

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KAN-TESTİS BARIYERİNİN BOZULDUĞU FARE
MODELİNDE KROMATİN HELİKAZ/ATPAZ
DNA BAĞLANMA PROTEİN 1 BENZERİ (CHD1L)
PROTEİNİNİN EKSPRESYONUNUN
DEĞERLENDİRİLMESİ

Gamze TOSUN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2019-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KAN-TESTİS BARIYERİNİN BOZULDUĞU FARE
MODELİNDE KROMATİN HELİKAZ/ATPAZ DNA
BAĞLANMA PROTEİN 1 BENZERİ (CHD1L)
PROTEİNİNİN EKSPRESYONUNUN
DEĞERLENDİRİLMESİ

Gamze TOSUN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Çiler ÇELİK ÖZENCİ

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2018-3008 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

2019-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Üreme Biyolojisi Programında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 16/09/2019

İmza

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Çiler ÇELİK ÖZENCİ
Akdeniz Üniversitesi



Üye : Prof. Dr. Özgür ÇINAR
Ankara Üniversitesi



Üye : Doç. Dr. Güler Leyla SATI
Akdeniz Üniversitesi




Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Narin DERİN

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Öğrenci 
Gamze TOSUN
İmza

Tez Danışmanı 
Prof. Dr. Çiler ÇELİK ÖZENCİ
İmza

TEŐEKKÜR

Tezimin bu aşamaya gelmesinde;

Danışman hocam Sayın Prof. Dr. Çiler ÇELİK ÖZENCİ'ye tez aşamasında göstermiş olduğu sabır, tevazu ve sevgisinden dolayı,

Ekip arkadaşlarım Nilay KUŐÇU, Soner ÇELİK, Dileyra ADIGÜZELve Nayçe İlayda BEKTAŞ'a her zorlandığımda yardıma koŐtuklarından dolayı,

Tezime fare Sertoli hücre hattı ile katkı sağlamış olan Prof. Dr. Sevil ÇAYLI'ya,

Tezimin projelendirilmesinde ve tezime insan testis kesit numunesi ile sağlamış olduğu katkılardan dolayı Dr. Pınar ŞAHİN'e,

İhtiyacım olduğunda yardımlarını esirgemeyerek her zaman destek olan

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nın tüm hocalarına, çalışanlarına ve asistan arkadaşlarıma,

Her soruma sıklımadan cevap verdiklerinden dolayı sevgili Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına,

Sevgili aile üyelerim, annem Emine TOSUN, babam Ali TOSUN, kardeşlerim Gonca ve AŐkın TOSUN'a bu zorlu süreçte gösterdikleri sevgi, sabır ve sağladıkları maddi imkanlardan dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Gamze TOSUN

ÖZET

Amaç: Kanser hücrelerinin, CHD1L aracılı MMP'lerin aktivasyonu ile invazyon sağladığı gösterilmiştir. Erkek üreme sisteminde ise; CHD1L'nin spermatogonyal kök hücrelerin hayatta kalmasını sağladığı bildirilmiştir. Amacımız, bozulmuş kan testis bariyerinde CHD1L ekspresyonunun araştırılmasıdır.

Yöntem: Çalışmada 48 adet BALB/c ırkı yetişkin (5 haftalık) erkek fare kullanıldı. Kan testis bariyerinin (KTB) bozulması için farelere oral gavaj yolu ile MEHP (Mono-(2-Etilheksil Fitalat) 30mg/ml uygulandı. Taşıyıcı (mısır yağı) ve MEHP uygulanan gruplardan; 6., 12. ve 24. saatlerde testis dokuları elde edildi. Testis dokularına histopatolojik değerlendirme için PAS-H boyanması ve Johnsen skor değerlendirmesi yapıldı. β 1-integrin protein ekspresyonu KTB bozulduğunu göstermek amacıyla western blot analiziyle değerlendirildi. İmmünohistokimya tekniği ile CHD1L, MMP-2, MMP-9 ve TIMP-2 protein ekspresyonu değerlendirildi. CHD1L protein ekspresyonu western blot analizi ile de değerlendirildi. 15P-1 fare Sertoli hücre hattında CHD1L ekspresyonu western blot analizi ile değerlendirildi. Verilerin dağılımına göre parametrik ya da parametrik olmayan testlerle uygun istatistiksel analizler yapıldı.

Bulgular: MEHP uygulanan grupta histopatolojik değerlendirmeler ve β 1-integrin protein ekspresyonu azalmasıyla KTB'nin bozulduğu gösterildi. KTB'nin bozulduğu modelde fare testisinde 6. ve 24. saatte CHD1L ekspresyonunun gruplar arasında benzer olduğu, 12. saatte MEHP grubunda ekspresyonunun anlamlı olarak arttığı gösterildi ($p<0.05$). KTB'nin bozulduğu testis dokusunda, 6., 12., ve 24. saatlerde MMP-2 ve MMP-9 ekspresyonlarının arttığı ve TIMP-2'nin ise azaldığı gösterildi. CHD1L ekspresyonunun sıçan ve insan testisinde; Sertoli ve germ hücrelerinde de olduğu ortaya kondu. Sadece Sertoli hücrelerindeki CHD1L ekspresyonu kültüre edilen Sertoli hücrelerinde ayrıca gösterildi.

Sonuç: Çalışmamız; KTB'nin bozulduğu modelde CHD1L ekspresyonunu değerlendirmiştir ve bu durumda oluşan germ hücre kaybı ve neticesinde oluşan erkek infertilitesinin moleküler sebeplerini anlamak için temel bir çalışma niteliğindedir.

Anahtar Kelimeler: fare, testis, CHD1L, Sertoli hücresi, kan testis bariyeri

ABSTRACT

Objective: Cancer cells have been shown to invade tissues by activation of MMPs after activation of the CHD1L-mediated signaling pathway. In the male reproductive system; CHD1L has been reported to promote the survival of spermatogonial stem cells. Our aim was to investigate the expression of CHD1L in the impaired blood testis barrier in mice.

Method: 48 BALB/c adult male (5-week-old) mice were used in the study. 30mg/ml MEHP (Mono-(2-Ethylhexyl phthalate) was administered via oral gavage to induce blood testis barrier (BTB) disruption. Two groups were performed, vehicle and MEHP, to evaluate testis tissues at 6h, 12h, and 24h. PAS-H staining and Johnsen score were done for histopathological evaluations. β 1-integrin protein expression was evaluated by western blot technique to confirm BTB disruption. CHD1L, MMP-2, MMP-9, and TIMP-2 protein expression was evaluated by immunohistochemistry. CHD1L protein expression was evaluated by western blot analysis in all groups. Expression of CHD1L in Sertoli cell line was also evaluated. Statistical analyses for parametric and non-parametric data were performed where appropriate.

Results: Histopathological evaluations showed that BTB was impaired in MEHP group. CHD1L expression increased significantly in 12h group after BTB disruption ($p < 0.05$). Expression of MMP-2 and MMP-9 increased whereas TIMP-2 expression decreased after BTB disruption. CHD1L protein expression was also confirmed in Sertoli and germ cells of rat and human testes. Expression of CHD1L was confirmed in cultured Sertoli cells only.

Conclusion: In this study, expression of CHD1L was evaluated with in disrupted BTB model in mice. Possible roles of CHD1L in BTB regulation/dysregulation which may lead to germ cell loss and male infertility needs further investigation.

