştır, ancak cinsel olgunluğun güçlü bir şekilde indüklenmesinden sonra GnRH puls üretecinin sürekli aktivitesi için zaman zaman gerekli olmayabileceğini öne sürmektedir. NKB ve ergenlik zamanlamasında ortak genetik varyasyon:

TACR3 geninin yakınındaki ortak nükleotid varyantlarının, genel popülasyonda ergenliğin zamanlamasını küçük bir dereceye kadar etkileyebileceği yönünde bir öneri de olmuştur. Menarş yaşıyla ilgili genom çapında ilişkilendirme çalışmalarının yakın tarihli bir meta-analizinde, 87.000 kadında dahil olmak üzere ergenlik zamanlaması için güvenilir bir vekil, 30 lokus, bu tür hipoteze dayalı olmayan genetik çalışmalarda pozitif olarak kabul edilen genom çapında anlamlılık seviyelerine ulaşmıştır. Bununla birlikte, seks steroidi biyosentezi ve metabolizmasında (GNRHR, KISS1R, KISS1, TACR3 ve TAC3 dahil) yer alan 16 aday genin etrafındaki sinyaller için verilerin hipoteze dayalı sorgulamasında, yalnızca iki SNP, biri TACR3'ten 19 kb yukarı akış (rs17034046, P = 3.4) 10-7) ve ESR1'den bir 110 kb yukarı akış (en yüksek isabet rs9383922, P = 2,2 10-6), çoklu test için düzeltme yapıldıktan sonra menarş yaşı ile önemli ölçüde ilişkiliydi. Bu, genel popülasyonda pubertal zamanlamada önemli bir varyasyon kaynağı olarak TACR3'e yakın ortak varyasyonu dahil ederek TACR3'teki nadir genetik varyasyon çalışmalarına katkıda bulunur.Sonuç olarak insanda en iyi bilinen taşikininler substance P(SP),nörokinin A (NKA) ve nörokinin B'dir(NKB) ve bunların hepsi yaygın olarak merkezi sinir sisteminde sentezlenirler(Ali Kemal Topaloglu 1, 2010 Aug; Topaloglu ve Semple, 2011).

Çok yakın tarihli bir çalışma, NKB agonisti senktid'in, daha fizyolojik bir östrojen konsantrasyonu ile hazırlanmış yumurtalıkları alınmış hayvanlarda LH üretiminin güçlü bir şekilde uyarılmasını sağlayabildiğini ileri sürmüştür. Bu, aşağıda tartışılan koyun çalışmalarında olduğu gibi, NKB eyleminin hormonal bağlamının etkisi için kritik olduğunu göstermektedir (Topaloglu ve Semple, 2011).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Kitler

1) 13-14 günlük hamile fareler
2) Ca2+ ve Mg2+ içermeyen fosfat buffered salin (PBS), (Biyowest)
3) L-Glutamine, Ribonucleosides and Deoxyribonucleosides MEM Alpha Modification (Hyclone)
4) Fetal sığır serumu, Fetal bovine serum-FBS (Atlanta Biologicals, katalog numarası: S11550)
5) L-glutamin (Life Technologies, Gibco®, katalog numarası: 25030-149)
6) 1× penisilin-streptomisin solüsyonu (Life Technologies, Gibco®, katalog numarası: 15140-148)
7) %0,25 tripsin-EDTA (Life Technologies, Gibco®, katalog numarası: 25200)
8) %70 etanol (EMSURE),

Not: Steril bir kapta steril distile su kullanarak hazırlayın.

9) Dimetil Sülfoksit (DMSO) (Sigma-Aldrich, katalog numarası: D8418)
10) %10 fetal sığır serumu içeren MEF kültür ortamı

Teçhizat:

1) Plastikten yapılmış kesme tahtası veya kalın bir kurutma kağıdı pedi (Schleicher ve Schuell GB004 kağıdı gibi)
2) Maskeleme bandı/itme pimleri
3) Steril İnce makas (en az 3)
4) Steril İnce forseps (en az 3)
5) Steril 4 × 4 gazlı bez (tıbbi malzeme satıcılarından temin edilebilir)
6) Steril neşter bıçakları veya tek kenarlı tıraş bıçakları
7) Muayene eldivenleri

8) Petri kapları (100 mm) (BD Biosciences, Falcon®, katalog numarası: 351029 veya eşdeğeri)
9) Steril plastik serolojik pipetler, 5 ve 10 ml (LP Italian SPA)
10) Steril tek kullanımlık tüpler (50 ml) (BD Biosciences, Falcon®, katalog numarası: 352070 veya eşdeğeri)
11) T75 doku kültürü Flaskı (Corning, katalog numarası: 430641 veya eşdeğeri)
12) 37 °C %5 CO^2 doku kültürü inkübatörü
13) cDNA Sentez Kitleri (Applied Biosystems)
14) Ters mikroskop
15) Cryovials (Nunc® gibi, katalog numarası: 375418)
16) Alkol (MERCK)
17) DEPC'li su (BI Biyological Industries)
18) Kiss1, Gpr54, beta actin, Tac2 ve Tacr2 primerleri,
19) Trizol (Life technologies, Ambion)
20) İzoproponol
21) Cell strainer

3.2. Prosedür

1) Çiftleşme plag göründükten 13-14 gün sonra dişi farelerden embriyolar alınır. Bu noktada, dişi açıkça hamile olmalıdır.

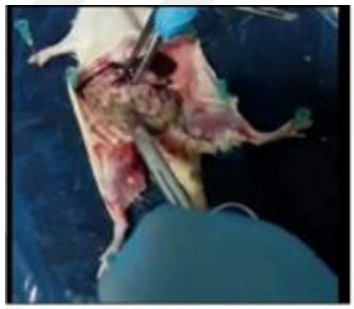
Not: Belirli bir türün yaşama kabiliyetine bağlı olarak, her hamile dişiden 6-10 embriyo beklenebilir ve birkaç deney için yeterli MEF vermeleri gerekir.

2) Hamile fareyi ötenazi yapmak için servikal çıkığı kullanın (bu tezgah üstü, doku kültürü kaputunun dışında yapılabilir). Bir diseksiyon tahtasına veya büyük bir kurutma kağıdına, fareyi sırt üstü yerleştirin (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Çiftleşme plag göründükten 13-14 gün sonra dişi farelerden embriyolar alınır. Bu noktada, dişi açıkça hamile olmalıdır

3) Farenin kürkünü en az bir saat boyunca %70 etanol içinde bekletin. Fareyi kullanarak tahtayı veya pedi doku kültürü kaputuna aktarın.
4) Deride bir kesi yapmak için makas kullanın, ardından cildi iki elinizle kavrayın ve karın duvarını ortaya çıkarmak için çekin. Farenin ayaklarını bant (veya pimler) (veya altlık) ile tahtaya sabitleyin (Şekil 3.2).



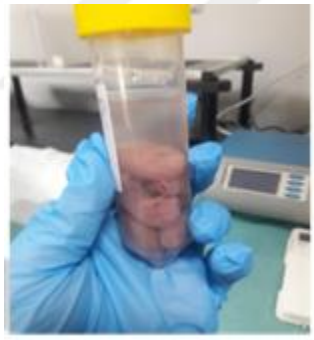
Şekil 3.2. Deride bir kesi yapmak için makas kullanın, ardından cildi iki elinizle kavrayın ve karın duvarını ortaya çıkarmak için çekin. Farenin ayaklarını bant (veya pimler) (veya altlık) ile tahtaya sabitleyin

5) Kapalı bir Petri kabını 10 mL yüzde 0,25 tripsin-EDTA ve diğerini yaklaşık 20 mL PBS ile doldurun.
6) Kürk kesme makasını çıkarın ve yeni bir eldiven seti ile değiştirin. Karın duvarını taze makasla kesin. Uterus boynuzlarını forseps ile kaldırın ve

uterusu makasla kesin. Uterusun kürkle temas etmemesine dikkat edin. Bir Petri kabını PBS ile yarıya kadar doldurun ve rahmi içine yerleştirin.

