

KATNAL2 (KATANIN-LIKE2) GENİNDEKİ YANLIŞ ANLAM VARYANTI TAŞIYAN HASTA FİBROBLASTLARINDAN ELDE EDİLMİŞ iPSC’LERDEN NÖRAL PROGENİTÖR HÜCRELERİN TÜRETİLMESİ

Ayşe Semra Hız¹, Ece Sönmezler², Burcu Ekinci², Tutku Yaraş², Ahmet Yaramış³, Yavuz Oktay²
¹ Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD, Çocuk Nöroloji BD, İzmir
² İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi (İBG), İzmir
³ Özel Çocuk Nöroloji Kliniği, Diyarbakır

AMAÇ:

Bu araştırma TÜBİTAK tarafından desteklenmektedir (120S404)

Pediyatrik birinci basamakta karşılaşılan en yaygın kronik tıbbi durumlardan olan nörogelişimsel hastalıklar bilişsel işlevler, motor beceriler, hafıza, iletişim ve davranış alanlarında bozukluklarla karakterlidir. Nöbetler ve beyin malformasyonları eşlik edebilir. Etiyolojiden sıklıkla genetik faktörler sorumludur, ancak çoğunda hastalık yapıcı mekanizmalar tam anlaşılamamıştır. Bunun temel nedenlerinden biri, nörogelişimsel hastalıkların mekanizmalarını anlamada hayvan deneyleri veya postmortem incelemelerin, canlı nöronal hücrelerin yerini tutmamasıdır. Dolayısıyla bu yıkıcı hastalıkları iyileştirecek hedefe yönelik bireysel tedavilerin geliştirilmesi zorlaşmaktadır. Bu ihtiyaca yanıt olarak, günümüzde ulaşılan kök hücre ve yeniden programlama teknolojileri devrim yaratmıştır. Bu çalışmada, ileriye dönük fonksiyonel araştırmaların yapılmasına olanak sağlamak üzere, işlevi tam olarak bilinmeyen KATNAL2 geninde patojenik bir varyant (p.Ser392Pro) saptadığımız zihinsel yetersizlik, epilepsi ve otistik belirtileri olan bir hastanın (Resim 1,2) fibroblastlarından Yamanaka faktörleri kullanarak ilk aşamada uyarılmış pluripotent kök hücreler (iPSC-KATNAL2_mut) geliştirilmiştir. İkinci aşamada ise ileriye dönük mikrotübül-ilgili yapıların fonksiyonel analizlerini gerçekleştirmek üzere, mutant ve kontrol iPSC hücreleri, nöral progenitör hücrelere (NPC) farklılaştırılmıştır.

YÖNTEM:

İlk olarak hasta dermal fibroblastlarının epizomal plazmid yöntemiyle yeniden programlanmaları sağlanmıştır. Elde edilen iPSC’lerin, fare embriyonik fibroblast (MEF) hücreleri üzerinde ve HESC medium varlığında çoğaltılarak uygun sayıya ulaşmaları sağlanmıştır. Her gün besiyeri değişikliği yapılan ve yeterli büyüklüğe ulaşan iPSC kolonileri MEF hücreleri üzerinden alınarak matrijel kaplı kuyucuklara aktarılmıştır. Farklılaştırma başlatmak için, yeterli sayıya ulaşan iPSC kolonileri “Monolayer Kültür Protokolü” ile tek hücrelere ayrılmış ve SMAD inhibisyonu ile nöral indükleme sağlayan “STEMdiff™ SMADi Neural Induction Kit” kullanılmıştır. İlk üç pasaj boyunca verilen nöral indüksiyon besiyeri ile merkezi sinir sistemi tipi nöral öncül hücreler indüklenmiş ve sonrasında “STEMdiff™ Neural Progenitor Medium”a geçilerek yeterli sayıda NPC elde edene kadar kültür devam ettirilmiştir (Resim 3,4). Üretilen NPC’lerin karakterizasyonu için, farklılaştırma süreci boyunca floresan mikroskop altında hücrelerin morfolojisi incelenmiş ve Pax6, Nestin, Sox1 ve Oct4 antikorumları ile immunfloresan boyamaları gerçekleştirilmiştir.