Keywords: mouse, testis, CHD1L, Sertoli cell, blood testis barrier

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR	viii
1. GİRİŞ	1
1.1. Hipotezin Temeli ve Amaç	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Spermatogenez	3
2.1.1. Sertoli Hücresi ve Kan Testis Bariyeri	3
2.1.2. Kan-Testis Bariyerinin Yıkılıp, Yeniden Oluşma Mekanizmasının Düzenlenmesi	8
2.2. CHD1L ve Roller	11
2.2.1. CHD1L'nin Testisteki Rolü	16
3. GEREÇ ve YÖNTEM	18
3.1. Deney Hayvanları	18
3.2. Doku Takibi ve Kesit Alma	18
3.3. PAS-H Boyanması	18
3.4. Testis Değerlendirmesi (Johnsen Kriterleri)	19
3.5. İmmünohistokimya Yöntemi	19
3.6. Western Blot Analizi	20
3.6.1. Western Blot İçin Örneklerin Hazırlanması	20
3.6.2. BCA (Bicinchoninic acid) Protein Assay Kit İle Protein Miktarının Elde Edilmesi	20
3.7. Sertoli Hücre Kültürü	21
3.7.1. Hücre Çoğaltma (Subculturing) Aşamaları	22

3.7.2. Hücre Lizatı Hazırlanması	22
3.7.3. İmmünfloresan Boyama	22
3.8. İstatistiksel Analizler	23
4. BULGULAR	24
4.1. MEHP Uygulanması Sonucu Kan Testis Bariyerinin Bozulmasının Gösterilmesi	24
4.2. MEHP İle Kan Testis Bariyerinin Bozulduğu Modelde CHD1L Ekspresyonun Değerlendirilmesi	27
4.3. Sıçan ve İnsan Kontrol Testisinde CHD1L Ekspresyonun Değerlendirilmesi	30
4.4. Sertoli Hücre Hattında CHD1L Ekspresyonunun Değerlendirilmesi	31
4.5. Sertoli hücre hattında CHD1L ekspresyonunun İmmünfloresan Yöntemi ile Değerlendirilmesi	31
4.6. MEHP İle Kan Testis Bariyerinin Bozulduğu Modelde MMP-2, TIMP-2 ve MMP-9 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi	34
5. TARTIŞMA	37
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	39
KAYNAKLAR	40
ÖZGEÇMİŞ	45

TABLolar DİZİNİ

Tablo 3.4. Johnsen skor değerlendirmesi

19

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. 1.	Fare testisinde spermatogenez	1
Şekil 2. 1.	Kan-testis bariyerini düzenleyen bağlantı kompleksleri ve proteinler	4
Şekil 2. 2.	Seminifer epitelde bulunan ektoplazmik özelleşmenin moleküler mimarisi	7
Şekil 2. 3.	Kemirgenlerde kan testis bariyerinin açılıp kapanma mekanizması	8
Şekil 2. 4.	MEHP kaynaklı Sertoli hücre hasarının sonucunda meydana gelen germ hücre apaoptoz mekanizması	8
Şekil 2. 5.	Sertoli hücrelerinde TIMP-2 ve MMP-2'nin kan-testis bariyeri ile ilişkisi	9
Şekil 2. 6.	Kan-testis bariyerinin yıkılıp yeniden oluşumunda mTOR sinyal yolağının rolü	10
Şekil 2. 7.	CHD1L geninin genomik yapısı	12
Şekil 2. 8.	Hepatokarsinogenez sırasında Nur77 aracılı yoldaki CHD1L'nin rolü	14
Şekil 2. 9.	CHD1L'nin ARHGEF9 aracılı hepatoselüler karsinomdaki rolü	15
Şekil 4.	6, 12 ve 24. saatlerde taşıyıcı ve MEHP gruplarında PAS-H boyanması	25
Şekil 4. 1.	6, 12 ve 24. saatlerde taşıyıcı ve MEHP gruplarında johnsen testis değerlendirilmesi	26
Şekil 4. 2.	6, 12 ve 24. saat taşıyıcı ve MEHP gruplarında β 1 İntegrin ekspresyonlarının değerlendirilmesi	27

Şekil 4. 3.	6, 12 ve 24. saatlerde taşıyıcı ve MEHP gruplarında CHD1L ekspresyonunun değerlendirilmesi	28
Şekil 4. 4.	6, 12 ve 24. saatlerde taşıyıcı ve MEHP gruplarında CHD1L hücresel lokalizasyonunun değerlendirilmesi	28
Şekil 4. 5.	6, 12 ve 24. saatlerde taşıyıcı ve MEHP gruplarında CHD1L hücresel lokalizasyonunun değerlendirilmesi	29
Şekil 4. 6.	Sıçan ve insan kontrol testisinde CHD1L ekspresyonu	30
Şekil 4. 7.	Sertoli hücre hattında CHD1L protein ekspresyonu	31
Şekil 4. 8.	12 ve 24 saat kültüre edilmiş Sertoli hücrelerinde CHD1L ekspresyonu	32
Şekil 4. 9.	Sertoli hücre hattında 12 ve 24 saat 200 µM MEHP ile kültüre edilmiş Sertoli hücrelerinde CHD1L ekspresyonu	32
Şekil 4. 10.	Sertoli hücre hattında 12 ve 24 saat 400 µM MEHP ile kültüre edilmiş Sertoli hücrelerinde CHD1L ekspresyonu	33
Şekil 4. 11.	Pozitif (HELA Hücresi) ve İzotip (Rabbit IgG) Kontrol(ler)	33
Şekil 4. 12.	6, 12 ve 24. saatlerde taşıyıcı ve MEHP Grubunda MMP-2 ekspresyonu	34
Şekil 4. 13.	6,12 ve 24. saatlerde taşıyıcı ve MEHP Grubunda TIMP-2 ekspresyonu	35
Şekil 4. 14.	6,12 ve 24. saatlerde taşıyıcı ve MEHP Grubunda TIMP-2 ekspresyonu	35
Şekil 4. 15.	6,12 ve 24. saatlerde Taşıyıcı ve MEHP Grubunda MMP-9 ekspresyonu	36

SİMGELER ve KISALTMALAR

ADP RİBOZ	:	Adenin Difosfat-Riboz
AJ	:	Adherent Bağlantı
ARK5	:	Ampk İle İlişkili Kinaz 5
AKT	:	Protein Kinaz B
ARGHEF9	:	Rho Guanin Nükleotid Değişim Faktörü
BCA	:	Bicinchoninic Acid
BM	:	Bazal Membran
BSA	:	Bovin Serum Albumin
BCL6B	:	B Hücreli CLL / Lenfoma 6B Protein
CAR	:	Cocksackievirüs- Adenovirus Reseptör
CHD1	:	Kromatin Helikaz DNA Bağlanma Proteini 1
CHD1L	:	Kromatin Helikaz/Atpaz Dna Bağlanma Protein 1 Benzeri
CDC42	:	Hücre Bölünmesi Kontrol Proteini 42
CO₂	:	Karbondioksit
DNA	:	Deoksiribonükleik Asit
DAB	:	Diaminobenzidin
EÖ	:	Ektoplazmik Özelleşme
ECM	:	Ekstraselüler Matriks
EMT	:	Epitelyal Mezenkimal Geçiş
ETV5	:	Ets Varyantı 5
EDTA	:	Etilendamin Tetraasetik Asit
EGF	:	Epidermal Büyüme Faktörü