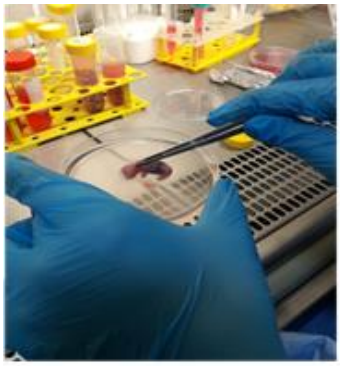
Not: Makas ve forseps kullanılmadıkları zaman ters çevrilmiş Petri kabı kapaklarına yerleştirilebilir ve %70 etanol ile ıslatılmış gazlı bezle silerek temizlenebilirler.

7) Embriyoları ayırmak için her embriyo arasındaki alanlarda uterusu kesin. Embriyolar kendi başlarına veya forseps ile hafifçe bastırıldıktan sonra dışarı çıkabilirler. Kolayca çıkmazlarsa, koyu kırmızı, disk şeklindeki plasentanın bulunduğu rahim dokusunu kesmeye başlayın. Embriyo hala yumurta sarısındaysa, dikkatlice çıkarmak için forseps kullanın.
8) Embriyoları yeni bir PBS plakasına aktarın; her üç embriyo için ayrı ayrı PBS bulunan falcon kullanılmalıdır. Embriyolardan kanı çıkarmak için falconu döndürün(Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Embriyoları yeni bir PBS plakasına aktarın; her üç embriyo için ayrı ayrı PBS bulunan falcon kullanılmalıdır. Embriyolardan kanı çıkarmak için falconu döndürün

9) Bir elinizle forseps ile bir embriyo alın ve diğer elinizle gözlerinin üzerinden başını kesin. İkinci bir forseps ile kırmızı dokuyu (kalp ve karaciğer) çıkarın. Petri kabını yüzde 0,25 tripsin-EDTA ve embriyonun geri kalanıyla doldurun (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Bir elinizle forseps ile bir embriyo alın ve diğer elinizle gözlerinin üzerinden başını kesin. İkinci bir forseps ile kırmızı dokuyu (kalp ve karaciğer) çıkarın. Petri kabını yüzde 0,25 tripsin-EDTA ve embriyonun geri kalanıyla doldurun

10) Embriyoların tamamı ayrıldıktan ve tripsin kaplı petri kabına yerleştirildikten sonra, onları makasla dilimleyin ve bir neşter bıçağı veya tıraş bıçağı kullanarak dokuyu 1-2 mm'lik parçalar halinde doğrayın. 10 ml'lik bir pipetle birkaç kez yukarı ve aşağı pipetleyin, ardından plakayı 37 °C'de 10 dakika doku kültürü inkübatörüne yerleştirin (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Embriyoların tamamı ayrıldıktan ve tripsin kaplı petri kabına yerleştirildikten sonra, onları makasla dilimleyin ve bir neşter bıçağı veya tıraş bıçağı kullanarak dokuyu 1-2 mm'lik parçalar halinde doğrayın. 10 ml'lik bir pipetle birkaç kez yukarı ve aşağı pipetleyin, ardından plakayı 37 °C'de 10 dakika doku kültürü inkübatörüne yerleştirin

11) Çanağı inkübatörden çıkarın ve embriyo parçalarını defalarca yukarı ve aşağı pipetlemek için 5 ml'lik bir pipet kullanın. Çanak 5-10 dakika daha inkübe edin.
12) 50 mL'lik bir tüpü yarıya kadar hücre süspansiyonu ile doldurun. Tripsini inaktive etmek için 20 ml MEF kültür ortamı ekleyin (tarif aşağıdadır) ve birkaç kez yukarı ve aşağı pipetleyin. Hücre süspansiyonunun tüpün dibine oturması için 5 dakika bekleyin ve daha büyük embriyo parçalarının dibe düşmesine izin verin.
13) Tekli ve kümelenmiş hücreler içeren süpernatantı T75 şişelerine aktarın. Her şişeye üç embriyoya eşit bir hacimde hücre süspansiyonu yerleştirilmelidir. Şişeleri MEF kültür ortamı ile toplam 15-20 ml olacak şekilde doldurun. Daha büyük parçaları şişelere aktarmayın.
14) Sabah, eski ortamı (ölü hücreler ve kalıntılar içeren) atın ve yeni ortamla değiştirin. Günün ilerleyen saatlerinde hücreleri kontrol edin; kültür kalınsa, üç T75 şişesine bölün. Değilse, hücreleri ertesi gün veya birleştikleri zaman bölün. Bu ilk pasaj (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Bu ilk pasaj

15) Hücreleri tripsinizasyonla toplayın, döndürün ve hücre topaklarını birleştiklerinde dondurucu ortamda yeniden süspanse edin (yüzde 10 fetal sığır serumu ve yüzde 10 DMSO içeren MEF kültür ortamı). MEF'ler, kriyoviyallere bölünür ve geleneksel memeli hücresi kriyoprezervasyon teknikleri kullanılarak dondurulur.

Not: Bazı protokoller, dondurma ortamında %20 fetal sığır serumu gerektirir, ancak %10 bizim için çalıştı.

16) MEF'ler düşük yoğunlukta kaplanırsa, daha hızlı yaşlanırlar. Birkaç geçişten sonra hücrelerin çoğalması yavaşlar, bu nedenle şişe başına nakledilen hücre miktarı her geçişte artırılmalıdır.

17) MEF'ler, hücre çoğalmasının önemli ölçüde azalacağı yaklaşık 10 geçişten sonra kriz aşamasına girecektir. Todaro ve Green'in prosedürlerini takiben, birkaç hafta içinde ölümsüzleştirilmiş çizgiler elde edilebilir. Bir tabak veya şişedeki tüm hücreler her 5 günde bir yeni ortamda alındığında ve yeniden kaplandığında, ölümsüzleştirilmiş MEF hatlarının yaklaşık 18 geçişten sonra üretilebileceğini keşfettik.

Tarifler:

1) %10 fetal sığır serumu içeren MEF kültür ortamı
2) 450 ml MEM'i 50 ml fetal sığır serumu ile karıştırın
3) 5 ml 200 mM L-glutamin
4) 5 ml 100× penisilin-streptomisin solüsyonu

3.3. RNA İZOLASYONU:

- Örnekler vortekslenir. Her 5 dakikada bir buz üzerinde inkübe edilecek şekilde 15 dakika buz üzerinde inkübe edilir.
- 14000 rpm'de 10' +4°C'de santrifüj edilir.

- Süpernatantı başka bir ependorfa alınır ve üzerine 200 µl kloroform eklenir.
- 10-20 saniye vortekslenir.(pembe renk alana kadar)
- +4°C'de 10' buz üzerinde inkübe edilir.
- 15' 14000 rpm'de santrifüjlenir.
- Santrifüj sonunda 3 faz oluşur. En üst fazda RNA, ortada protein, en alt fazda ise DNA toplanır. RNA pipet yardımıyla başka tüpe aktarılır.
- Tüpe RNA miktarı kadar izopropanol eklenir ve vortekslenir.
- +4°C'de 10' buz üzerinde inkübe edilir.
- 10' 14000 rpm'de santrifüjlenir.
- Dipteki pelleti gördükten sonra süpernatant atılır.
- 1 ml %75'lik etil alkol eklenir ve vortekslenir.
- 5' 14000 rpm'de santrifüjlenir.
- Süpernatant atılır. Kalan süpernatantı uzaklaştırmak için short-spin yapılır ve süpernatant atılır.
- buz üzerinde kapakları açık bir şekilde inkübe edilir. (kontaminasyon riskini azaltmak için üzeri kurutma kağıdı ile kapatılır.)
- Tüpe DEPC'li sudan 20 µl eklenir.
- Örnek buz üzerinde 15' ağzı açık bir şekilde inkübe edilir. (kontaminasyon riskini azaltmak için üzeri kurutma kağıdı ile kapatılır.)
- Örnek pipetaj yapılıp -20 °C'de saklanır.

3.4. cDNA ya Çevirme

1. 10XRT Buffer 2 µl
2. dNTP 0.8 µl
3. Randon Primer 2 µl
4. Enzim 1 µl
5. Deiyonize su 4,2 µl
6. RNA 10 µl

RNA hariç diğer malzemeler eklenip bir mix hazırlanıp vortexlenir en son tüplere RNA eklenir ve sort spin yapılır. Daha sonra örnekler termal cycler cihazına yüklenir.