BULGULAR:

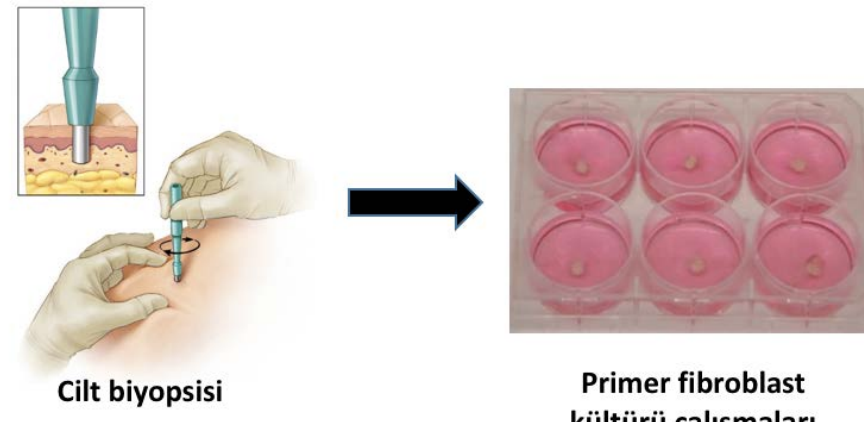
Farklılaştırılan NPC’lerin uygun morfolojik özellikleri sağladığı ve pluripotensi belirteci olan Oct4 için negatif, nöral öncül hücre belirteci olan Nestin, Pax6 ve Sox1 için pozitif olduğu gösterilmiştir (Resim 5). iPSC-KATNAL2_mut hücreler ile yabanıl-tip NPC’ler arasında bu belirteçler için belirgin bir farklılık gözlenmemiştir.