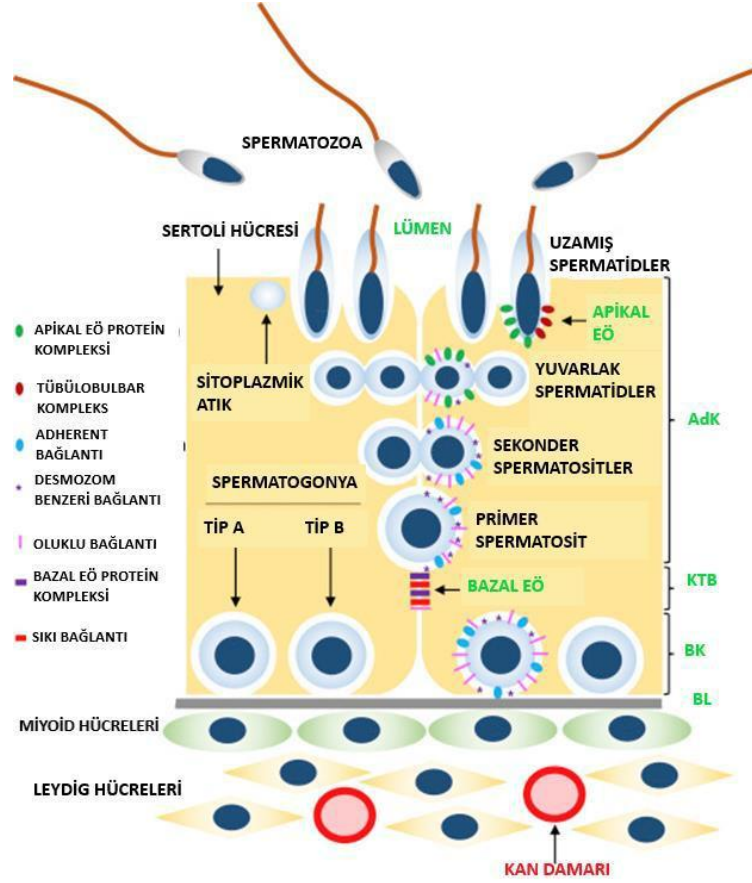
FAK	:	Fokal Adezyon Kinaz
FASL	:	Fas Reseptör Ligand
FBS	:	Fetal Bovin Serum
FITC	:	Floresein İzotiyosiyanat
FSH	:	Folikül Stimüle Edici Hormon
FMO5	:	Dimetilanilin Monooksijenaz
GFRA1	:	Gdnf Ailesi Reseptörü Alfa 1
GDNF	:	Glial Hücreden Türetilmiş Nörotrofik Faktör
GAPDH	:	Gliseraldehit 3 Fosfat Dehidrojenaz
GTP	:	Guanozin Trifosfat
GJ	:	Aralıklı Bağlantı
HCC	:	Hepatoselüler Karsinoma
IGF	:	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
JAM	:	Bağlantısal Adezyon Molekülü
kDA	:	Kilodalton
KTB	:	Kan Testis Bariyeri
KEGG	:	Kyoto Gen ve Genom Ansiklopedisi
LHX1	:	Lim / Homeobox Protein
MCF-7	:	İnsan Meme Adenokarsinoma Hücre Hattı
MMP	:	Matriks Metalloproteinaz
mTOR	:	Rapamisinin Mekanik Hedefi
mRNA	:	Mesajcı Ribonükleik Asit
MEHP	:	Mono-(2-Etilheksil) Fitalat

μL	:	Mikrolitre
NFKB	:	Nükleer Factor Kappa B
NaHSO₃	:	Sodyum Bisülfıt
NLS	:	Nükleer Lokalizasyon Dizisi
OTBS	:	Ortalama Testis Biyopsi Skoru
OCT4	:	Oktamer Bağlayıcı Transkripsiyon Faktör 4
PAR	:	Poli ADP Riboz
PI3K	:	Fosfatidilinositol 3 Kinaz
P-P70S6K	:	Fosforile p70 Ribosomal Protein S6 Kinase
PFA	:	Paraformaldehit
PLZF	:	Promyelositik Lösemi Çınko Parmak Proteini
POU3F	:	POU Alanı Sınıf 3 Transkripsiyon Faktörü
PAS-H	:	Periyodik Asit Schiff- Hemtoksilen
PBS	:	Fosfat Tamponlu Tuzlu Su
PBS-T	:	Fosfat Tamponlu Tuzlu Su- Tween 20
PIK	:	Proteaz İnhibitör Kokteyl
PVDF	:	Poliviniliden Diflorür
SNF2	:	Sükroz Olmayan Fermente 2
TBS	:	Tris Tamponlu Salin
TJ	:	Sıkı Bağlantı
TIMP-2	:	Matriks Metalloproteinaz 2'nin Doku İnhibitörü
TNFA	:	Tümör Nekroz Faktör Alfa
ZO	:	Zonula Okludens

1. GİRİŞ

1.1. Hipotezin Temeli ve Amaç

Spermatogenez, seminifer tübüllerde meydana gelen ve spermatogonyumun spermatozoaya farklılaşmasını içeren karmaşık bir süreçtir. Süreç spermatogonyanın proliferasyonu ile başlayıp spermatositlerin oluşması için spermatogonyal farklılaşma, spermatidlerin oluşması için spermatositlerin mayotik bölünmesinin ardından yuvarlak spermatidlerin olgunlaşması ve testis lümenine olgun spermatozoa'nın salınmasıyla son bulur (Wein, 2016) (Şekil 1.1).



Şekil 1. 1. Fare testisinde spermatogenez (Wein, 2016)

Seminifer tübül bazal membranından lümenine kadar uzanan seminifer epitelde gelişmekte olan germ hücrelerinin yanısıra somatik Sertoli hücreleri de bulunmaktadır. İki Sertoli hücresi kendi aralarında bazale yakın bir konumda yer alan kan testis bariyerini içerir.

Kan testis bariyerini oluşturan çeşitli bağlantı kompleksleri vardır. Bu bağlantı komplekslerinin yapılarının bütünlüğü sağlıklı spermatozoa üretiminde ve sonrasında fertilizasyon yeteneği için oldukça önemlidir. CHD1L'nin Sertoli hücrelerinde eksprese olduğu gösterilmiştir. Ancak literatürde CHD1L'nin Sertoli hücrelerindeki varlığı ve olası rolü ile ilgili bir bilgi bulunmamaktadır. MMP aktivasyonunun kan-testis bariyerinin yıkımında rol oynadığı bilinmektedir. Kanser hücrelerinin, CHD1L aracılı mTOR sinyal yolağını aktivasyonu sonrasında MMP'lerin aktivasyonu ile invazyon sağladığı gösterilmiştir. Ancak kan-testis bariyerinde MMP-2 ve MMP-9 aktivasyonlarını sağlayan mekanizmalar henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Bununla birlikte CHD1L'nin Sertoli hücrelerinde eksprese olduğu ve MMP'lerin Sertoli hücrelerinin oluşturduğu kan testis bariyerini düzenlediği de bilinmektedir. Tüm bu bilgiler ışığında, CHD1L'nin kan testis bariyerinin açılıp kapanma mekanizmasında rolü olabileceği düşünölmektedir. Bu tezin hipotezi; 'CHD1L, MMP aktivasyonu aracılığı ile kan-testis bariyerinin açılıp kapanma mekanizmasını düzenlemektedir.' olup amacı ise MEHP aracılığı ile kan-testis bariyerinin yapısının bozulması sağlanarak CHD1L'nin bu modeldeki ekspresyon paterninin araştırılmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Spermatogenez

Spermatogenez'in amacı spermatogonyal kök hücre popülasyonundan başlayıp bir yandan kök hücre popülasyonunu korumak bir yandan da sperm oluşturmak için spermatogenezde yer alan progenitör hücrelerin devamlılığını sağlamaktır.

Spermatogenez'in başarılı ve sürekli olabilmesi için bazı şartlar gereklidir. Bunlardan birincisi canlının üreme ömrü boyunca gelişen bir kök hücre popülasyonu, ikincisi fertilizasyonu sağlamak ve yeterli sperm oluşumu için spermatogenezde yer alan hücre popülasyonunun artması, üçüncüsü ise son aşamada spermin morfolojik olarak dönüşümü ve hareketliğinin kazanılmasıdır (Yao ve ark., 2015). Tüm bu işlemlerin başarılı olabilmesi için yüksek düzeyde organizasyon ve kontrol gereklidir.

Bu yüksek düzeyde organizasyon ve kontrol işlevinde spermatogenezin düzenlenmesi ve sağlıklı bir şekilde tamamlanması için Sertoli hücreleri oldukça önemlidir.