3.5. Kültür Ortamı

1. % 10 cenin sığır serumu içeren MEF kültür ortamı
2. 50 ml fetal sığır serumu ile 450 ml MEM karıştırın
3. 5 ml 200 mM L-glutamin
4. 5 ml 100 × penisilin-streptomisin çözeltisi

Hücre Kültürü: Hücreler %10 fetalbovine serum (FBS) (Gibco, Grand Island NY, USA) ve %1 penisilin–streptomisin içeren MEM (Fenol red içermeyen) (Gibco) besiyerinde 37oC ve %5 CO2'li ortamda inkübe edilecektir. Kisspeptin, östradiol veya aromataz inhibitörü ile ayrı ayrı veya kombinasyonları ile muamele edilecek bu hücreler petri kabında %70'lik yayılma gösterdikten sonra 24 saat boyunca serumdan mahrum besiyerinde tutulacak akabinde muameleleri gerçekleştirilecektir.

3.6. RNA izolasyonu ve kantitatifreal-time RT-PCR

Total RNA TRIzol reaktifi ile üreticinin talimatlarına göre hücrelerden izole edilecek (Thermo). DNAaz kesimi DNAaz I kiti kullanılarak kolonda gerçekleştirilecektir (Qiagen, Valencia CA, USA). İzole edilen RNA'nın sağlamlığı %1 formaldehit jelde 5µg RNA yürütülerek doğrulanacaktır. cDNA, High capacitycDNAprimerleriile tedarikçinin önerisince kullanılarak sentezlenecektir (Thermo). İki mikrolitrecDNA kullanılarak Power SYBR green PCR kiti (AppliedBiosystems, Foster City CA, USA) ile Real-time PCR, ABI 7900 HT fastreal-time PCR sisteminde (AppliedBiosystems) gerçekleştirilecektir. Kullanılacak primerler Kiss1: forward 5'- ACTCACTGGTTTCTTGGC AGC T -3', reverse 5'- CAGAGGCCACCTTTTCTAATGG-3'; Gpr54: forward 5'-

CGACTTCATGTGCAAGTTCGTC -3', reverse 5'-CACACTCATGGCGGTCAGAG -3'; ve glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH): forward 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3', reverse 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3' ve nörokinin :Tac2forward 5'-TCTGGAAGGATTGCTGAAAGTG-3', reverse 5'-GTAGGGAAGGGAGCCAACAG-3' Tacr2 forward 5'-TGGTACTGGTGGTGGTGACATT-3', reverse 5'-CCTGTCTTCCTCGGTTGGTG-3'.Polimeraz zincir reaksiyonu SYBR green PCR karışımı kullanılarak 25 µl reaksiyon hacminde üç tekrar olacak şeklinde gerçekleştirilecektir. Reaksiyon 50oC'de 2 dk ve 95oC'de 10 dk, takiben 40 döngü 95oC'de 15 sn ve 60oC 1 dk olarak inkübe edildi. Çalışmalardaki eşik siklüs değeri (CT); reaksiyon ortamındaki floresan miktarının sabitlenmiş eşik değerini geçtiği siklüsün kesirli ifadesi olarak kullanılacaktır. Sonrasında CT değerleri mutlak kopya sayılarına dönüştürülecektir. GAPDH endojen kontrolü kullanılarak bütün cDNA örnekleri normalize edilecektir. "Kalıp içermeyen" ve "enzim içermeyen" kontroller kullanılarak genomik DNA varlığı ve reaksiyon özgüllüğü kontrol edilecektir. Tekrarlanabilirliği göstermek içinse üç bağımsız deney gerçekleştirilecektir. Real-time RT-PCR ürünlerinin özgüllüğü meltcurveanalizi, ve jel elektroforezi ile doğrulanacaktır.

ΔCt = Ct hedef gen-Ct referans gen

$\Delta\Delta$Ct= ΔCt muamele edilen- ΔCtkontrol

Ekspresyon oranı = 2- $\Delta\Delta$Ct

Real time sonuçları bu formül ile hesaplanarak grafikler elde edilmiştir.

3.7. Kullanılan Cihazlar

Laminar akımlı kabin, CO^2 inkübatör, ışık mikroskobu, invert mikroskop, otoklav, santrifüj, vorteks, sıcak su banyosu, buzdolabı-derin dondurucu (+4°C, -20°C, -80°C) Ç.Ü. Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi hücre kültür laboratuvarında ve Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı laboratuvarlarında kullanılmıştır.

3.8. Hücrelerin Pasajlanması

Hücreler % 70 yayılım gösterdiğinde, hücreleri flask yüzeyinden kaldırmak amacı ile tripsin kullanılmıştır. 75 cm^2'lik flaskta kültürlenen hücrelerden besiyeri uzaklaştırılmış ve bunu iki defa 7-8 ml PBS ile yıkama yapılarak 3-4 ml tripsin eklenmiştir. Tripsinin etkinliği sıcaklık ile arttığından,dolayı hücreler 3-5 dk, 37°C'de inkübe edilmştir. Hücreler flask yüzeyinden ayrıldıkları anda, tripsinin en az 2 katı kadar medium eklenmiştir, böylece seyreltme işlemi yapılmıştır ve tripsinin hücre membranlarına zarar vermesi engellenmiştir.

Hücreler yüzeyden ayrıldıktan hemen sonra ortamdan alınmıştır .15 ml'lik falkon tüpünde 3000 rpm'de 3 dk santrifüj edilip ve dibe çökmeleri sağlanmıştır. Pellet halindeki hücrelere 3 ml medium eklenerek homojenize olmaları için pipetaj yapılmıştır ve içerisinde medium bulunan 75cm2'lik flaska yeniden ekimleri yapılmıştır.

Flasklar % 5 CO^2'li inkübatörde, 37 ^{0}C'de ve % 95 nemli ortamda yeniden inkübasyona bırakılmıştır. Ekimden bir gün sonra flask yüzeyine yapışmayan hücrelerin ve tripsin kalıntılarının ortamdan uzaklaştırılması amacı ile yıkama yapılmi;tir ve yeni besiyeri eklenmiştir. Deney için uygun hücre yoğunluğuna ulaşana kadar bu işlem devam ettirilmiştir. Her 3 ya da 5 günde bir hücrelerin yoğunluğuna göre pasaj değiştirmiştir.

3.9. Hücrelerin Dondurulması

Dondurma işlemi hücrelerin stoklanma amacı ile yapılmaktadır. Dondurma mediumu % 10 DMSO ve % 90 FBS ile 1 ml olarak hazırlanmış ve tripsin ile toplanan hücreler cryo vial tüpler içerisinde koyulmuşdur ve sonra -80 ^{0}C'de stoklanmışdır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

Çizelge 4.1. P1 gen ekspresiyon sonuçları

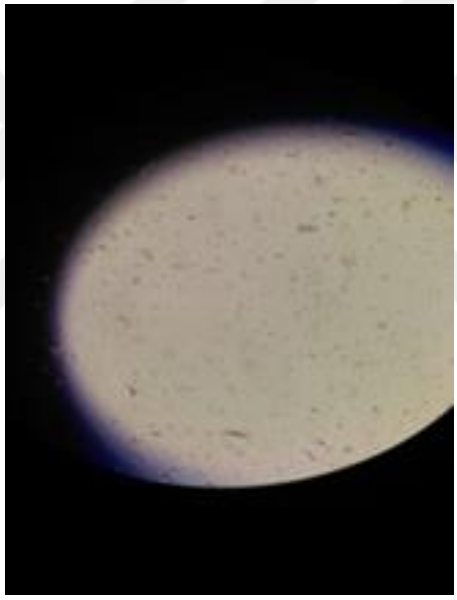
Sample Name	Target Name	Dyes	Ct	Ct Mean
P1	ACTB	FAM-None	19.221	19.221
P1	KISS1	FAM-None	Undetermi	
P1	KISS1R	FAM-None	32.390	32.39
P1	TAC2	FAM-None	Undetermi	
P1	TACR2	FAM-None	33.614	33.614



Şekil 4.1. Fare embriyonik fibroblastlarından elde edilen hücreler(pasaj 1)

