

Erkek genital sisteminde kök hücre ve kök hücrenin kaynakları

Stem cell and stem cell sources in male genital system

Gülperi Öktem¹, Ahmet Barış Altay²

¹Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İzmir

²Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı, İzmir

Özet

İnsan kök hücre çalışmaları sadece bilim adamlarının değil toplumun da ilgisini çeken, insan gelişim sürecine ait mekanizmaları aydınlatan ve tıbbi uygulamalarda değişiklikler yapacak çalışmalar olarak düşünülmektedir. Günümüzde kök hücre genitoüriner sistemi de içeren pek çok organda, rejeneratif tıp uygulamalarında kullanılmaktadır. Ancak kök hücre tedavisinin pratikte kullanımı embriyonik kök hücre araştırmalarına getirilen etik kısıtlamalar nedeniyle sınırlı kalmaktadır. Bilim adamları bunun yerine progenitor hücreler ve erişkin kök hücrelerinden oluşan diğer kök hücre kaynaklarına yönelmektedirler. Bu kaynaklardan biri de erkek genital sistemine ait kök hücrelerdir. Germ hücreleri sahip olduğu genetik bilgiyi gelecek nesillere taşıyabilme yeteneğine sahip hücreler olarak tanımlanmaktadır. Memelilerde germ hücreleri erken embriyo döneminde ortaya çıkan primordial germ hücrelerinden köken alır. Erkeklerde bu hücreler mitozun G0/G1 fazında prospermatogonium olarak duraklarlar ancak proliferasyon yeteneklerini devam ettirirler. Doğum sonrası prospermatogoniumlar seminifer tübül bazal membranına göç eder ve spermatogonial kök hücreye diferansiye olurlar. Erişkin kök hücrelerinde olduğu gibi, spermatogonial kök hücreler de kendi kendini yenilerler ve faklılaşarak birden fazla terminal hücre tipine dönüşen “daughter” hücre oluşumunu sağlarlar. Spermatogonial kök hücre izolasyonu, *in vitro* kültürü ve pluripotent kök hücreden diferansiye edilmesi araştırmacılara hücrelerin biyolojik özelliklerini tanıma ve infertilite başta olmak üzere tedavide kullanımları ile ilgili çalışma olasılığı sağlayacaktır. Bu derlemede erkek genital sisteminde kök hücre kaynakları ve izolasyon yöntemleri gözden geçirilmiştir.

Anahtar sözcükler: Germ hücreleri; infertilite; kök hücreleri; spermatogonia.

Abstract

Human stem cell research which attracts not only scientists' but the public's attention is considered to be able to identify the mechanism of human development, and to change the medical practices. Stem cells have been used for regenerative medicine applications in many organ systems, including the genitourinary system. The potential applications for stem cell therapy have, however, been restricted by the ethical issues associated with embryonic stem cell research. Instead, scientists have explored other cell sources, including progenitor and stem cells derived from adult tissues. Another source of the stem cells are the male genitourinary system. Germ cells are defined by their innate potential to transmit genetic information to the next generation through fertilization. In mammalian species, gametes are issued from primordial germ cells during early embryo development. In males, these cells arrest in G0/G1 of mitosis as a prospermatogonia, but retain a proliferative precursor potential. Following birth, prospermatogonia migrate to the basement membrane of the seminiferous tubule and differentiate into spermatogonial stem cells. Like adult stem cells, spermatogonial stem cells can both self-renew and provide daughter cells, which differentiate into one or more terminal cell types. Isolation, *in vitro* cultivation of spermatogonial stem cells and differentiation into pluripotent stem cells will allow researchers to study their biological characteristics and their applications in therapeutic approaches such as infertility. In this review, stem cell sources of male genital system and the isolation of these cells were scrutinized.

Key words: Germ cells; infertility; spermatogonia; stem cells.