2.1.1. Sertoli Hücresi ve Kan Testis Bariyeri

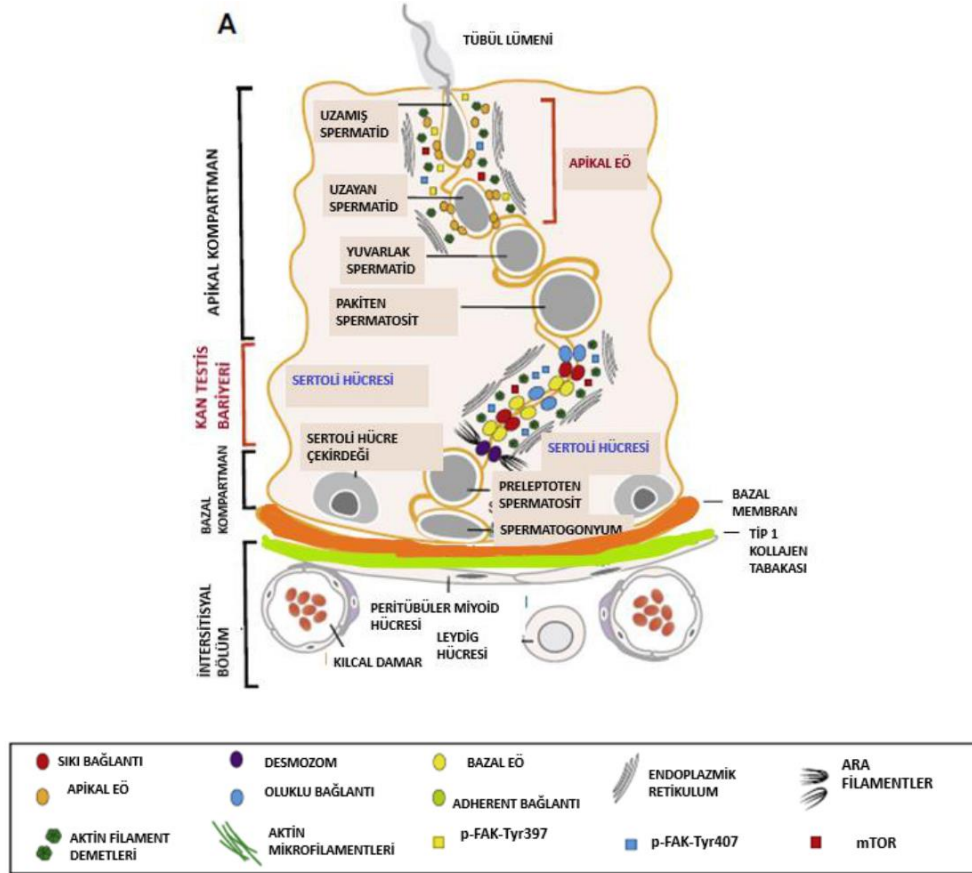
Sertoli hücreleri hem fetal dönemde hem de doğum sonrası testis gelişiminde gelişen germ hücrelerine yapısal destek, beslenme ve artık cisimlerin fagositozu gibi önemli işlevleri vardır (Cheng ve ark., 2010).

Sertoli hücreleri seminifer tübülün bazal laminasına oturan ve seminifer tübül lümenine kadar uzanan somatik hücrelerdir. Sertoli hücrelerinin germ hücrelerini geliştirmek için sağladığı yapısal desteğin yanı sıra önemli yapısal bir özellik ise iki Sertoli hücresi arasında yer alan kan testis bariyeridir (Cheng ve ark., 2012).

Kan testis bariyeri, seminifer epiteli, bazal ve adlüminal olmak üzere iki kompartmana ayırır. Tüm interstisyel hücre tipleri (Leydig, peritübular myoid, makrofaj, dendritik), kan damarları ve gelişimlerinin erken evrelerinde olan germ hücreleri (spermatogonya, preleptoten spermatositler) bazal bölmede bulunurken, daha sonraki mayotik (leptoten,

zigoten ve pakiten spermatozoidler) ve post-mayotik (yuvarlak ve uzayan spermatozoidler) germ hücreleri adlüminal bölme içinde bulunur (Stanton, 2016).

Erken gelişim evresindeki germ hücreleri spermatogenezin sürekliliğini sağladığından bazal kompartmanda korunmaları sağlanmaktadır. Farklanma sürecine girmiş olan hücreler (preleptoten spermatozoidler) kan-testis bariyerini geçerek adlüminal kompartmana geçmektedir (Stanton, 2016). Bu süreçte Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar hızlı bir şekilde yıkılmakta ve ardından yeniden kurulmaktadır. Sertoli hücrelerinin arasında oluşan sıkı bağlantılar kan-testis bariyerini oluşturmaktadır. Spermatogenezin sağlıklı bir şekilde gerçekleşebilmesi için bu açılıp kapanma mekanizması dengeli bir şekilde gerçekleşmelidir. Bu mekanizmanın bozulması immatür germ hücrelerinin lümene erken salınımına neden olmakta, bunun sonucunda da spermatogenez defektleri görülmektedir.



Şekil 2. 1. Kan-testis bariyerini düzenleyen bağlantı kompleksleri ve proteinler (Wen ve ark., 2017)

Sertoli hücrelerinin spermatogenezde ve kan testis bariyerinde bu kadar aktif rol alabilmesini sağlayan Sertoli hücre iskeletinin rolü çok fazladır. Bu hücre iskeletini oluşturan aktin filamanlar, ara filamanlar ve mikrotübüller mevcuttur (Wong ve ark., 2008). Sertoli hücrelerinde yer alan bu yapılar Sertoli hücrelerinin dinamik ve aktif bir şekilde olmasını sağlar. Seminifer epitelde spermatogonik hücrelerin dağılması, yerleşmesi ve hareket etmeleri bu yapıların çeşitli şekil ve yapıda olmasından kaynaklanır.

Sertoli hücrelerinde yer alan ara filamanlar, Sertoli hücrelerinin intersitisyel alan ve bazal lamina ile hemidesmozom benzeri bağlantılar kurmasını sağlamaktadır (Franca ve ark., 2011; Pelletier, 2011).

Mikrotübüller ise Sertoli hücrelerinde fazla miktarda olup Sertoli hücrelerinin bazal laminadan seminifer epitel lümenine kadar uzanmış olan kolon benzeri yapısını korumada yardımcı olmaktadır. Sertoli hücrelerinde önemli ölçüde yer alan bu yapılar spermatogonik serinin hareketini düzenlediği yani gelişen germ hücrelerinin bazal kompartmandan adlüminal kompartmana taşınmasında ve spermiyasyon sırasında da rol almaktadır ve Sertoli hücrelerinin bu bölgelerinde yoğun bir şekilde bulunmaktadır (Xiao ve ark., 2014).

Sertoli hücrelerinin bağlantıları ve kan testis bariyerinde de bir kısmını oluşturan çeşitli bağlantı proteinleri tanımlanmıştır. Bu proteinler okludin, klaudin, zonula okludens (ZO) ve bağlantısal adezyon molekülleri (JAM) dir (Cheng ve ark., 2004a; Mok ve ark., 2014). Okludin, klaudin-11 ve JAM-1 transmembran proteinlerdir ve bunların ekstraselüler bölümleri sıkı bir bağ kuracak şekilde komşu Sertoli hücrelerinin arasında bağlantı kurmaktadır. Hücrelerin sitoplazmasında okludin, klaudin ve JAM moleküllerinin intraselüler kısımları, ZO-1 ve ZO-2 molekülleri ile birleşmiştir ve bunlar da aktin zincirlerine bağlanmışlardır (Wen ve ark., 2017) (Şekil 2.1) .

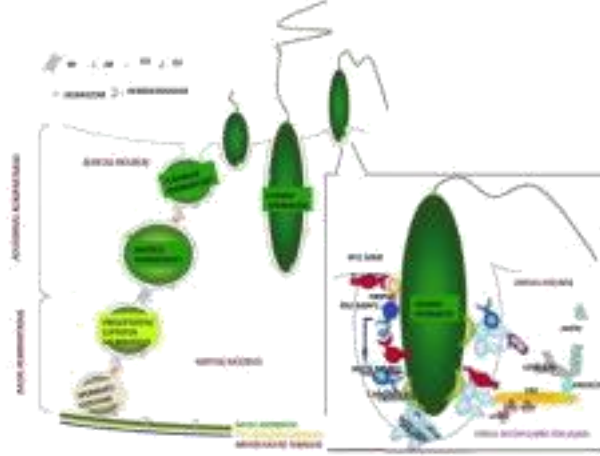
Sertoli hücrelerindeki aktin filamanlar ektoplazmik yapılarda yoğun bir şekilde bulunurlar. Ektoplazmik yapılar aktin bağlantılı intraselüler bağlantılardır. Sertoli hücrelerinin iskeletinde bulunan diğer yapılar gibi aktin filamanlar da spermatogenezde ve özellikle spermiyasyonda önemli rol oynarlar.