Çizelge 4.2. P2 gen ekspresiyon sonuçları

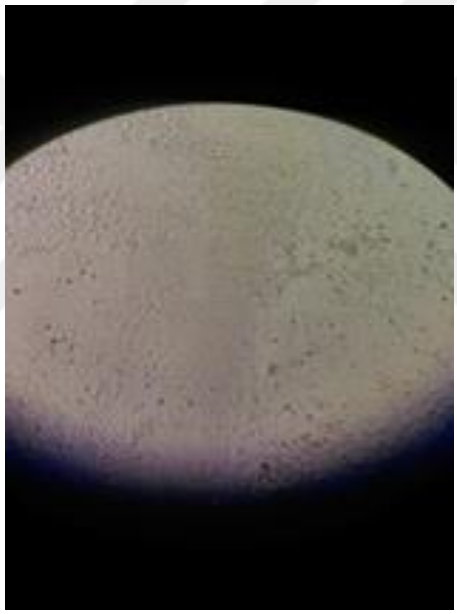
Sample Name	Target Name	Dyes	Ct	Ct Mean
P2	ACTB	FAM-None	17.719	17.719
P2	KISS1	FAM-None	Undetermi	
P2	KISS1R	FAM-None	31.222	31.222
P2	TAC2	FAM-None	Undetermi	
P2	TACR2	FAM-None	33.627	33.627



Şekil 4.2. Fare embriyonik fibroblastlarından elde edilen hücreler(pasaj 2)

Çizelge 4.3. P3 gen ekspresiyon sonuçları

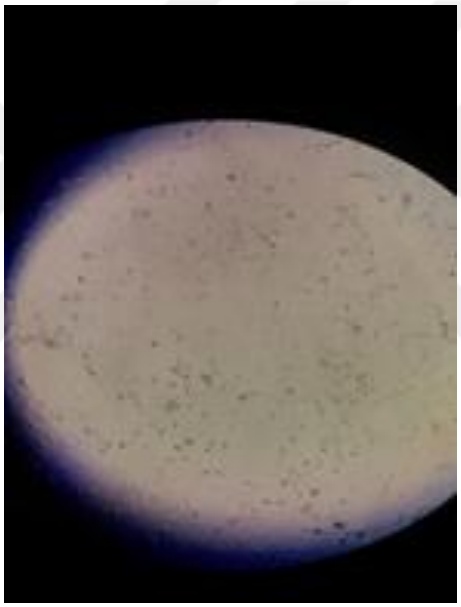
Sample Name	Target Name	Dyes	Ct	Ct Mean
P3	ACTB	FAM-None	18.758	18.758
P3	KISS1	FAM-None	Undetermi	
P3	KISS1R	FAM-None	30.296	30.296
P3	TAC2	FAM-None	36.966	36.966
P3	TACR2	FAM-None	33.234	33.234



Şekil 4.3. Fare embriyonik fibroblastlarından elde edilen hücreler (pasaj 3)

Çizelge 4.4. P4 gen ekspresiyon sonuçları

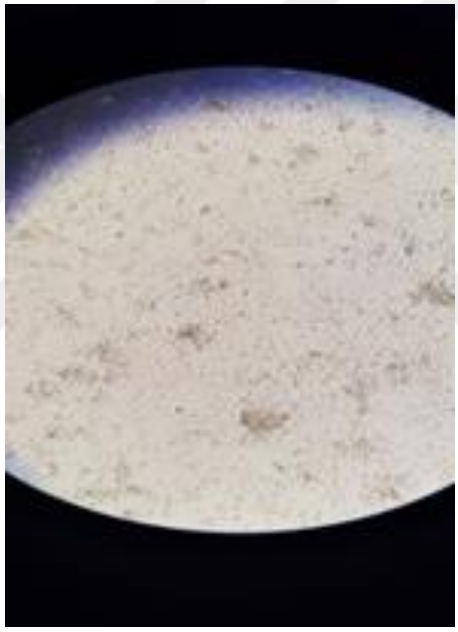
Sample Name	Target Name	Dyes	Ct	Ct Mean
P4	ACTB	FAM-None	20.876	20.876
P4	KISS1	FAM-None	Undetermi	
P4	KISS1R	FAM-None	32.947	32.947
P4	TAC2	FAM-None	39.342	39.342
P4	TACR2	FAM-None	37.024	37.024



Şekil 4.4. Fare embriyonik fibroblastlarından elde edilen hücreler (pasaj 4)

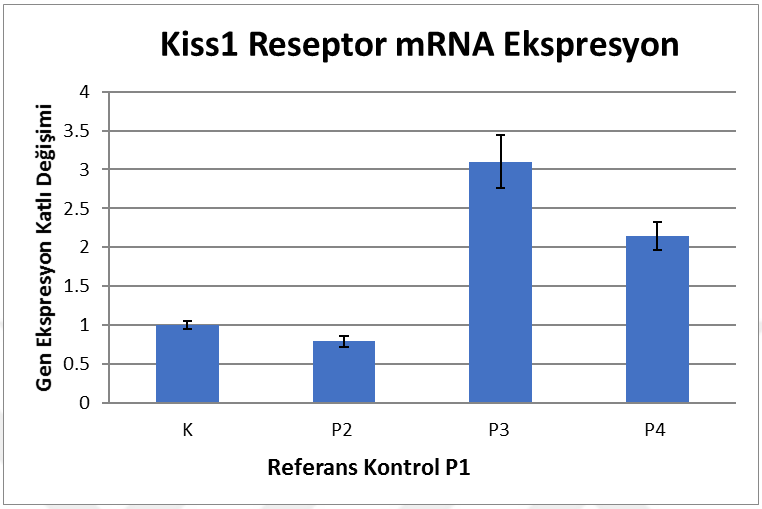
Çizelge 4.5. P5 gen ekspresiyon sonuçları

Sample Name	Target Name	Dyes	Ct	Ct Mean
P5	ACTB	FAM-None	35.943	35.943
P5	KISS1	FAM-None	Undetermi	
P5	KISS1R	FAM-None	Undetermi	
P5	TAC2	FAM-None	Undetermi	
P5	TACR2	FAM-None	Undetermi	

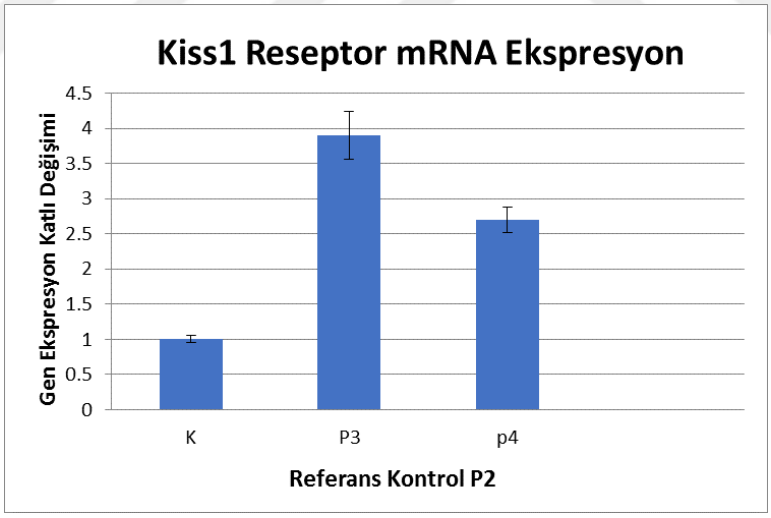


Şekil 4.5. Fare embriyonik fibroblastlarından elde edilen hücreler(pasaj 5)