Giriş

Embriyogenezis tek bir fertilize olmuş oositin çok hücreli bir organizmaya dönüştüğü uzun ve karmaşık yollar zinciridir. Hücreler ve dokular bir seri değişime uğrayarak farklılaşmış karakterlerine ve akıbetlerine uyum sağlarlar; özelleşmiş fonksiyonlarını yerine getirirler. Embriyonun en muhteşem özelliği sahip olduğu değişebilme ve erişkin dokulara dönüşebilme yeteneğidir. Bu doğanın çok hücreli organizmaya verdiği en önemli armağan olan kök hücre ile mümkündür. Kök hücreler, memeli organizmasında kendini yenileme ve doku rejenerasyonu yapabilme yeteneği ile özelleşmiş hücrelerdir.

Memeli organizmasında üç tip kök hücre bulunmaktadır. Bunlar embriyonik kök hücre, erişkin (somatik) kök hücre ve embriyonik germ hücreleridir.

Embriyonik kök hücreler

Embriyonik kök hücreler 4-5 günlük erken embriyonik dönemdeki blastosiste ait iç hücre kitlesinden meydana gelir. Sınırsız bölünebilme ve erişkin organlarındaki tüm hücrelere dönüşebilme (*pluripotency*) yetenekleri vardır. Embriyonik dönem boyunca embriyonal kök hücreler sahip oldukları özellikleri kaybederler ve farklılaşma yeteneği kazanırlar.^[1] Kök hücre gelişiminde farklılaşmanın geri dönüşsüz olarak devam ettiği görüşü son yıllara kadar kabul edilen bir hipotezdi. Ancak yapılan yeni araştırmalar dişi ve erkek *Drosophila melanogaster*'de farklılaşmış germ hücrelerinin fonksiyonel kök hücreye dönüştüğünü göstermişlerdir. Geriye doğru differansiye olan bu hücrelerin yeniden germinal hücrelere farklılaşabilme yeteneğinde oldukları izlenmiştir.^[2] Projenitör hücrelerin kök hücreye differansiye olup olmadıkları araştırma konusudur. Ancak çalışmalar kök hücre kimliğini memelideki kesinleşmiş bir hücre havuzu ile sınırlandırmanın doğru olmadığını ve kök hücreye ait özelliklerin projenitör hücreler tarafından özellikle doku yaralanmalarından sonra kazanıldığını desteklemektedir.^[3]

Erişkin kök hücreler

Erişkin kök hücreler farklılaşma özellikleri çok sınırlı olan ve matür hücrelere farklılanabilen hücrelerdir. Uzun süre kopyalanabilen, temel olarak sessiz kalabilen, asimetric bölünme özelliğine sahip ve multipotent yapıdadırlar. Asimetric bölünme kök hücre özelliğinin devamlılığının sağlanmasında büyük önem arz eder. Kök hücre asimetric bölünerek "*daughter*" hücre denen ve kök hücre olarak kalıp, kendi özelliklerini sürdürecektir olan diğer bir

kök hücreyi üretir. Bölünme sonucu oluşan diğer "*daughter*" hücre, hızla proliferen olan projenitör hücreye dönüşür ve differansiye olma sürecine girer.^[4,5] Projenitör hücreler sınırlı sayıda hücre bölünmesi geçirirler ve sonrasında farklılaşarak apoptozise kadar giderler. Asimetric bölünme yeteneği ile ortaya çıkan bu birbirinden ayrı özellikleri barındıran hücreler normal dokuda üç farklı bölüm bulunduğunu ortaya koymaktadır.^[6,7] Sessiz kök hücreler için kendi kendini yenileme bölümü, sınırlı kendini yenileme potansiyeli olan ve proliferen olan projenitörler için proliferasyon bölümü ve differansiye olan veya apoptozise giden hücreler için terminal bölüm. Erişkin kök hücrelerinin aynı zamanda simetric bölünme geçirdiklerine de inanılmaktadır. Pek çok gen (Oct ^{3/4}, Nanog, Notch, Musashi, gibi) asimetric hücre bölünmesi ve kendini yenileme kapasitesi ile karakterize edilen kök hücre davranışından sorumlu tutulmaktadır. Ancak bu genlerin bütün kök hücrelerde kendiliğinden ekspresyonu zorunlu değildir. Normal kök hücreler sıklıkla multipotent farklılaşma potansiyeli olan projenitör hücreleri oluştururlar, bazı durumlarda aynı embriyonik germ tabakasına ait hücrelere (epitel, kas, sinir hücresi, gibi) transdiferansiye olurlar.^[8-11]

