

Doğurganlığın Protein Anahtarı



Kısırlığın kuşkusuz birçok nedeni var. Anatomik, biyolojik, ya da genetik. Kiminin tedavisi var, kiminin yok. Araştırmacıları daha çok uğraştıranlar, biyolojik nedenler. Şimdiye değin yürütülen araştırmalarda daha çok, yumurta ya da sperm hücrelerinin özellikleri, ya da bunlardaki bozukluklar üzerinde durulmaktaydı. Ancak kısa süre önce bilim adamları, doğrudan üreme mekanizmasıyla ilgili olmayan önemli bir nedeni de rastlantı sonucu ortaya çıkardılar: Normal işlevi kanserin atlamasını önlemek olan bir tür proteinin eksikliği, yumurta ile sperm birleşmesini de önüyor.

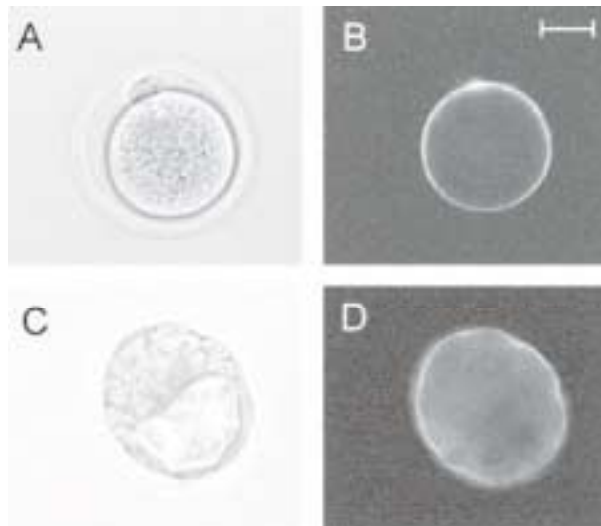
CD9, vücudun çeşitli zarları üstünde bulunan bir protein. Tetraspanin grubu hücre zarı proteinlerinden biri. İşlevi, hücrelerde yapışma, çoğalma, farklılaşma, sinyal iletimi ve hareketi sağlamak. Molekül yapısında hücre zarını delip geçen dört parça, iki hücre dışı ilmek ve hücre içine giren amino ve karboksil kuyrukları var. Bu moleküler yapı, bütün tetraspanin grubu proteinlerde (CD9, KAI-1/CD82 ve CD63) bulunuyor. Bu gruptaki hücre zarı proteinleri, kanserlerin atlama (metastaz) yapmasını kettiyor. Zarda tetraspaninlerin azlığı, kanserin saldırganlığını ve uzak organlara atlamasını artırıyor. CD9 birçok dokuda var; fakat bu proteini içermeyen dokular da bulunuyor.

Tetraspanin molekülleri, zar üzerinde hem birbirleriyle, hem hücrelerarası madde proteinleri için almaç rolünü oynayan b1 integrinlerle (a3b1 ve a6b1) ve hem de kan pıhtılaşmasını önleyen bir madde olan

heparini bağlayan epitelyal büyüme faktörü (EGF) benzeri moleküllerle (ProHb-EGF) ilişki içindedirler. Böylece tetraspaninler, hücre yüzeyine özgü proteinlerin büyük moleküler kompleksler halinde gruplaşmasını ve ilişkiye girmesini sağlıyor. Hücre yüzeyinde örgütleyici ve görev kolaylaştırıcı bir rol oynuyorlar.

CD9'un canlılardaki rolünü araştırmak için bilim adamları, fare embriyonu kök hücrelerinde genetik mühendisliği yöntemleriyle, bu proteini kodlayan geni görev yapmaktan alıkoydular.

CD9 geni tamamen etkisizleştirilmiş fareler, başka bir deyişle bu geni hiç taşımayan fareler, erkek ol-