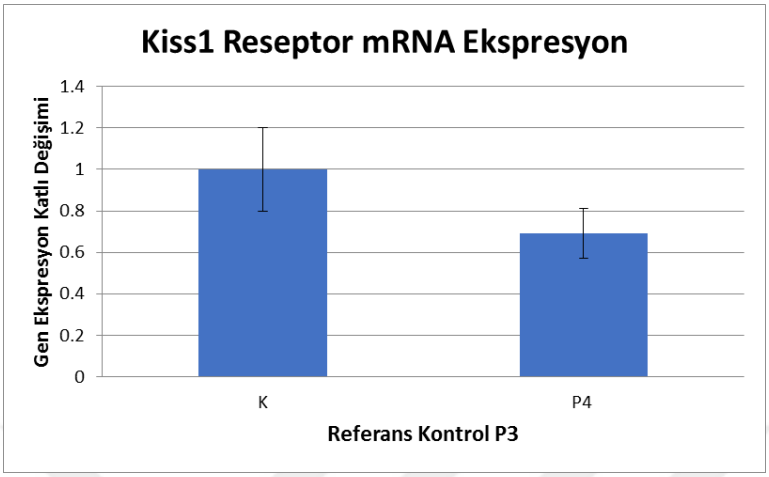
4.2. Grafikler



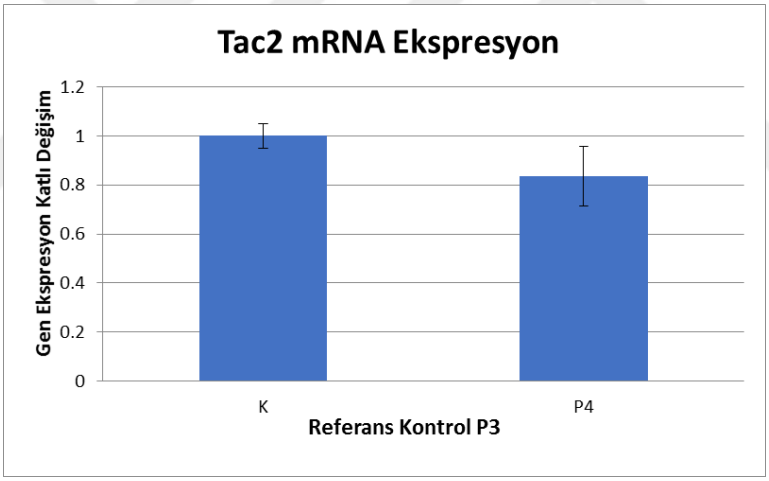
Grafik 4.1. P1 grubu referans alınarak ve kontrol grubunu 1 kabul edilerek P2, P3, P4'ten katlı değişimleri hesaplanmıştır.



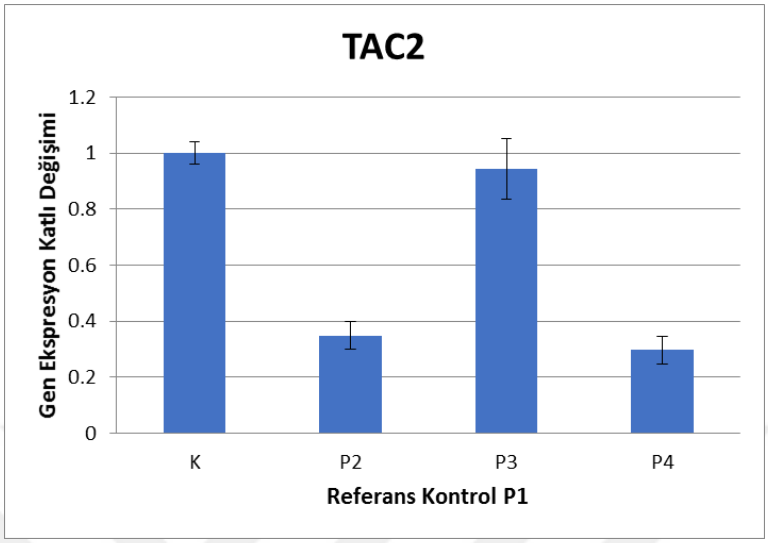
Grafik 4.2. P2 grubu referans alınarak ve kontrol grubunu 1 kabul edilerek P3, P4 grubu katlı değişimleri hesaplanmıştır.



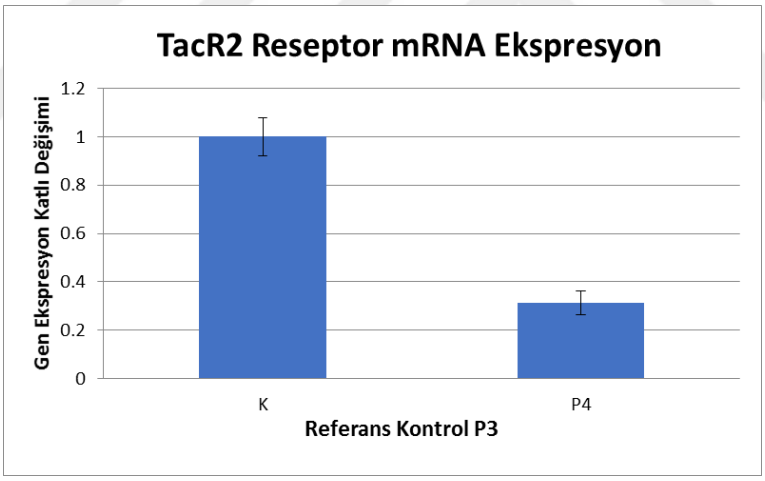
Grafik 4.3. P3 grubu referans alınarak ve kontrol grubunu 1 kabul edilerek P4 grubu katlı değişimleri hesaplanmıştır.



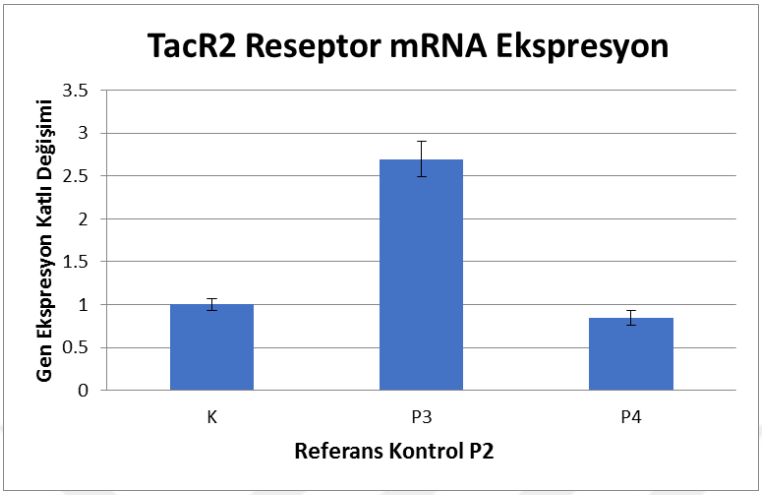
Grafik 4.4. P3 grubu referans alınarak ve kontrol grubunu 1 kabul edilerek P4 grubu katlı değişimleri hesaplanmıştır.



Grafik 4.5. P1 grubu referans alınarak ve kontrol grubunu 1 kabul edilerek P1, P3, P4 grubunu katlı değişimleri hesaplanmıştır.



Grafik 4.6. P3 grubu referans alınarak ve kontrol grubunu 1 kabul edilerek P4 grubunu katlı değişimleri hesaplanmıştır.



Grafik 4.7. P2 grubu referans alınarak ve kontrol grubunu 1 kabul edilerek P3, P4 grubunu katlı değişimleri hesaplanmıştır.

4.3. Tartışma

Ikeda ve arkadaşları bu makalede RT-PCR, kantitatif PCR ve immünohistokimya kullanarak gelişim sırasında ve yetişkinlik dönemindeki fare hipofizinde kisspeptinin ekspresyon profilini incelemişlerdir.

Sonuçlar bu şekildeki Kiss1 mRNA, hem embriyonik hem de doğum sonrası hipofizlerde tespit edildi. Kisspeptin-immünoreaktif (+) hücreler, embriyolarda ön hipofizde (AP) rostroventral kısımda ve ayrıca doğum sonrası dorsokaudal AP'de lokalize olan embriyonik günden (E) 13.5 yetişkinlik boyunca tespit edildi. Kisspeptin + hücrelerinin büyük bir kısmı Foxl2, SF-1 ve LHβ dahil olmak üzere gonadotrop belirteçleri ile çift etiketlendi ve Kisspeptin + hücrelerindeki LHβ + hücrelerinin yüzdesi geliştirme sırasında arttı. Çoğalan hücre belirteci MCM7 (minikromozom bakım proteini 7) için hiçbir kisspeptin + hücresi pozitif değildi, ancak birkaç kisspeptin + hücresi, kök/progenitör hücre belirteci Sox2'yi birlikte eksprese etti. Kisspeptin ekspresyonu, cinsiyetler arasında ve agonadal SF-1 nakavt embriyolar ile yabanil tip yavrular arasında benzerdi. Kiss1 mRNA seviyeleri cinsiyetler arasında veya doğum sonrası erken gelişim sırasında

önemli ölçüde farklı değildi, ancak ergenlik başladığında dişilerde seviyeler arttı ve ergenlik sonrası yaşlarda erkeklerden önemli ölçüde daha yüksekti.