Embriyonik germ hücreleri

Embriyonik germ hücreleri karakteristik olarak embriyonal kök hücrelere benzerler. Gelişimin erken evrelerinde yolk kesesinin Allantois'e yakın duvarındaki endoderm hücreleri arasında ortaya çıkan Primordial Germ Hücreleri'nin (PGH) bu bölgedeki kolonizasyonu ile ilk olarak kendini gösterirler. PGH, kan hücreleri ile aynı yerden, proksimal epiblasttan köken alırlar. Epiblast distal bölgesinde ise nöroektoderm hücreleri kolonize olmaktadır.^[12] Yapılan araştırmaların gelişmekte olan embriyoda ortaya koyduğu çarpıcı bir bilgi de şudur: Epiblast proksimalindeki PGH'lerinin distal bölgeye transplantasyonu sonrası hücreler nöral doku şeklinde yapılanmakta, distaldeki nöroektodermal hücreler proksimal epiblastik alana transplante edildiğinde PGH şeklinde değişim göstermektedirler. Bu veriler, PGH'ne ait progenitör hücrelerin gelecekte hangi hücreye ait yapılanma göstereceklerinin sadece intrinsik aktiviteleriyle belirlenmesinin tamamen doğru bir bilgi olmadığını ve içinde bulunduğu mikroçevrenin yapılanmada daha önemli rol oynadığını göstermektedir.^[13-15]

Germ hücrelerinin embriyonik gelişimi

PGH'ler, köken aldıkları yerden dorsal mezoderme doğru göç ederler ve Embriyonik 10.5 ile 12.5 günler arasında genital kabarıklığa yerleşirler. Genital kaba-

rıklığa yerleştiklerinde somatik Sertoli hücrelerinin yakınına lokalize olurlar ve genositleri oluştururlar. Y kromozomunun varlığı farklılaşmamış gonadlardaki değişimin erkek genital sistemi yönünde gitmesine olanak sağlar. Erkek yönünde farklılaşan genosit hücreleri birkaç gün prolifer olduktan sonra G_0/G_1 fazında doğuma kadar duraklama dönemine girer. Doğumdan hemen sonra yeniden prolifer olmayı sürdürür ve bu dönemde spermatogenezis başlar. Postpartum 6. Günden itibaren bu hücreler seminifer tübüllerin bazal membranına göç ederler ve farklılaşmamış Tip A spermatogoniumları, başka bir deyişle Spermatogonial Kök Hücreleri (SKH) oluştururlar. SKH, spermatogenezisin devamlılığından sorumludurlar. Sürekli devam eden spermatogonium Tip A üretimi ve bu hücrelerin spermatozoa hücrelerine farklılaşmaları ile sonraki kuşaklara gen aktarımı için gerekli tüm değişimleri sağlamış olur.^[16,17] Daha sonra bölünmelerle tip B spermatogonia gelişimi gözlenir ki, bunlar da spermatositlerin prekürsörüdür. Spermatositlerin differensiasyonu ile da spermatozoa oluşur. SKH prolifer olurken kök hücreye ait bölünme özellikleri kurallarına uyar. Asimetrik bölünerek bir tane kendine benzer kök hücre ve bir tane de farklılaşma sürecine girerek spermatozoa oluşturacak spermatogonium meydana getirir.^[18-20]

Erkek genital sisteminde kök hücrenin kaynakları

PGH'nin yolk kesesinden programlı bir şekilde uygun yere göç etmesi dikkate değer bir konudur. Yapılan çalışmalar genital kabarıklığa ulaşamayan germ hücrelerinin pro-apoptotik protein Bax yardımıyla hızla apoptozise uğradıklarını göstermiştir.^[21] Diğer bir deyişle, apoptozis spermatogenezisi kontrol etmekte anahtar rol oynamaktadır. Bax eksikliği bulunan transgenik hayvanlarla yapılan çalışmalarda ektopik ekstragonadal germ hücrelerinin büyük bir bölümünün canlı kaldığı belirlenmiştir.^[21] Apoptotik olarak bloke olan ektopik germ hücreleri her iki cinsde, çeşitli vücut bölgelerinde çeşitli tiplerde genositlere farklılanırlar. Ancak ektopik germ hücrelerinin sıklıkla kuyruk bölgesine yerleşmiş olması sakrokoksigal germ hücreli tümörlerin etiyolojisini açıklamada yardımcı olabileceğini düşündürmektedir.^[22] Bu sebeple germ hücrelerinin izolasyonunda embriyonik dönemde veya erişkindeki kaynaklar sınırlıdır. Germ hücrelerini izole etmekte kullanılan kaynaklar üç ayrı gruba ayrılabilir. Bunlar; embriyonik germ hücreleri (EGH), multipotent germ hücresi kök hücreleri (GKH) ve embriyonal karsinoma hücreleridir (EKH). EGH geç embriyonik, erken fetal dönemde