Ektoplazmik özelleşmeler testise özgü bir aktin bazlı adherent bağlantıdır. Testislerde bazal EÖ ve apikal EÖ olmak üzere iki tip EÖ bulunur. Bazal EÖ, BTB'deki komşu Sertoli hücreleriyle sınırlıdır; apikal EÖ ise Sertoli hücreleri ve uzayan spermatidlerle sınırlıdır (Wong ve ark., 2008).

Apikal EÖ adherent bağlantı (Adherent junction), fokal adezyon kinaz (FAK), sıkı bağlantı (Tight Junction) ve aralıklı bağlantı (Gap Junction) özelliklerine sahip bir hibrit bağlantı tipidir (Cheng ve ark., 2002; Dolores D Mruk ve ark., 2004b).

Apikal EÖ'de TJ (örneğin, CAR, JAM-C), FAK (örneğin integrinler , lamininler), aralıklı bağlantı (örneğin, connexin 43) ve AJ (örneğin nektinler, afadinler) proteinlerinin varlığının önemli olduğu bilinmektedir (Yan ve ark., 2007). Spermatogenezde germ hücre hareketi sırasındaki bağlantıların yeniden yapılandırma olaylarını kolaylaştırır ve bu nedenle, apikal EÖ, gelişmekte olan spermatid-Sertoli hücre arayüzündeki tek bağlantı tipi olmasına rağmen, yapışma (örneğin, AJ), iletişim (örneğin, GJ), hücre hareketi (örneğin, FAK) ve hücre polaritesi (TJ) gibi özelliklerin hepsini bir arada bulundurması açısından oldukça önemlidir (Wong ve ark., 2008).

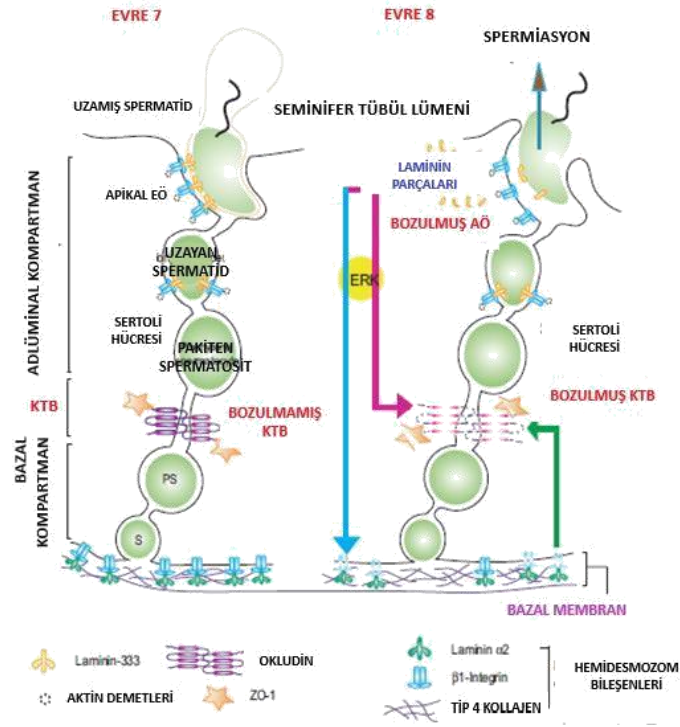
Bazal EÖ'nin yapısı ise temel olarak apikal EÖ ile aynıdır, ancak aktin filament demetleri ve endoplazmik retikulum sisternaları iki bitişik Sertoli hücrelerinin her iki yanında bulunur. Ek olarak, BTB'de dezmozom benzeri bağlantılar, aralıklı bağlantılar (GJ) ve sıkı bağlantılar (TJ) ile birlikte bulunurlar (Pelletier, 2001) (Byers, 1993).



Şekil 2. 2. Seminifer epitelde bulunan ektoplazmik özelleşmenin moleküler mimarisi (Siu ve ark., 2004)

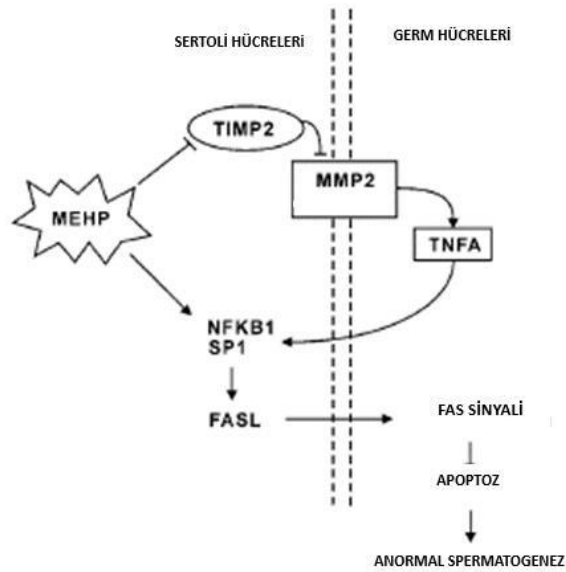
Fizyolojik süreçte kan testis bariyerinin eş zamanlı olarak meydana gelen açılıp kapanma mekanizmasının bilinmemesi üzerine yapılan çalışmada laminin zincirlerinin seminifer epitelde *in vivo* olarak oluşturulduğu mekanizma bilinmemektedir. Fakat son yıllarda bu alanda yapılan çalışmalarda laminin 3 zincirinin MMP-2 için substrat olduğunu göstermiştir (Siu ve ark., 2004) (Şekil 2.2.).

Ayrıca MMP-2'yi aktive ettiği bilinen membran tip 1 MMP (MT1)-MMP VE TIMP-2 apikal ES'de lokalizedir ve $\beta 1$ integrin/laminin $\gamma 3$ kompleksi ile ilişkilidir. Spermiyasyon sırasında MMP-2'nin MT1-MMP/TIMP-2 kompleksi tarafından aktivasyonunun apikal EÖ'de spesifik laminin zincirlerinin proteolitik parçalanmasına yol açtığı ve biyolojik olarak aktif laminin fragmanları üretir. Bu fragmanlar da kan testis bariyerindeki okludin seviyelerini önemli ölçüde azaltır ve bazal membranda bulunan hemidezmozomlardaki integrin seviyesini düşürür ve bunun sonucunda da kan testis bariyeri kararsızlaşır (Yao ve ark., 2010a) (Şekil 2.3.).