Bu sonuçlar, kisspeptinin gonadotrop farklılaşması sırasında gonadotrop öncüllerinde eksprese edildiğini ve kisspeptin ekspresyonunun αGSU üretiminin başlamasından hemen sonra başladığını ve LH üretiminin başlamasından hemen sonra söndüğünü göstermektedir. Ayrıca, hipofiz kisspeptin ekspresyonu, gelişim sırasında gonaddan bağımsız bir şekilde düzenlenebilir, ancak yetişkinlikte gonadotrop işlevi ile ilişkili olabilir (Ikeda ve ark., 2017). Kisspeptin sinyalinin moleküler bir çalışmasına göre, Kisspeptin farelerde LHβ ve FSHβ gen ekspresyonunu arttırır. Bu indüksiyon, protein kinaz C'ye bağımlıdır (Zeydabadi Nejad ve ark., 2017).

Chan ve arkadaşları bu makalede GPR54 mutasyonu olan yaklaşık iki düzine hastanın üreme fenotipleri, Gpr54 için mutant dört fare çizgisi ve Kiss1 için mutant iki çizgi fenotipleri gibi rapor edilmiştir. Bu fenotipler, gonadotropin salgılatıcı hormonun (GnRH) salgılanmasının güçlü olduğu yaşam döngüsünün tüm evrelerinde kisspeptin/Gpr54 fonksiyonunun gerekli olduğunu göstermektedir. Ayrıca, şiddetli hipogonadizmden kısmi cinsel gelişime kadar değişen fenotipik değişkenlik vardır. Toplu olarak, bu bulgular, Kisspeptin ve Gpr54'ün, gelişimsel bilgiyi GnRH nöronuna iletmek için önemli bir kanal olarak hizmet ettiğini göstermektedir. Kisspeptin/Gpr54 sistemini bozan mutasyonlar, hem farelerde hem de erkeklerde bir dizi fenotip üretir. Bu fenotipik değişkenlik, mutasyonların şiddetindeki farklılıklara bağlı olabilir, ancak bu değişkenlik GPR54'te aynı mutasyonlara sahip hastalar arasında bile görülebilir. GPR54 veya KISS1'i içeren hiçbir örnek bugüne kadar tarif edilmemiş olsada, yakın zamanda birden fazla gendeki mutasyonların bir akraba içindeki üreme fenotiplerindeki değişkenliği açıkladığı bulunmuştur. Çevresel etkiler ve stokastik varyasyon ayrıca fenotipik değişkenliğe katkıda bulunabilir. Bu değişkenlik, GPR54 ve/veya KISS1'deki mutasyonların neden olduğu insan fenotiplerinin aralığının IHH'nin ötesine uzanabileceğini ve daha hafif üreme koşullarını içerebileceğini düşündürmektedir.

Dikkatli fenotipleme, GPR54 veya KISS1'de heterozigot mutasyonları olan hastalarda ince üreme fenotiplerini de ortaya çıkarabilir.

Farelerin ve erkeklerin mutant fenotipleri, Kisspeptin/Gpr54 sisteminin GnRH nöronunun aktif olduğu her zaman gerekli olduğunu gösterir: fetal gelişim, yenidoğan yaşamı, ergenlik ve yetişkinlik. Ayrıca, seks steroidi geri bildirimi ve enerji dengesinin etkileri gibi bir dizi fizyolojik girdinin, Kisspeptin ekspresyonu üzerindeki etkileri yoluyla en azından kısmen GnRH aktivitesini modüle ettiği gösterilmiştir. Kisspeptin/Gpr54 sistemi bu nedenle GnRH nöronu ile gelişimsel ve fizyolojik girdiler arasındaki birincil arayüz gibi görünmektedir. Gelecekteki çalışmalar, kuşkusuz, Kisspeptin nöronunun bu çeşitli sinyalleri nasıl bütünleştirdiğini ortaya çıkaracaktır (Chan ve ark., 2009).

Stephanie ve arkadaşları ergenliğin başlangıcını belirleyen genetik faktörleri belirlemek için insanlarda ve farelerde çalışmalar yaptılar.Cinsel gelişim, hızlandırılmış doğrusal büyüme ve adrenal olgunlaşmayı içeren karmaşık bir biyolojik süreç olan ergenlik, hipotalamus tarafından gonadotropin salgılatıcı hormon salgılanmaya başladığında başlatılır. İnsanlarda ve farelerde tamamlayıcı genetik yaklaşımlar kullandılar. Pubertal gelişimden yoksun (idiyopatik hipogonadotropik hipogonadizm) üyeleri akraba evliliği olan aile, G proteinine bağlı bir reseptörü kodlayan GPR54 aday genindeki mutasyonlar için incelenmişler. Yabani tip ve mutant GPR54 arasındaki fonksiyonel farklılıklar in vitro olarak incelenmiştir. Paralel olarak, Gpr54 eksikliği olan bir fare modeli yaratıldı ve fenotipi yapıldı. Eksojen gonadotropin salgılatıcı hormona tepki hem insanlarda hem de farelerde değerlendirildi.

İndeks soyağacındaki etkilenen hastalar, GPR54'te bir L148S mutasyonu için homozigottu ve idiyopatik hipogonadotropik hipogonadizm ile ilişkisiz bir probandın iki ayrı mutasyona, R331X ve X399R'ye sahip olduğu belirlendi. COS-7 hücrelerinin mutant yapılarla in vitro transfeksiyonu, önemli ölçüde azalmış bir inositol fosfat birikimi gösterdi. Bileşik heterozigot mutasyonları (R331X ve X399R) taşıyan hasta, GPR54 mutasyonları olmayan idiyopatik hipogonadotropik

hipogonadizmi olan altı hastayla karşılaştırıldığında, endojen gonadotropin salgılatıcı hormon salgısını azalttı ve gonadotropin salgılatıcı hormon için sola kaydırılmış bir doz-yanıt eğrisine sahipti. Gpr54 eksikliği olan farelerde izole hipogonadotropik hipogonadizm (erkek farelerde küçük testisler ve dişi farelerde vajinal açılmada gecikme ve foliküler olgunlaşmanın yokluğu) vardı, ancak hem eksojen gonadotropinlere hem de gonadotropin salgılatıcı hormona tepki gösterdiler ve normal seviyelere sahiptiler. Hipotalamusta gonadotropin salgılatıcı hormon ve G proteinine bağlı bir reseptör geni olan GPR54'teki mutasyonlar, insanlarda ve farelerde otozomal resesif idiyopatik hipogonadotropik hipogonadizme neden olur ve bu reseptörün normal gonadotropin salgılayan hormon fizyolojisi ve ergenlik için gerekli olduğunu düşündürür (Stephanie B. Seminara ve Wendy Kuohung, october 23, 2003).

İnsan kisspeptin reseptörünü (KISS1R, eski adıyla GPR54), nörokinin B'yi (TAC3) ve nörokinin B reseptörünü (TACR3) kodlayan genlerdeki inaktive edici mutasyonlar, pubertal yetmezliğe neden olur. Bununla birlikte, insan kisspeptin fonksiyon kaybı mutasyonları tanımlanmamıştır ve Kiss1 farelerde çelişkili bulgular bildirilmiştir. A. Kemal Topaloğlu ve arkadaşları, büyük bir akraba ailede KISS1'de pubertal ilerlemenin başarısız olmasına neden olan bir inaktive edici mutasyonu tanımlayarak, fonksiyonel kisspeptinin insanlarda ergenlik ve üreme için önemli olduğunu belirttiler. Sonuçlar bu şekilde, Bir GnRH stimülasyon testi, mililitrede sırasıyla 3.3 ve 7.4 mIU maksimum LH ve FSH konsantrasyonları ile körelmiş bir yanıt ortaya çıkardı.

Probandda uyku sırasında LH profili (Hasta II-8), tümü alt algılama sınırının (mililitrede 0.2 mIU) altında olan okumalar gösterdi. Diğer yandan sağlıklı kardeşteki (Hasta II-6) LH okumaları, iki LH tepe noktası olan normal bir yetişkin kadın profili gösterdi. Genom çapında SNP analizi, etkilenen tüm hastalarda ortak olan ancak etkilenmemiş herhangi bir aile üyesinde bulunmayan iki homozigotluk bölgesi tanımladı. Bölgelerden biri, kromozom 1 üzerindeki 5.5 Mb'lik bir segment (201.6 Mb'den 207.1 Mb'ye), normozmik idiyopatik

hipogonadotropik hipogonadizme neden olmaya aday olan KISS1 genini içerir. Etkilenen tüm deneklerde KISS1'in (Human Genome Organisation's Gen Nomenclature Committee [HGNC] sayı 6341) kodlama dizisinde homozigot eş anlamlı olmayan mutasyonlar buldular. Etkilenen tüm aile üyeleri, tamamlayıcı DNA nükleotidi 345'te (Ulusal Biyoteknoloji Bilişimi Merkezi [NCBI] referans dizisi NM_002256.3:c.345C→G) sitozinden guanine bir değişiklik için homozigottu ve bu, kalıntıda asparajinin lizin ile ikame edilmesine yol açtı. 115 (NCBI referans dizisi NP_002247.3:p.115N→K). Bu kalıntı, bu gen ile tüm türler arasında korunur.