ortaya çıkan primordial germ hücrelerinden, GKH spermatogonial kök hücrelerin *in vitro* kültürü ile elde edilirken, EKH erişkin testis tümörlerinden elde edilir. Erkek germ hücre farklılaşmasının çeşitli basamaklarında, pek çok molekül SKH tanımlanması için kullanılabilir. Spermatogonium ve SKH için sıklıkla Rmb, c-kit, Tex18, Stra8, Piwil2, Dazl, Hsp90α, β1-α6 integrin kullanılırken, PGH için fragilis, stella, Rnf17, Mouse Vasa Homolog (MVH) ve Oct4 belirteçleri kullanılabilir.^[23]

Embriyonal gonadlarda tirozin kinaz reseptörü c-kit (*W* gen bölgesi ürünüdür) ve onun ligandı "*Stem Cell Factor* (SCF)" (*Sl* gen bölgesi ürünüdür, Steel faktör, mast hücresi büyüme faktörü ve kit ligand olarak da isimlendiriler) PGH'lerinin yaşamlarını devam ettirebilmeleri ve çoğalmaları için gerekli olan, izolasyon amacıyla en sık kullanılan genlerdir. *W* ve *Sl* mutant farelerde PGH sayısının dramatik olarak azaldığı belirlenmiştir. Farelerde sterilityle beraber anemi ve pigmentasyon defektlerinin olduğu da izlenmiştir. C-kit geni ve post-mayotik spesifik alternatif olan c-kit gene ürünü (tr-kit) spermatogenezisin postnatal döneminde önemli roller üstlenmektedirler. Erişkin testisinde SCF sertoli hücrelerinden Folikül Stimulan Hormon (FSH) yardımı ile eksprese olmaktadır. C-kit ise farklı spermatogoniumlardan eksprese olurken, spermatogonial kök hücreden salınımı olmamaktadır. Primitif tip A spermatogonia ve tipA0 spermatogonia c-Kit'den bağımsız, spermatogonia tipA1-4 ise c-kit'e bağımlı olarak gelişmektedir. SKH, insanda 12. kromozonda, C-kit gen de 4. kromozonda lokalizedir. SKH için Major Histocompatibility Complex class I⁺, Thy-1⁺, α6-integrin⁺, α v-integrin^{-dim} yüzey belirteci postnatal hayatta akım sitometri cihazı kullanılarak en fazla izole edilebilen hücrelerdir. Thy-1, glikozil-fosfatidil inozitol bağlı yüzey antijenidir. Hematopoetik kök hücre, mezenşimal kök hücre ve embriyonik kök hücreden de eksprese edilir. SKH-C-kit sisteminin aktivasyonu ile PGH migrasyonu, yine PGH için anti-apoptotik faktör özelliği ve PGH proliferasyonu sağlanmaktadır. C-kit sisteminin de kapasitasyon ve akrozom reaksiyonunda rol oynadığı bilinmektedir.^[24,25]