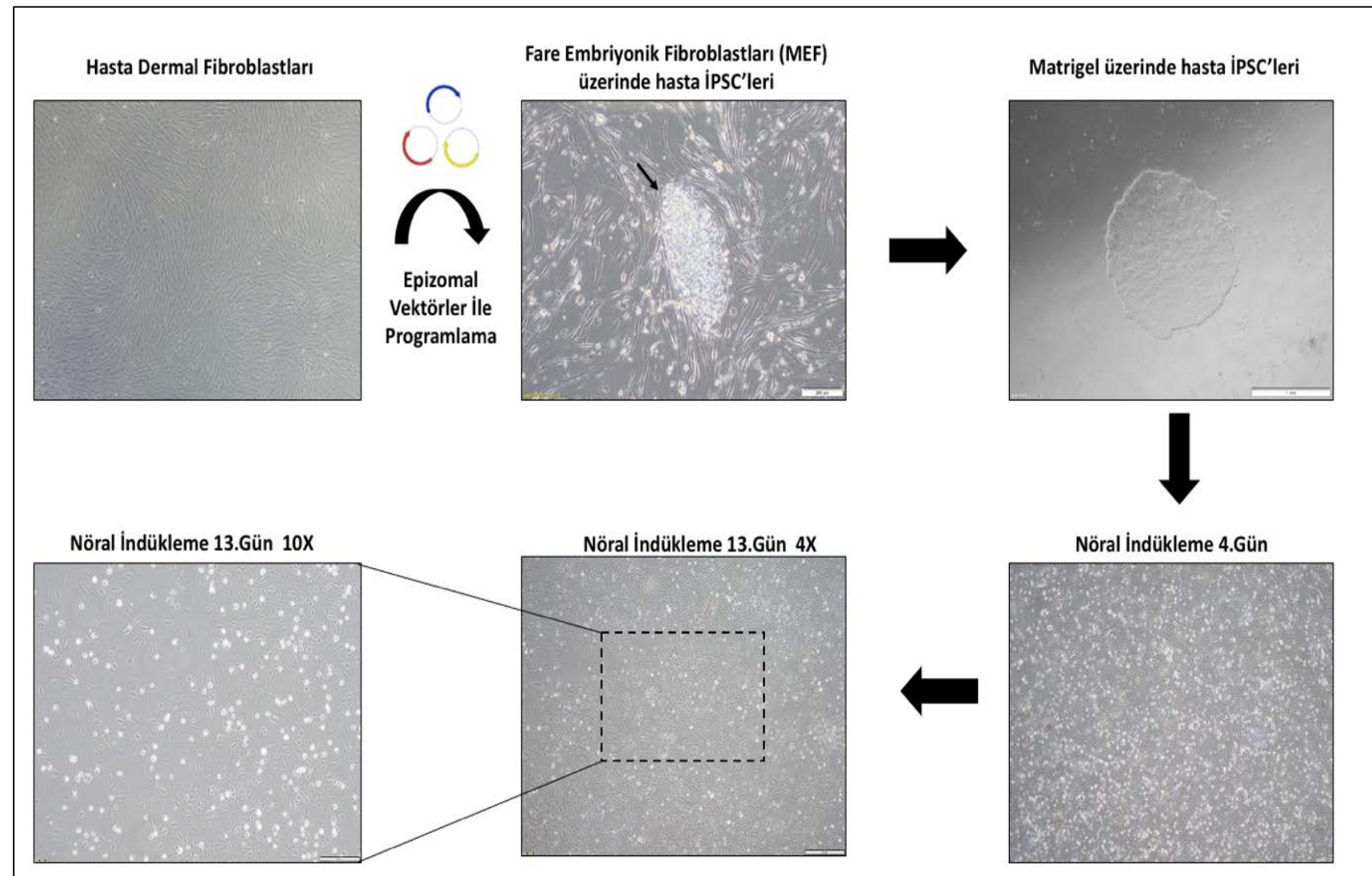
Resim 1: Hastanın genel görünümü



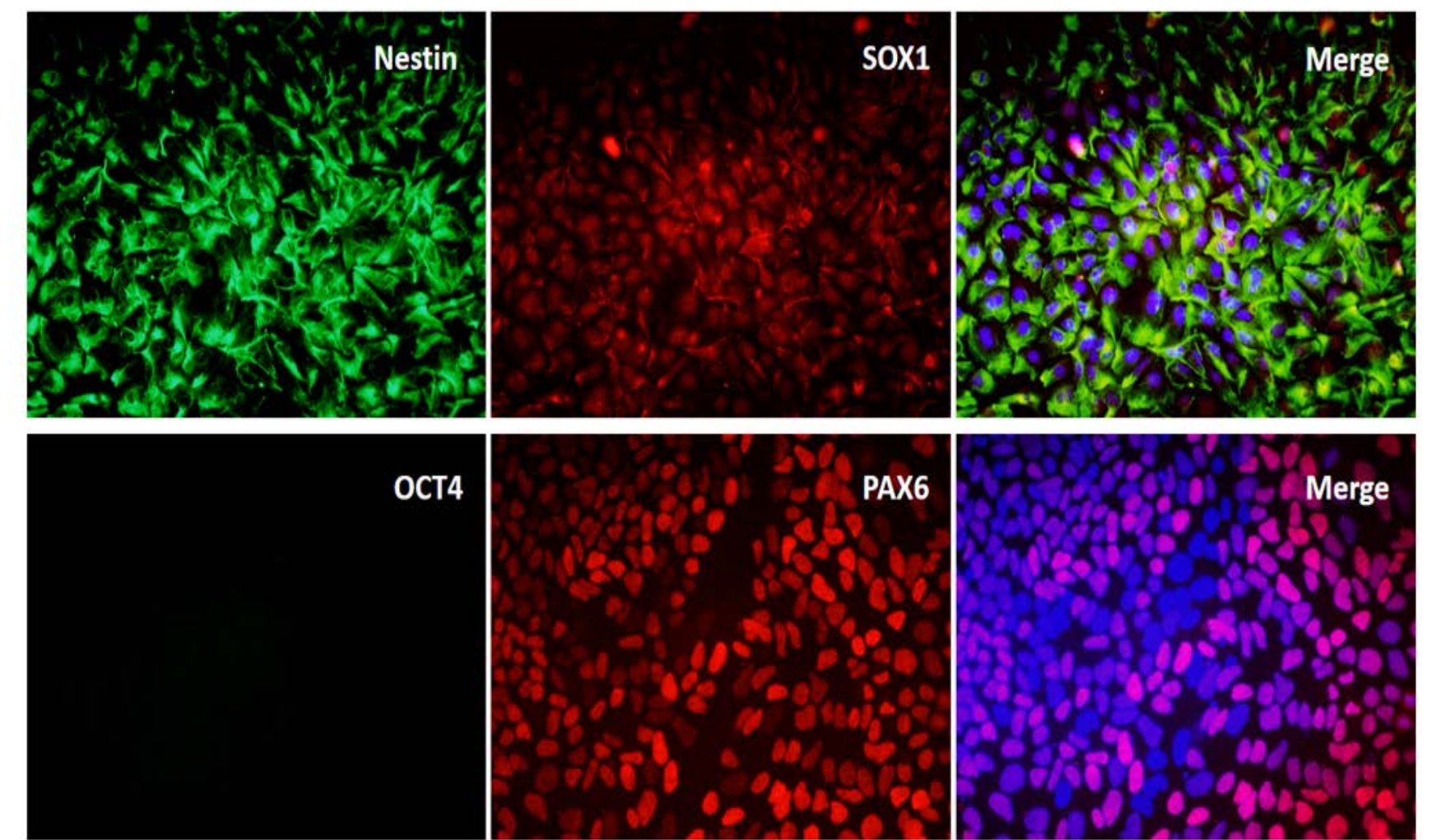
Resim 2: KATNAL2 geninin şematik gösterimi ve varyantın segregasyonu