Bu amino asit ikamesinin protein işlevini etkileyip etkilemediğine ilişkin Toleranttan Hoşgörüsüz Sıralama (SIFT) puanı 0.00'dır, bu da çok zararlı bir etkiye karşılık gelir (olası aralık, 0 ila 1, puanlar ≤0.05, protein işlevindeki hasarı tahmin eder). Bu mutasyon, etnik olarak eşleştirilmiş 100 sağlıklı yetişkin kontrolde bulunmadı.Etkilenen 1'den fazla üyesi olan diğer 12 ailede veya 90 sporadik normosmik idiyopatik hipogonadotropik hipogonadizm vakasında KISS1 mutasyonu bulunmadı (tüm ekzom dizileme verilerinin analizi).

Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalara dayanarak, otozigot haritalamada ve diğer aday genlerde tanımlanan otozigot bölgelere özellikle dikkat edildiğinde, probandın ve onun etkilenen kız kardeşlerinin fenotiplerini hesaba katan tek mutasyonun KISS1 mutasyonu olduğu ortaya çıktı. Fonksiyonel çalışmalar, insan KISS1R'nin, yabanil tip kisspeptin-10'a (EC50) kıyasla mutant kisspeptin-10 varyantına (yani başlangıç ve maksimum [EC50] değeri 3,7 μM arasında bir yanıta yol açan konsantrasyon) duyarlılığı önemli ölçüde azalttığını göstermiştir. 1.8 nM değeri) ($P<0.001$). Ek olarak, mutant kisspeptin-10 varyantı, test edilen konsantrasyonların herhangi birinde maksimum bir inositol fosfat tepkisini stimüle edemedi, bu da etkililiğin yanı sıra potensi de önemli ölçüde düşürdüğünü gösterir.Boş vektörle transfekte edilmiş COS-7 hücreleri, yabanil tip veya mutant kisspeptin-10'a hiçbir inositol fosfat tepkisi göstermedi (A. Kemal Topaloglu, february 16, 2012).

5. SONUÇLAR

P1 grubu Kiss1 Reseptörü mRNA ekspresyon referans alınarak ve kontrol grubu 1 kabul edilerek P2 grubu (1.26) baskılanmıştır ve P3 grubu (3.097) P4 grubu (2.141) katlanarak artmıştır. P2 grubu Kiss1 Reseptörü mRNA ekspresyon referans alınarak ve kontrol grubu 1 kabul edilerek P3 grubu (3.904), P4 grubu (2.698) katlanarak artmıştır. P3 grubu Kiss1 Reseptörü mRNA ekspresyon referans alınarak ve kontrol grubu 1 kabul edilerek P4 grubu (1.44) baskılanmıştır. P3 grubu TacR2 Reseptörü mRNA ekspresyon referans alınarak ve kontrol grubu 1 kabul edilerek P4 grubu (1.19) baskılanmıştır. P1 grubu TacR2 Reseptörü mRNA ekspresyon referans alınarak ve kontrol grubu 1 kabul edilerek P1 grubu (2.86), P3 grubu (1.05) ve P4 grubu (3.05) baskılanmıştır. P3 grubu TacR2 Reseptörü mRNA ekspresyon referans alınarak ve kontrol grubu 1 kabul edilerek P4 grubu(3.19) baskılanmıştır. P2 grubu TacR2 Reseptörü mRNA ekspresyon referans alınarak ve kontrol grubu 1 kabul edilerek P3 grubu (2.698) katlanarak artmıştır ve P4 grubu (1.18) baskılanmıştır.

MEF lerde Kisspeptin ve Nörokinin ekspresyon tespit edilemedi fakat her ikisine yönelik reseptörleri KISS1R ve TACR2 reseptör eksprese olduğunu ve bu ekspresyonda pasaj sayısına bağlı olarak azaldığını gördük.

KAYNAKLAR

A. Kemal Topaloglu M. D., Javier A. Tello, Ph.D., L. Damla Kotan, M.Sc., Mehmet N. Ozbek, M.D., M. Bertan Yilmaz, Ph.D., Seref Erdogan, M.D., Fatih Gurbuz, M.D., Fatih Temiz, M.D., Robert P. Millar, Ph.D., and Bilgin Yuksel, M.D. february 16, 2012. "Inactivating KISS1 Mutation and Hypogonadotropic Hypogonadism", Th e new engl and journal o f medicine, N Engl J Med 2012;366:629-35.

Ali Kemal Topaloglu 1 L. D. K. 2010 Aug. "Molecular causes of hypogonadotropic hypogonadism", doi: 10.1097/GCO.0b013e32833bb425.

Biehl J. K. ve Russell B. 2009. "Introduction to stem cell therapy", J Cardiovasc Nurs, 24(2), 98-103; quiz 104-105. 10.1097/JCN.0b013e318197a6a5.

Can A. 2008. "A concise review on the classification and nomenclature of stem cells", Turk J Hematol, 57 / 59. Turk J Hematol 2008; 25: 57-9.

Catherine M. Verfaillie M. F. P., and Peter M. Lansdorp. 2002. "Stem Cells: Hype and Reality", American Society of Hematology /Hematology 2002, 369 / 391.

Chan Y. M., Broder-Fingert S. ve Seminara S. B. 2009. "Reproductive functions of kisspeptin and Gpr54 across the life cycle of mice and men", Peptides, 30(1), 42-48. 10.1016/j.peptides.2008.06.015.

Cheng G., Coolen L. M., Padmanabhan V., Goodman R. L. ve Lehman M. N. 2010. "The kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cell population of the arcuate nucleus: sex differences and effects of prenatal testosterone in sheep", Endocrinology, 151(1), 301-311. 10.1210/en.2009-0541.

Daughtry B. ve Mitalipov S. 2014. "Concise review: parthenote stem cells for regenerative medicine: genetic, epigenetic, and developmental features", Stem Cells Transl Med, 3(3), 290-298. 10.5966/sctm.2013-0127.

Dennis K. Leea T. N., Gary P. O'Neilld, Regina Chengc, Yang Liua, ve Andrew D. Howarde N. C., Carina P. Tane, Anh-Thi Tang-Nguyena, Susan R. Georgea;b;c, Brian F. O'Dowda;c;*. 21 December 1998. "Discovery of a receptor related to the galanin receptors", 1999 Federation of European Biochemical Societies., FEBS Letters 446 (1999) 103^107.

Gottsch M. L., Clifton D. K. ve Steiner R. A. 2009. "From KISS1 to kisspeptins: An historical perspective and suggested nomenclature", Peptides, 30(1), 4-9. 10.1016/j.peptides.2008.06.016.

Ian A. Darby T. D. H. 2007. "Fibroblast Differentiation in Wound Healing and Fibrosis" 257): Elsevier.

Ikeda Y., Tagami A., Komada M. ve Takahashi M. 2017. "Expression of Kisspeptin in Gonadotrope Precursors in the Mouse Pituitary during Embryonic and Postnatal Development and in Adulthood", Neuroendocrinology, 105(4), 357-371. 10.1159/000453398.

İskender B., izgi K., Şanlıoğlu S. ve Canatan H. 2014. "Human embryonic stem cells and microenvironment", Journal of Clinical and Experimental Investigations, 5(3), 10.5799/ahinjs.01.2014.03.0446.

Jasmin, Peters V. M., Spray D. C. ve Mendez-Otero R. 2016. "Effect of mesenchymal stem cells and mouse embryonic fibroblasts on the development of preimplantation mouse embryos", In Vitro Cell Dev Biol Anim, 52(4), 497-506. 10.1007/s11626-015-9997-5.

Jayasena C. N., Dhillo W. S. ve Bloom S. R. 2009. "Kisspeptins and the control of gonadotropin secretion in humans", Peptides, 30(1), 76-82. 10.1016/j.peptides.2008.06.026.