Şekil 2. 3. Kemirgenlerde kan testis bariyerinin açılıp kapanma mekanizması (Yao ve ark., 2010a)

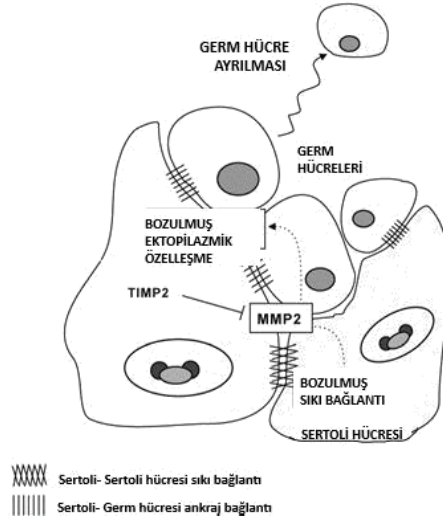
2.1.2. Kan-Testis Bariyerinin Yıkılıp, Yeniden Oluşma Mekanizmasının Düzenlenmesi



Şekil 2. 4. MEHP kaynaklı Sertoli hücre hasarının sonucunda meydana gelen germ hücre apoptoz mekanizması (Yao ve ark., 2009b)

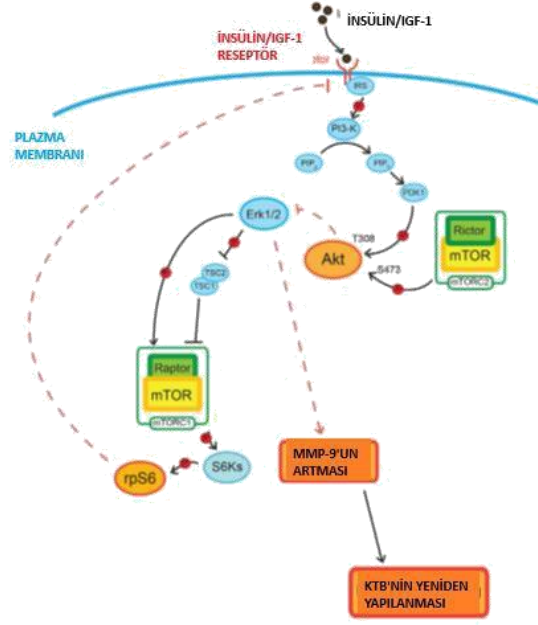
Yao. ve arkadaşlarının 2009 yılında yaptığı çalışmada MEHP'nin maruziyetinin TIMP-2 nin Sertoli hücresinde ekspresyonunu azalttığı ve MMP-2'nin aktivasyonunu sağladığı gösterilmiştir. Artan MMP ekspresyonu TNFA'nın ve NFkB seviyelerinde artışa bu artışta FASL seviyesinin artışına neden olmaktadır. Artan FASL protein seviyesi klasik ölüm reseptör yolunu aktive eder ve FAS pozitif germ hücrelerinin apoptozunu tetikler. Bu bilgiler birlikte ele alındığında, testiste TIMP:MMP oranındaki değişimin, peripubertal testis gelişiminin kritik döneminde Sertoli hücresinin destekleyici kapasitesinin azalmasına yanıt olarak germ hücrelerinin apoptoz'a uğramalarının kritik bir mekanizma olduğunu göstermektedir (Yao ve ark., 2009a) (Şekil 2. 4.).

Kan-testis bariyerinin açılıp kapanma mekanizmasında Tissue Inhibitors of Metalloproteinase-2 (TIMP-2) ve Matriks Metalloproteinaselardan, MMP-2 ve MMP-9 önemli rol oynamaktadır (Yao ve ark., 2009b, 2010b). Testiste; MMP ve TIMP ekspresyonları arasındaki denge, özellikle patolojik durumlarda Sertoli hücrelerinin germ hücrelerini desteklemelerinin kontrolünde anahtar role sahiptir (Liu ve ark., 2016). TIMP-2; Sertoli hücrelerinden salınmaktadır ve MMP-2 aktivasyonunu baskılayarak kan-testis bariyerinin sıkı bağlantılarla kapalı şekilde kalmasını sağlamaktadır (Yao ve ark., 2010b) (Şekil 2.5). MMP-2'nin aktivasyonu Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantıların bozulmasına ve germ hücrelerinin ektoplazmik özelleşmelerinin de bozularak tübül lümenine erken salınımına sebep olmaktadır (Yao ve ark., 2010b) (Şekil 2.5).



Şekil 2. 5. Sertoli Hücrelerinde TIMP-2 ve MMP-2'nin Kan-Testis Bariyeri ile İlişkisi (Yao ve ark., 2010b).

Bununla birlikte başka bir matriks metalloproteinaz olan MMP-9'unda kan testis bariyeri yıkımı ve yeniden kurulmasında rolü olduğu bilinmektedir. MMP-9 aktivasyonunun artışı kan-testis bariyerinin yıkımını sağlamaktadır. Hücre büyümesi ve metabolizmasında önemli rolleri olan mTOR sinyal yolağının da kan-testis bariyerinin yıkılıp yeniden kurulmasında önemli bir role sahip olduğu gösterilmiştir. mTOR sinyal yolağı aktivasyon belirteci olan p-p70S6K proteininin kan-testis bariyerinin yapısında sıkı bağlantı molekülleri ile birlikte lokalize olduğu bilinmektedir (Mok ve ark., 2014). Mok ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada, IGF/İnsülin aktivasyonunun Akt fosforilasyonu aracılığı ile MMP-9 aktivasyonunu baskıladığı gösterilmiştir (Mok ve ark., 2014). Bu çalışmada, p-p70S6K aktivasyonu sonucunda AKT fosforilasyonunun baskılandığı ve MMP-9'un aktive olduğunu gösterilmiştir (Mok ve ark., 2014). MMP-9'un aktivasyonu Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantıların bozulmasını ve kan-testis bariyerinin yıkılmasını sağlamaktadır. Bu sonuçlar mTOR sinyal yolağı aktivasyonunun kan-testis bariyeri dinamiğinin sağlanmasında rol oynadığını göstermektedir (Şekil 2. 6) (Mok ve ark., 2014).



Şekil 2. 6. Kan-testis bariyerinin yıkılıp yeniden oluşumunda mTOR sinyal yolağının rolü (Mok ve ark., 2014)

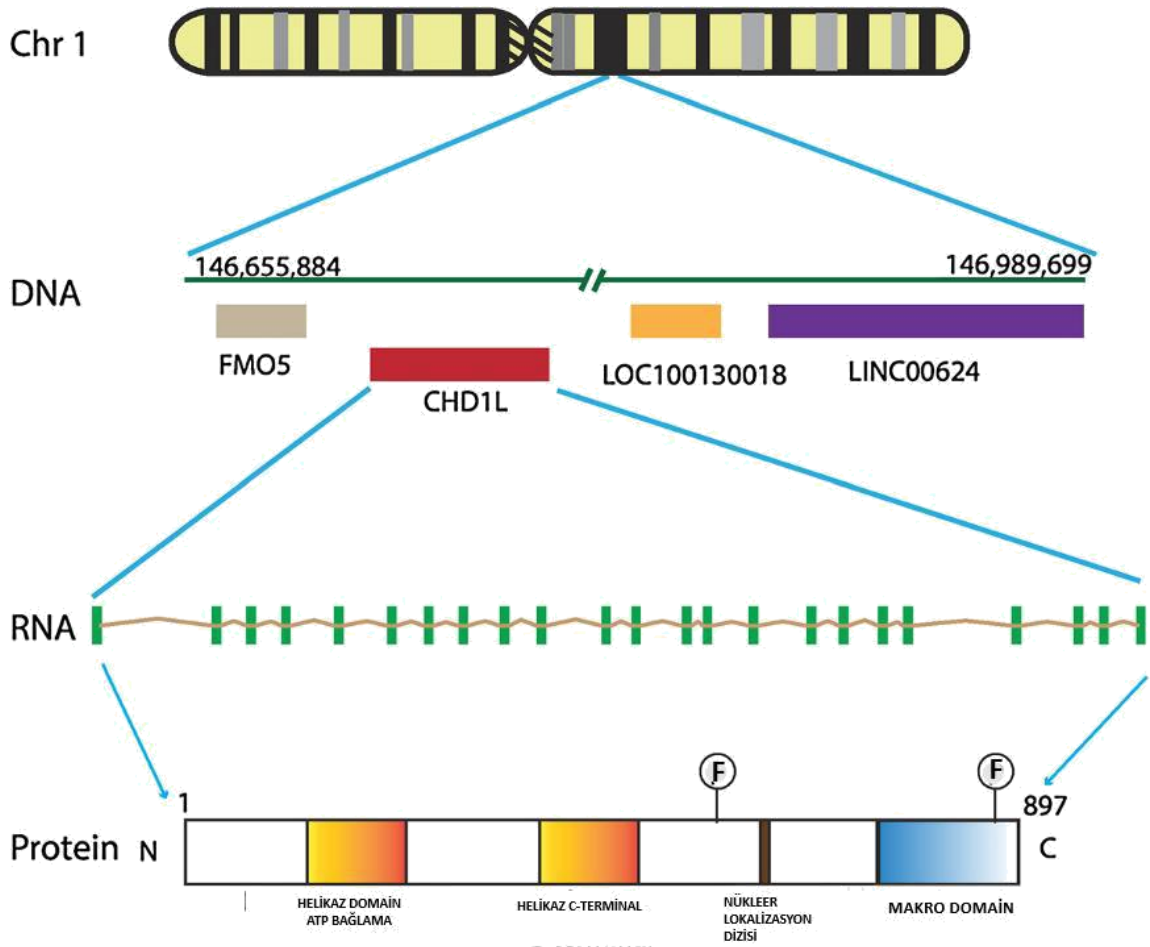
2019 yılında yapılan ve fare Sertoli hücrelerinde MEHP'nin etkilerinin transkriptom profillemesi ve yolak analizlerinin araştırıldığı bir çalışmada, yapılan KEGG analizi sonucunda ilk 3 yolak olarak fokal adezyon, aktin hücre iskeletinin düzenlenmesi ve ECM reseptör etkileşimi sonucu çıkmıştır (Wang ve ark., 2019). Bu çalışma Sertoli hücrelerinde düşük doz MEHP'nin düşük dozunun etkilerinin aracılık ettiği fokal adezyon, aktin iskeletinin düzenlenmesi ve ECM reseptör etkileşimi ile ilişkili genlerini rollerini destekleyen sonuçlar sunmaktadır. Ektoplazmik özelleşmeler hücre şeklini ve Sertoli hücreleri arasındaki bağlantıları koruyan özel ve önemli yapılardır. Daha önce Yao ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmalarda (Yao ve ark., 2009a) (Yao ve ark., 2010b) MEHP'nin Sertoli hücreleri ile spermatogenik hücreleri arasındaki ektoplazmik özelleşmeleri yok edebildiği ve olgunlaşmamış germ hücrelerinin seminifer tübüle salınmasına neden olduğu da bu çalışmada bahsedilmiştir. Bu bilgiler de MEHP'nin ECM-reseptör etkileşimini, fokal adezyonları, hücreler arası bağlantıları ve Sertoli hücreleri ile spermatogenik hücreler arası bağlantıları bozarak seminifer epitelden spermatogenik hücre kaybına neden olabileceğini göstermektedir (Wang ve ark., 2019).