İnfertilite tedavisinde germ hücreleri

Germ hücrelerinin izole edilmesi ve laboratuvar şartlarında çoğaltılabilmesi pek çok hastalığın tanısında ve tedavisinde etkili olabilir. Bu hastalıklardan biri olan infertilite tedavisinde *in vitro* proliferasyon yöntemi ile çeşitli yerlerden kök hücre kaynaklarına ulaşılması, bunların germ hücreleri

ne diferansiye edilmesi veya PGH ya da SKH'nin direk izole edilmesi yolu ile tedavi yollarına ulaşılması mümkündür. İnfertilite nedeniyle başvuran erkeklerin yaklaşık %5-20'sinde ejakülat örneğinde canlı sperme rastlanmamaktadır.^[26] Azospermi olarak tanımlanan bu tablo, obstrüktif ve daha sık olarak non-obstrüktif nedenlere bağlı olarak karşımıza çıkmaktadır. Yardımcı üreme tekniklerinin gelişmesi ile birlikte bu hastalarda testiste az sayıda bile olsa canlı spermin elde edilebilmesi ve intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu ile değerlendirilmesi sonrası çocuk sahibi olma şansı ortaya çıkmıştır. Günümüz teknolojisine rağmen, non-obstrüktif tipte azospermik erkeklerde testisten canlı sperm elde etme şansı %50-60'ı aşmamaktadır. Yapılan histopatolojik değerlendirmelerde sadece erken evrede spermatogenezise ait germ hücrelerinin saptandığı (matürasyon duraklaması) veya sadece Sertoli destek hücrelerin olduğu (Sertoli-cell only) hastalarda spermatogenezisi indüklemek ve spermatozoa elde etmek adına yapılan çalışmalar henüz klinik alanda başarıya ulaşmamıştır.^[27] Bu konuda deneysel olarak kök hücreler aracılığıyla yapılan çalışmalarda ise embriyonik kök hücreler yardımıyla fonksiyonel germ hücrelerin elde edilebildiği ve spermatogenezisin sağlandığı bildirilmektedir.

Sonuç

Spermatogenezisin sağlıklı gelişebilmesi için hipotalamus-hipofiz-testis aksı ile birlikte germ hücreler ve somatik hücrelerin (Sertoli ve Leydig hücreler) birbiri arasındaki iletişimi (sinyalizasyonu) gereklidir. Özellikle erken evrede spermatogonial kök hücrelerin gelişimi ve yenilenmesi sonrası spermatogonialardan, spermatositler ve daha sonra haploid yapıda spermatidlerle spermatozoalar gelişmektedir. Gonadotoksinler, radyoterapi, kemoterapi sonrası testiste canlı sperm üretimin olmadığı tablolarda spermatogonial kök hücrelerin pluripotent özelliklerine bağlı germ hücrelerin yeniden gelişimi görülebilmektedir.^[28] Bu ana fikirden yola çıkarak yapılan çalışmalarda, farklı kaynaklardan elde edilen kök hücrelerin, testiste spermatogenezisin yeniden restorasyonunda etkili olabileceği savunulmaktadır. Ancak bu kök hücrelerin elde edilmesi ve farklı dokularda enjeksiyonu sonrası hücrelerin yaşatılması kolay olmamaktadır. Günümüzde çok sayıda araştırmaya konu olan bu alanda erkek infertilitesi açısından hala çözülememiş problemlerin kök hücreler sayesinde aşılabileceğine yönelik deneysel temelde yapılan çalışmalar yol göstericidir.