Resim 3: Hastadan deri biyopsisi alınması ve primer fibroblast kültürünün eldesi



Resim 4: iPSC hücrelerinin nöral progenitör hücrelere farklılaştırılma aşamaları



Resim 5: Nöral progenitör hücrelerin, karakterizasyonları için yapılan immunfloresan antikor boyamalarında pluripotensi belirteci olan Oct4 için negatif, nöral öncül hücre belirteci olan Nestin, Pax6 ve Sox1 için pozitif oldukları görülmektedir

SONUÇ:

Bu çalışmada ilk defa patojenik KATNAL2 mutasyonu taşıyan hasta hücrelerinden önce iPSC, daha sonra NPC hücre modelleri oluşturulmuştur. Devam eden ve gelecek çalışmalarda bu modeller kullanılarak KATNAL2’nin nörogelişimdeki rolü ve etkileşimleri daha iyi anlaşılabilir, tedaviye yönelik olarak ilaç ve gen tedavi çalışmaları gerçekleştirilebilecektir. İnsan beyninin karmaşık yapısını tam anlamıyla temsil etmese de büyük miktarlarda üretim kolaylığı, daha az değişkenlik göstermesi ve üzerinde çok sayıda kontrollü test yapılabilir olması nedeniyle bu ve benzer modeller, nörogelişimsel hastalık mekanizmalarının anlaşılmasında ileri fonksiyonel çalışmaların yapılmasına olanak sağlayacak önemli araçlardır.

KAYNAKLAR:

McNally, K.P., Berg, E., Cortes, D.B., Hernandez, V., Mains, P.E., McNally, F.J., 2014. “Katanin maintains meiotic metaphase chromosome alignment and spindle structure in vivo and has multiple effects on microtubules in vitro”, Mol Biol Cell, 25, 1037–1049.
Yu, W., Solowska, J., Qiang, L., Karabay, A., Baird, D., Bass, P., 2005. “Regulation of Microtubule Severing by Katanin Subunits during Neuronal Development”, J Neurosci, 25 (23): 5573–5583.
Neale B.M., Kou Y., Liu L., Ma’ayan A., Samocha K.E., Sabo A., 2012. “Patterns and rates of exonic de novo mutations in autism spectrum disorders”, Nature, 485(7397), 242-5.