Bu çalışmada ayrıca MEHP'nin farklı dozlarda etkileri de araştırılmıştır. Hormesis kavramı düşük dozda bir stimülasyon ve yüksek dozda ise bir inhibisyon olduğu bir doz-

yanıt ilişkisini tanımlar (Calabrese ve ark., 2001). Bu kavramdan da yola çıkarak elde edilen sonuçlar Sertoli hücrelerinde MEHP'nin hormetik benzeri bifazik doz-yanıt ilişkisini göstermektedir. MEHP'nin toksisitesinin mekanizmalarının, çok sayıda farklı gen, hücresel süreç ve sinyal yollarını içeren üreme, gelişme ve metabolizma üzerindeki etkileri de dahil olmak üzere karmaşık olduğunu göstermiştir (Wang ve ark., 2019).

2.2. CHD1L ve Roller

ALC1 (amplified in liver cancer 1) olarak da bilinen 2008 yılında insan hepatoselüler karsinomda tanımlanan *CHD1L* (Kromodomain helikaz/ATPaz DNA bağlanma protein 1 benzeri) geninin genomik lokusu 53,152 baz çifti uzunluğunda olan Kromozom 1'in uzun kolu üzerinde bulunur ve 23 ekzon içerir (Ma ve ark., 2008). Snf2 (Sucrose Non-Fermentable-2) ailesinin SNF2 benzeri alt ailesine aittir. *CHD1L* geninin upstreaminde FMO5 (flavin containing monooxygenase 5) geni ve downstreaminde ise LOC100130018 (prostaglandin reductase pseudogene) ve LINC00624 (long intergenic noncoding RNA 624) genleri vardır. *CHD1L*'nin tam uzunlukta mRNA'sı, 897aa proteini kodladığı varsayılan 2.980 baz çiftinden (son veritabanında 3.036 bp) oluşur (Ma ve ark., 2008). Protein dizilimi analizinde ise CHD1L bir helikaz süper aile domaini ve korunmuş bir SNF2_N domaini içeren SNF-2-benzeri ailesine ait olan makro domain içerir (Ma ve ark., 2008). CHD1L, altı transkript varyantı ile kopyalanabilen 23 ekzon (yeşil çizgiler) içerir. Bu altı transkript varyantı hücresel içeriğe bağlı olarak hem kodlayıcı hem de kodlayıcı olmayan moleküller olarak işlev görebilecek bir kodlayıcı RNA örneğidir (Derrien ve ark., 2012). CHD1L proteini iki sarmal alandan (sarı renk), bir C-terminal makro alandan (mavi renk) ve nükleer lokalizasyon dizisinden (NLS, kahverengi) oluşur. Proteinin C-terminalinde iki adet fosforilasyon bölgesi vardır (Şekil 2. 7.) (Cheng ve ark., 2013).



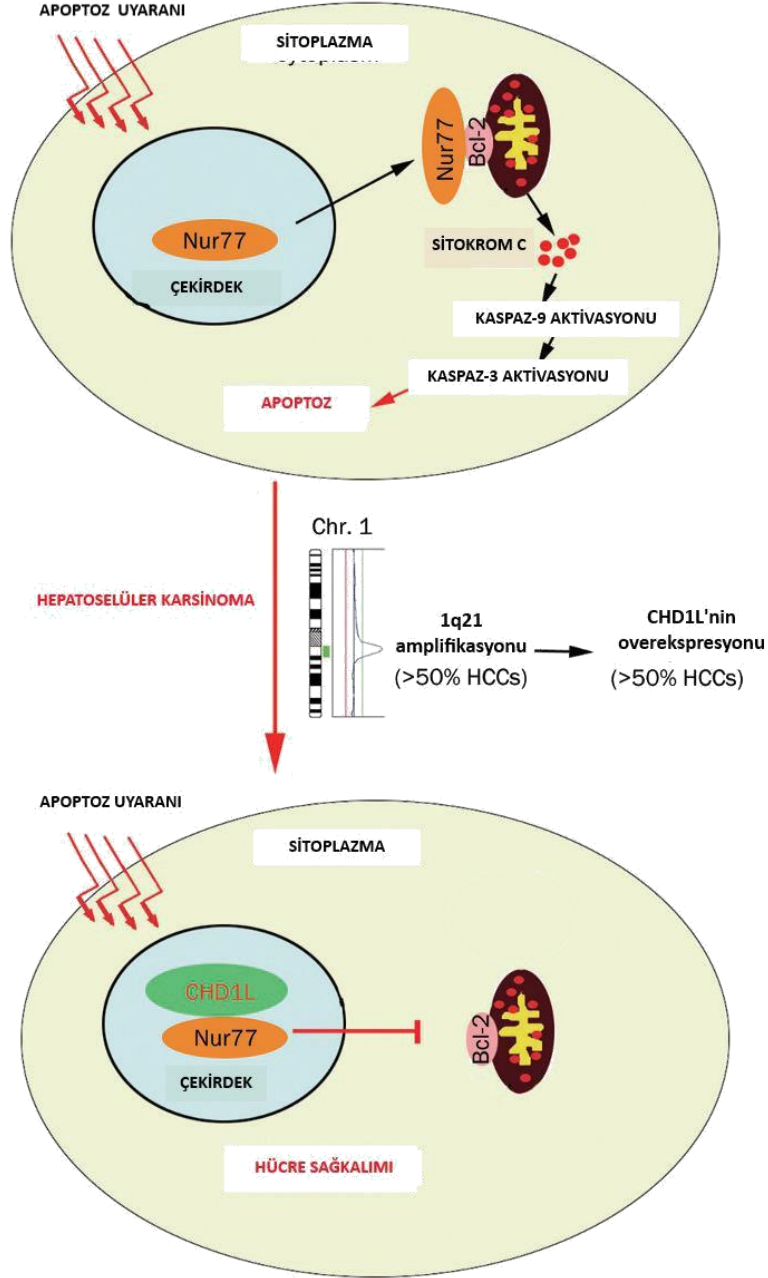
Şekil 2. 7. *CHD1L* geninin genomik yapısı (Cheng ve ark., 2013)