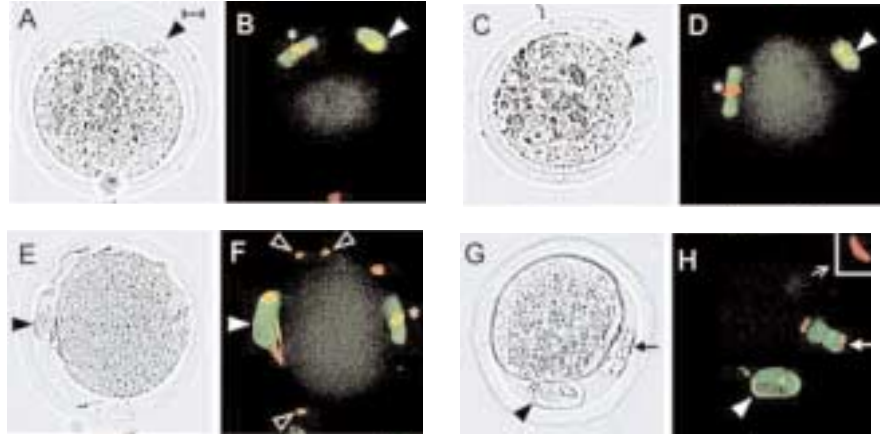
Şekil 1- CD9'u olmayan ya da iki tane olan dişi farelerden elde edilen yumurta ya da embriyonlar. CD9'suz (A) ve çifte CD9'lu (B) yumurtalar, 2.5 gün hücre kültüründe yaşatıldı. Döllenen 3.5 gün sonra dölyatağı boynuzlarından yumurtalar ya da embriyonlar alındı. C- CD9'suz dişilerde parçalanmış yumurta bulundu. D- Çifte CD9'lu dişilerde blastosist evresine erişmiş embriyonlara rastlandı.

sun dişi olsun, normal biçimde doğup geliştiler. Öyle anlaşılıyor ki bu proteinin yokluğu, hücre yapışmasını ve hücre büyümesini etkilemiyor. CD9 geni, eş kromozomların yalnız birinde bulunan fareler de normal olarak doğdu ve büyüdü. Buna karşılık, CD9 genleri her iki eş kromozomda da bulunan farelerle, hiçbirinde bulunmayanlar arasında yavru-lama bakımından önemli farklar vardı. Normal gen dağılımlı fareler kendi aralarında çiftleştiklerinde normal yavrular doğurdular; erkek ve dişi yavru sayısı eşitti ve Mendel'in heterozigotluk dağılımı gerçekleşmişti (% 25 her iki eşkromozomda CD9 geni taşıyan, % 50 tek kromozomda CD9 geni taşıyan ve % 25 CD9 geni yok).

Hiç CD9 taşımayan erkek fareler, normal ya da çift genli farelerle çiftleştiklerinde % 93-100 oranında normal gebelik ve yavrular meydana geldi. Buna karşılık, her üç türden erkekle çiftleşen CD9'suz dişi farelerin ancak % 50-60'ı yavru doğurabildi. Normal dişi farelerde gebelik, çiftleşmeden 4.5 gün sonra başlar-ken, bu proteini hiç taşımayan farelerde, 19-30 gün sonra başladı. Normal dişi fareler ortalama 2.3 yavru yaparken CD9 taşımayan dişiler ortalama 1.5-2 yavru yapabildiler. Yavru ölüm oranı çift genli dişi farelerde % 2'den azken, hiç CD9 olmayanlar-da % 32-55'e yükseliyordu.

CD9 genleri çift ya da hiç olmayan fareler arasında vaginal tıkaç sıklığı bakımından bir fark yoktu. Bu da, çiftleşme davranışlarında bir değişme olmadığını gösteriyordu. (CD9'suz farelerde çiftleşme sıklığı % 16.9, ötekilerdeyse % 17.4). Bu proteinden yoksun olan farelerin yavru yapamayılarının nedeni sperm yumurtaya ulaşamaması da değildi; çünkü yumurtayı dölyatağına bağlayan boruda (oviductus) sperm hücreleri bulunmuştu.

6 haftalık CD9 yoksunu farelerde yumurtalıklar mikroskopik olarak incelendiğinde, normal farelere göre bir fark bulunamadı. Çıkmış yumurta sayısı da normaldi. Fakat bu farelerden döllenmeden yarım gün sonra yumurta alındığında, bu yumurtanın hücre kültüründe bölünme yapamadığı ve paramparça oldu-