Kaynaklar

1. Fritsch MK, Singer DB. Embryonic stem cell biology. *Adv Pediatr* 2008;55:43-77.
2. Barroca V, Lassalle B, Coureuil M, Louis JP, Le Page F, Testart J et al. Mouse differentiating spermatogonia can generate germinal stem cells in vivo. *Nat Cell Biol* 2009;11:190-6.
3. Heng BC, Cao T, Basted SM, Tong GQ, Ng SC. "Waste" follicular aspirate from fertility treatment--a potential source of human germline stem cells? *Stem Cells Dev* 2005;14:11-4.
4. Alison MR, Islam S. Attributes of adult stem cells. *J Pathol* 2009;217:144-60.
5. Morrison SJ, Kimble J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* 2006;441:1068-74.
6. Wang JH, Thampatty BP. Mechanobiology of adult and stem cells. *Int Rev Cell Mol Biol* 2008;271:301-46.
7. Slack JM. Origin of stem cells in organogenesis. *Science* 2008;322:1498-501.
8. Tsiftoglou AS, Bonovolias ID, Tsiftoglou SA. Multilevel targeting of hematopoietic stem cell self-renewal, differentiation and apoptosis for leukemia therapy. *Pharmacol Ther* 2009;122:264-80.
9. Beltrami AP, Cesselli D, Bergamin N, Marcon P, Rigo S, Puppato E et al. Multipotent cells can be generated in vitro from several adult human organs (heart, liver, and bone marrow). *Blood* 2007;110:3438-46.
10. Mantel CR, Wang RH, Deng C, Broxmeyer HE. Sirt1, notch and stem cell "age asymmetry". *Cell Cycle* 2008;7:2821-5.
11. Gönczy P. Mechanisms of asymmetric cell division: flies and worms pave the way. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:355-66.
12. Ginsburg M, Snow MH, McLaren A. Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development* 1990;110:521-8.
13. Lawson KA, Hage WJ. Clonal analysis of the origin of primordial germ cells in the mouse. *Ciba Found Symp* 1994;182:68-91.
14. Quinlan GA, Williams EA, Tan SS, Tam PP. Neuroectodermal fate of epiblast cells in the distal region of the mouse egg cylinder: implication for body plan organization during early embryogenesis. *Development* 1995;121:87-98.
15. Tam PP, Zhou SX. The allocation of epiblast cells to ectodermal and germ-line lineages is influenced by the position of the cells in the gastrulating mouse embryo. *Dev Biol* 1996;178:124-132.
16. Moore H, Udayashankar R, Aflatoonian B. Stem cells for reproductive medicine. *Mol Cell Endocrinol* 2008;288:104-10.
17. Moore H, Aflatoonian B. From stem cells to spermatozoa and back. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2007;65:19-32.

18. Aflatoonian B, Moore H. Germ cells from mouse and human embryonic stem cells. *Reproduction* 2006;132:699-707.
19. Burleigh AR. Of germ cells, trophoblasts, and cancer stem cells. *Integr Cancer Ther* 2008;7:276-81.
20. Aflatoonian B, Moore H. Human primordial germ cells and embryonic germ cells, and their use in cell therapy. *Curr Opin Biotechnol* 2005;16:530-5.
21. Runyan C, Gu Y, Shoemaker A, Looijenga L, Wylie C. The distribution and behavior of extragonadal primordial germ cells in Bax mutant mice suggest a novel origin for sacrococcygeal germ cell tumors. *Int J Dev Biol* 2008;52:333-44.
22. Rucker EB, Dierisseau P, Wagner KU, Garrett L, Wynshaw-Boris A, Flaws JA et al. Bcl-x and Bax regulate mouse primordial germ cell survival and apoptosis during embryogenesis. *Mol Endocrinol* 2000;14:1038-52.
23. Tanaka SS, Toyooka Y, Akasu R, Katoh-Fukui Y, Nakahara Y, Suzuki R et al. The mouse homolog of *Drosophila Vasa* is required for the development of male germ cells. *Genes Dev* 2000;14:841-53.
24. Mauduit C, Hamamah S, Benahmed M. Stem cell factor/c-kit system in spermatogenesis. *Hum Reprod Update* 1999;5:535-45.
25. Prabhu SM, Meistrich ML, McLaughlin EA, Roman SD, Warne S, Mendis S et al. Expression of c-Kit receptor mRNA and protein in the developing, adult and irradiated rodent testis. *Reproduction* 2006;131:489-99.
26. Conrad S, Renninger M, Hennenlotter J, Wiesner T, Just L, Bonin M et al. Generation of pluripotent stem cells from adult human testis. *Nature* 2008;20;45644-9.
27. Nayernia K, Lee JH, Lako M, Armstrong L, Herbert M, Li M et al. In Vitro Derivation of Human Sperm from Embryonic Stem Cells. *Stem Cells Dev* 2009 Jul 7. [Epub ahead of print].
28. Tournaye H, Goossens E, Verheyen G, Frederickx V, De Block G, Devroey P, et al. Preserving the reproductive potential of men and boys with cancer: current concepts and future prospects. *Hum Reprod Update* 2004;10:525-32.

Yazışma (Correspondence): Doç. Dr. Gülperi Öktem.
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim
Dalı, 35100 Bornova, İzmir, Türkiye
Tel: +90232-390 40 91 e-posta: gulperi.oktem@ege.edu.tr