Jeong-Hyung Lee M. E. M., Deana J. Hicks, Karen K. Phillips, JefferyM. Trent, BernardE. Weissman, Danny R. Welch. December 4, 1996. "KiSS-1, a Novel Human Malignant Melanoma Metastasis-Suppressor Gene", Journal of the National Cancer Institute, Vol. 88(1731 /1737. J Natl Cancer Inst 1996;88: 1731-7.

KANSU E. 2006. "Current Perspectives on Stem Cell Biology and Plasticity", ANKEM Derg, 1 / 8. ANKEM Derg 2006;20(Ek 2):1-8.

KARAŞAHİN T. 2012. "Embriyonik Kök Hücreler", J Fac Vet Med Univ Erciyes 9(1) 65-71, 2012, 65 / 71. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 9(1) 65-71, 2012.

Lehman M. N., Coolen L. M. ve Goodman R. L. 2010. "Minireview: kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: a central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion", Endocrinology, 151(8), 3479-3489. 10.1210/en.2010-0022.

Lian-Qun Qiu* W. S. L., Deborah J. Stumpo and Perry J. Blackshear. Jul 05, 2016. "Mouse Embryonic Fibroblast Cell Culture and Stimulation", www.bio-protocol.org/e1859, Vol 6(Iss 13),

Luciana Machado A. R. S. J. June 27, 2013. " Stem cells and cell therapy: From basic sciences to clinical perspectives", Journal of Biomedical Science and Engineering, Vol.6 No.6(doi:10.1111/j.1532-950X.2005.00063.x.

MARTIN G. R. December 1981. "Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells", Developmental Biology /Proc. Natl Acad. Sci. USA Vol. 78(Proc. Natl Acad. Sci. USA Vol. 78, No. 12, pp. 7634-7638, December 1981 Developmental Biology.

Matsui H., Takatsu Y., Kumano S., Matsumoto H. ve Ohtaki T. 2004. "Peripheral administration of metastin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat", Biochem Biophys Res Commun, 320(2), 383-388. 10.1016/j.bbrc.2004.05.185.

Özlem Nalbantoğlu1 G. A., Özge Köprülü1, Filiz Hazan2, Semra Gürsoy2, Behzat Özkan1. 27.02.2019. "Three Siblings with Idiopathic Hypogonadotropic Hypogonadism in a Nonconsanguineous Family: A Novel KISS1R/GPR54 Loss-ofFunction Mutation", J Clin Res Pediatr Endocrinol 2019;11(4):444-448, 11(5. DO I: 10.4274/jcrpe.galenos.2019.2018.0230.

Plant T. M. 2006. "The role of KiSS-1 in the regulation of puberty in higher primates", Eur J Endocrinol, 155 Suppl 1(S11-16. 10.1530/eje.1.02232.

Qiu L. Q., Lai W. S., Stumpo D. J. ve Blackshear P. J. 2016. "Mouse Embryonic Fibroblast Cell Culture and Stimulation", Bio Protoc, 6(13), 10.21769/BioProtoc.1859.

ŞİMŞEK Ö. 2012. "Adult Stem Cells: Past and Present", Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg., 232/236. Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg. 2012; 7(3): 231-236.

Singhal P. K., Sassi S., Lan L., Au P., Halvorsen S. C., Fukumura D., Jain R. K. ve Seed B. 2016. "Mouse embryonic fibroblasts exhibit extensive developmental and phenotypic diversity", Proc Natl Acad Sci U S A, 113(1), 122-127. 10.1073/pnas.1522401112.

Smith A. G. 2001. "EMBRYO-DERIVED STEM CELLS: OfMice and Men", Annu. Rev. Cell Dev. Biol, Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 2001. 17:435–62.

Stephanie B. Seminara M. D., Sophie Messager, Ph.D., Emmanouella E. Chatzidaki, B.Sc., Rosemary R. Thresher, Ph.D., James S. Acierno, Jr., B.S., Jenna K. Shagoury, B.S., Yousef Bo-Abbas, M.D., ve Wendy Kuohung M. D., Kristine M. Schwinof, M.A., Alan G. Hendrick, Ph.D., Dirk Zahn, Ph.D., John Dixon, B.A., Ursula B. Kaiser, M.D., Susan A. Slaugenhaupt, Ph.D., James F. Gusella, Ph.D., Stephen O'Rahilly, M.D., Mark B.L. Carlton, Ph.D., William F. Crowley, Jr., M.D., Samuel A.J.R. Aparicio, B.M., B.Ch., Ph.D., and William H. Colledge, Ph.D. october 23, 2003. "The GPR54 Gene as a Regulator of Puberty", The new england journal of medicine, N Engl J Med 2003;349:1614-27.

Swonger J. M., Liu J. S., Ivey M. J. ve Tallquist M. D. 2016. "Genetic tools for identifying and manipulating fibroblasts in the mouse", Differentiation, 92(3), 66-83. 10.1016/j.diff.2016.05.009.

Tachibana M., Amato P., Sparman M., Gutierrez N. M., Tippner-Hedges R., Ma H., Kang E., Fulati A., Lee H. S., Sritanaudomchai H., Masterson K., Larson J., Eaton D., Sadler-Fredd K., Battaglia D., Lee D., Wu D., Jensen J., Patton P., Gokhale S., Stouffer R. L., Wolf D. ve Mitalipov S. 2013. "Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer", Cell, 153(6), 1228-1238. 10.1016/j.cell.2013.05.006.

Topaloglu A. K., Reimann F., Guclu M., Yalin A. S., Kotan L. D., Porter K. M., Serin A., Mungan N. O., Cook J. R., Imamoglu S., Akalin N. S., Yuksel B., O'Rahilly S. ve Semple R. K. 2009. "TAC3 and TACR3 mutations in familial hypogonadotropic hypogonadism reveal a key role for Neurokinin B in the central control of reproduction", Nat Genet, 41(3), 354-358. 10.1038/ng.306.

Topaloglu A. K. ve Semple R. K. 2011. "Neurokinin B signalling in the human reproductive axis", Mol Cell Endocrinol, 346(1-2), 57-64. 10.1016/j.mce.2011.07.014.

V M Navarro 1 J. M. C., R Fernández-Fernández, S Tovar, J Roa, A Mayen, M L Barreiro, F F Casanueva, E Aguilar, C Dieguez, L Pinilla, M Tena-Sempere. 2005 Jan 6. "Effects of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54, on follicle-stimulating hormone secretion in the rat", Endocrinology, DOI: 10.1210/en.2004-1353PMID: 15637288.

Yang J., Wang W., Ooi J., Campos L. S., Lu L. ve Liu P. 2015. "Signalling Through Retinoic Acid Receptors is Required for Reprogramming of Both Mouse Embryonic Fibroblast Cells and Epiblast Stem Cells to Induced Pluripotent Stem Cells", Stem Cells, 33(5), 1390-1404. 10.1002/stem.1926.

Zakrzewski W., Dobrzynski M., Szymonowicz M. ve Rybak Z. 2019. "Stem cells: past, present, and future", Stem Cell Res Ther, 10(1), 68. 10.1186/s13287-019-1165-5.

Zare S., Kurd S., Rostamzadeh A. ve Nilforoushzadeh M. A. 2014. "Types of Stem Cells in Regenerative Medicine: A Review", Journal of Skin and Stem Cell, 1(3), 10.17795/jssc28471.

Zeydabadi Nejad S., Ramezani Tehrani F. ve Zadeh-Vakili A. 2017. "The Role of Kisspeptin in Female Reproduction", Int J Endocrinol Metab, 15(3), e44337. 10.5812/ijem.44337.

ÖZGEÇMİŞ

Shabnam MOHARAMJOODİ İlk, orta ve lise öğrenimini Shiraz'da tamamladı. 2010 yılında başladığı Kazerun İslami Azad Üniversitesi Hücresel ve Moleküler Biyoloji_Mikrobiyoloji bölümünden 2016 yılında mezun oldu. 2016-2017 yılları arasında Türkiye'de Zonguldak Bülent Ecevit Üniversıtesi bünyesinde bulunan Tömer'de (Türkçe ve yabancı dil araştırma merkezi) Türkçe dil öğrenimini tamamladı. 2018 yılında Türkiye'de başladığı Adana Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimine başladı.