Şekil 2- Yumurta DNA-tubulinle işaretlenmiş. Yumurtalar lam üzerine yerleştirildikten sonra, önce tubulin YL 1/2'ye karşı oluşturulmuş monoklonal antikolarla ve sonra da keçiden elde edilmiş flüoresan anti-fare antikolarıyla örtüldü. Hem CD9'suz (A ve B) ve hem de çift CD9'lu (C ve D) farelerde, yumurtanın bölünmesi 2. mayoz bölünmesinin metafaz evresinde durmuştu. Bu, metafaz içinin ve DNA-tubulin artıkları içeren 1. kutup cisminin varlığından belliydi. (içi dolu ok başları). E ve F- Doğal olarak yumurtlamış ve döllenme yapmış bir CD9'suz farenin 2. mayoz bölünme metafazında bölünmeyi durdurmuş yumurtasının çevresinde sperm hücreleri (içi boş ok başları). G ve H- Doğal olarak yumurtlamış ve döllenme yapmış bir çift CD9 genli dişi farenin yumurtası telofaz evresine kadar bölünmüş ve 2. kutup cismini atmış (ok); 1. kutup cismi hala görülüyor. Küçük resim sperm hücresi DNA'sını kısmen açılmış olarak gösteriyor.

ğu görüldü (Şekil 1). Buna karşılık çift CD9 genli farelerin döllenmiş yumurtası hemen bölünmeye başladı ve 2 gün sonra embriyonal yaşamın 4. evresine erişti. Döllenmeden 3.5 gün sonra CD9'suz dişi farelerin dölyatağında blastosist (bölünmeye başlamış yumurta) yerine parçalanmış yumurta bulundu.

CD9 yoksunu ve zengini farelerden döllenme yapmamış olanlara insan koryonik gonadotropin hormonu hCG enjekte edildi ve 12 saat sonra bunlardan yumurta alındı. Her iki grupta benzer yanıt rastlandı: Her iki grupta da dişi fareler 20 civarında yumurta çıkardılar. CD9'dan yoksun farelerin % 70'inde ve çifte genli olanların da % 74'ünde mayoz I bölünmesinin tamamlandığını gösteren 1. kutup cismi vardı. Monoklonal antikor testleriyle her iki grupta da yumurta bölünmesinin mayoz II metafaz evresinde durduğu görüldü. (Şekil 2 A,B,C,D). Birinci kutup cismi dayanıksızdı; hCG enjeksiyonundan 17 saat sonra yumurtaların % 25'ten azında 1. kutup cismi vardı. Döllenmeden 12 saat sonra, CD9 geni olmayan farelerden alınan yumurtaların çevre-

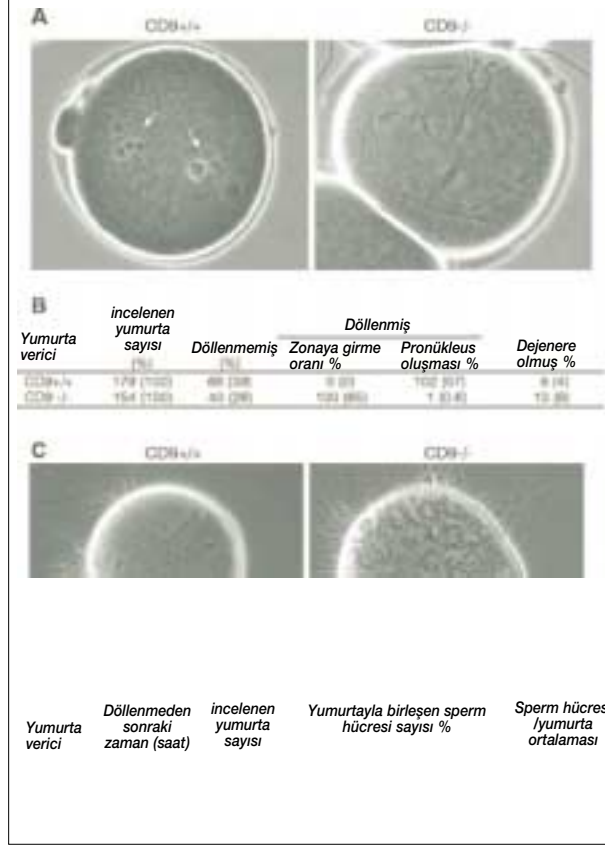
sinde birçok sperm hücresi görüldü (şekil 2F). Demek ki sperm hücreleri yumurtaya erişiyor, ancak içine giremiyorlar. Bu yumurtalardan birkaçı (% 17) 1. kutup cisminin artığını taşıyordu. DNA-tubulin işaretlemesi testi, CD9 yoksunu farelerde yumurtaların hemen hepsinin 2.mayoz bölünmesinin metafaz evresinde bloke olduğunu gösterdi. Buna karşı döllenme yapmış çift CD9 genli dişi farelerin % 94'ünde bir ya da iki kutup cismi görüldü (Şekil 2 G ve H). Bunlarda DNA-tubulin işaretleme testiyle yumurtaların çoğunun dölendiği ve 2. mayoz bölünmesinin metafaz evresini aştığı gösterildi. Bunun kanıtı metafaz levhasının yok olması ve 2. kutup cisminin (şekil 2 G ve H) atılmasıydı.

CD9'ca zengin farelerin yumurtasında, blastosistinde ve hatta yumurtalıktan henüz çıkmamış yumurtalarında bu protein bulunuyordu. CD9 geni olmayan farelerin yumurtalarındaysa bu protein görülüyordu.

Daha sonra, çifte CD9 taşıyan ve hiç taşımayan farelerde tüp bebek deneyi yapıldı. Yumurta ve sperm hücrelerine ek olarak, tüplerin bir yarısına CD9 proteinine karşı oluş-



Şekil 3-CD'siz yumurtalarla tüp bebek deneyleri: Zonaları sağlam yumurtalar kullanıldı. Sıfır ve çift CD9'lu farelerden alınan yumurtalar, çift CD9'lu sperm hücreleriyle döllenmedi. Döllenmeden 6 saat sonra elde edilen çift ve sıfır CD9'lu yumurtaların A'da mikrografları, B'de döllenme hızları görülüyor. Zona pellucidaya girebilmiş sperm hücreleri lakmoid boyası kullanılarak sayıldı. Sıfır CD9'lu yumurtalar sperm hücresiyle birleşemediler ve metafaz II'de kaldılar. Çift CD9'lu yumurtalara sperm hücreleriyle birleşerek pronucleus (oklar) oluşturdular. C'de zonasız yumurtalar görülüyor. Döllenmeden 1 saat sonra yıkanan çift ve sıfır CD9'lu yumurtaların yüzeyindeki sperm hücrelerinin sayısı benzerdi. A ve C'de faz kontrast mikroskopuyla 400 kez büyütülmüş canlı yumurtalar görülüyor. D'de çift ve sıfır CD9'lu yumurtaların normal sperm hücreleriyle birleşme oranları veriliyor. Füzyon yapmış sperm hücreleri döllenmeden 1 ve 6 saat sonra sayıldı.



turulmuş monoklonal antikor, öteki yarısına da kontrol sıçanı monoklonal antikor konuldu. 24-48 saat sonra tüpde 2-4. evredeki embriyonlar arandı. Anti-CD9 monoklonal antikor verilmiş farelerin ancak % 4'ünde, kontrol grubunsa % 49'unda embriyon gelişmesi görüldü.

Bir başka tüp bebek deneyindeyse, gene iki uç gruptan alınan yumurtalar, normal fare sperm hücreleriyle birleştirildi. Her iki grupta da 6 saat sonra sperm hücrelerinin yumurtayı saran "zona pellucida" tabakasını geçtiği görüldü. CD9 yoksunu farelerin hiçbirinde yumurtayla sperm hücresi birleşerek pronucleus (ilkel çekirdek) oluşturamadı. (Şekil 3 A ve B). Normal koşullarda zona pellucidayı geçen bir sperm hücresi yumurtanın sitoplazmasıyla birleşerek yumurtayı etkinleştirir. Etkinleşme, yumurtanın zona pellucidaya tanecikler atarak bir başka sperm hücresinin girişini önlemesi şeklinde belirir. Buna karşı CD9'suz farelerde zona pellucidada en az 5 sperm hücresi bulunuyordu (şekil 2 F).

Tüp bebek deneyi, zona pellucidası çıkarılmış CD9 taşımayan yumurtalarla tekrarlandı. Amaç, sperm

hücrelerinin doğrudan doğruya plazma zarıyla temasını sağlamaktı. CD9 geni olmayan ve çift olan yumurtalar arasında, bağlanan sperm hücre sayısı bakımından bir fark bulunamadı (Şekil 3). Buna karşı CD9'suz yumurtalarda sperm hücresinin yumurtayla birleşmesi (füzyon) çok aksıyordu. Şöyle ki bu protein bulunmayan yumurtalarda, döllenmeden 1 saat sonra füzyon oranı % 98'den % 4'e ve 6 saat sonra da % 100'den % 21'e düştü. Bir başka deneyde de, yumurtalarının zona pellucidası çıkartılmış CD9 yoksunu ve zengini farelerde sperm hücresi-yumurta bağlanması ve sperm hücresi-yumurta füzyonu arandı. İki grup arasında bağlanma bakımından bir fark bulunamadı; fakat CD9'suz yumurtalarda füzyon oranı % 0 iken, bu protein genlerinin iki tane bulunduğu yumurtalarda füzyon oranı % 56-94 arasındaydı.

Bu deneylerden önce dişi farelerdeki kısırlığın, yumurtanın büyümesi, olgunlaşması ve çıkmasıyla ilgili olduğu düşünülüyordu. Örneğin zona pellucida proteinlerinden ZP3 eksikliğinin kısırlık yaptığı biliniyordu. Bu deneylerle anlaşıldı ki tetraspanin CD9'un yokluğu, yumurtalıkları

Küçük Sözlük

Mayoz bölünmesi: Seks hücrelerinde kromozom sayısını yarıya indiren, diploid sayıya haploid yapan bölünme. Üstüste 2 mayoz bölünmesi olur; 1. bölünme kromozom sayısını yarıya indirir; 2. bölünme kromozom sayısını yarıya inmez; yine haploid kalır. 1. bölünmede 1. kutup cisim, 2. bölünmede 2. kutup cisim hücreden dışarı atılır. Mayozun fazları profaz, metafaz, anafaz ve telofazdır.

İntegrin: Hücre zarı proteinlerinden biri. İntegrinler bir yandan hücre ara maddesiyle, bir yandan da CD9 ve TM4 gibi zar proteinleriyle bağlantılıdır. İntegrinlerin bir çok rolü vardır: hücre içi pH'ı ve kalsiyum düzeyini değiştirmek, fosfolipid metabolizması, protein, tirozin ve serin/treonin fosforilasyonu ve bazı genlerin etkinleştirilmesi.

Homozigotluk: İki eş kromozomda aynı karaktere ait genlerin (alellerin) aynı olması. Örneğin CD9+/+ homozigotluktur.

Heterozigotluk: İki eş kromozomda aynı karaktere ait genlerin (alellerin) farklı oluşu; CD9+/- gibi.

Ekson: DNA'nın aminoasit sentezi yapan parçaları.

İntron: DNA'nın aminoasit sentezi yapmayan, düzenleyici parçaları.

Zona pellucida: Yumurtanın etrafında yumurtanın salgıladığı saydam ve hücre dışı tabaka.

Sarı cisim: Yumurtalıkta atılan yumurtanın yerinde oluşan sarı renkli cisim.

Blastosis: Kese biçimi embriyon.

Monoklonal antikor: Tek bir proteinle etkileşen antikor.

ve yumurtlamayı etkilemez. Bu proteinin eksikliğinde kısırlığın nedeninin, sperm hücresiyle yumurtanın füzyon yapamayışı olduğu düşünülüyor. Yumurta zarı integrinlerinden biri olan a6b1, sperm hücresi yüzey proteinlerinden fertiline bağlanır ve sperm hücresi almaçı rolünü oynar. CD9, integrinlerle (a3b1, a5b1, a6 ± b1) bağlantılı olduğundan, a6 b1 integrini etkileyerek sperm hücresi-yumurta füzyonunu sağlıyor olabilir.

CD9 proteini eksikliğinin yalnız sperm hücresi-yumurta füzyonuna engel olduğu, döllenmiş yumurtanın gelişmesini önlemediğini göstermek için CD9'suz yumurtalar içine normal sperm hücresi enjekte edildi; bu döllenmeden normal embriyonlar oluştu.

Bu deneyler CD9'un yumurta döllenmesindeki önemini gösterip, tetraspaninlerin biyolojik görevini ortaya koymuş oldu. Şimdi iş, bazı kadın kısırlıklarında CD9 eksikliği olup olmadığını araştırmaya kalıyor.

Selçuk Alsan

Kaynaklar:

- 1) Science 287: 319-21, 2000
- 2) Science 287: 321-24, 2000
- 3) Proc Natl Acad Sci USA 96: 11830-5, 1999
- 4) J Immunol Methods 229: 35-48, 1999
- 5) Biochem J 338: 61-70, 1999