CHD1L, hepatoselüler karsinomda (HCC) sıklıkla 1q21'de yer alan yeni tanımlanmış bir onkogendir (Ma ve ark., 2008). *CHD1L*, *CHD1* protein yapısına benzer bir moleküler yapıya sahip olduğundan *CHD1* protein ailesinin kromo alanlarının ve SNF2 ile ilgili helikaz/ATPaz alanlarının varlığından dolayı *CHD1L* transkripsiyonel regülasyon, kromozom bütünlüğünün korunması ve DNA onarımında önemli roller oynadığı varsayılmaktadır. *CHD1L*, *CHD1*'den farklı olarak ADP-riboz / PAR bağlayıcı bileşen içeren bir makro alan içerir . Bu özelliğinden dolayı *CHD1L*, PAR-bağımlı bir kromatin yeniden şekillendirme aktivitesine sahiptir ve kromatin bağlamında DNA onarım reaksiyonlarını kolaylaştırır (Ahel ve ark., 2009).

2008 yılında yapılan çalışmada *CHD1L*'nin insan tümörjenezindeki fonksiyonel rolü ilk olarak bu çalışmada tanımlandı ve *CHD1L* ile transfekte edilmiş hücrelerin soft agarda

daha fazla koloni oluşturabildiğini ve nude farelerde tümör oluşumuna neden olduğunu gösterildi; CHD1L'nin transformasyon kabiliyeti, CHD1L'ye karşı siRNA ile etkili bir şekilde inhibe edildi; CHD1L'nin, G1 / S geçişini desteklediği ve hücrel strese cevap olarak apoptozu inhibe edebildiği sonuçları elde edilmiştir (Ma ve ark., 2008).

Chen ve arkadaşları CHD1L'nin anti-apoptotik kabiliyetinin, p53 bağımsız bir apoptotik yolun kritik bir üyesi olan Nur77 ile olan etkileşimi ile bağlantılı olduğu bulundu . Normal durumda, Nur77 çekirdeğin içinde yerleşir. Apoptoz uyaranlarına cevap olarak Nur77, çekirdekten sitoplazmaya geçer ve Bcl-2'ye bağlandığı mitokondriye geçiş yapar ve sitokrom c (Cyt c) salınımı indükler. Böylece, kaspaz aktivasyonunun ve apoptozun başlamasına yol açar. Hepatoselüler karsinomda ise 1q21 amplifikasyonunun neden olduğu aşırı eksprese edilen CHD1L, Nur77'nin nükleus-mitokondri translokasyonunu inhibe eder, sitokrom c (Cyt c) salınımını engelleyip, kaspaz aktivasyonunun ve apoptozun engellenmesine neden olur.(Chen ve ark., 2009) (Şekil 2. 8.).

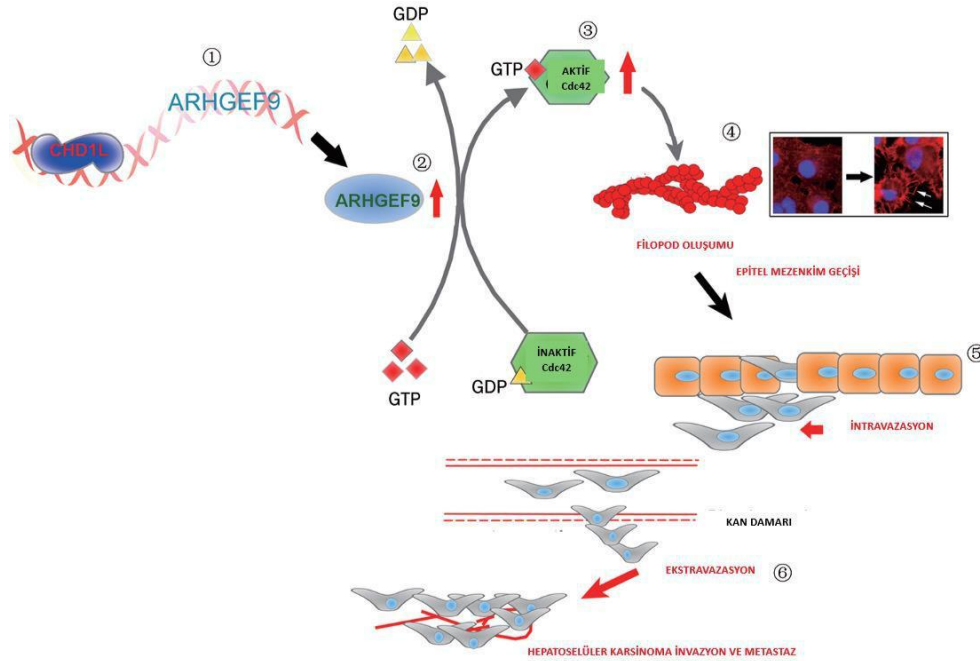


Şekil 2. 8. Hepatokarsinogenez sırasında Nur77 aracılı yoldaki CHD1L'nin rolü (Chen ve ark., 2009)

CHD1L, ARHGEF9 aracılı Cdc42 aktivasyonunu sağlayarak, hücre hareketliliğini arttırmakta, filopod oluşumunu ve epitelyal mezenkimal geçişi (EMT) sağlamakta ve bunun sonucunda kanser hücrelerinin migrasyonunu, invazyonunu ve metastazını sağlamaktadır. HCC ilerlemesi sırasında, CHD1L aşırı eksprese edilir ve bir protein-DNA etkileşimi ile ARHGEF9 transkripsiyonunu aktive eder. CHD1L, ARHGEF9'un

upregülasyonu yoluyla Rho GTPase proteini Cdc42'ye (Cdc42-GTP'nin artmış seviyesi) uygulanan GTP yüklemesini artırır. CHD1L / ARHGEF9 ile indüklenen Cdc42 aktivasyonu, aktin hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi ve beraberindeki epitelyal mezenkim geçiş fenotipinin bir özelliği olarak daha fazla filopod oluşumuna yol açar. CHD1L'ye bağımlı epitelyal mezenkim geçişi, hücre-hücre teması kaybı, bazal membrana (BM) nüfuzu ve tümör hücrelerinin kan dolaşımına (intravazasyon) girmesi ve sonuçta tümör hücrelerinin büyümesini içeren sıralı bir işlemle sonuçlanır. Son olarak karaciğerde ikincil bölgelerde tümör hücrelerinin büyümesi (intrahepatik metastazlar veya mikrosatellit oluşumu) veya yeni organlarda uzak metastazlar görülmeye başlar (Chen ve ark., 2010) (Şekil 2. 9.).

Hepatoselüler karsinom ilerlemesi ve metastazı sırasında CHD1L / Nur77 ve CHD1L / ARHGEF9 / Cdc42 / EMT olmak üzere iki moleküler mekanizma tanımlanmıştır.



Şekil 2. 9. CHD1L'nin ARHGEF9 aracılı Hepatoselüler karsinomdaki rolü (Chen ve ark., 2010)

CHD1L, PI3K / Akt / ARK5 / mTOR / MMP sinyal yolunda önemli bir rol oynadığı CHD1L'nin meme kanserine etkisinin araştırıldığı çalışmada gösterilmiştir (Mu ve ark., 2015). Yapılan çalışmada kemotaksi ve yara iyileşme deneylerinde CHD1L upregüle olup, MCF-7 hücrelerinin göç yeteneğini arttırdı. MMP'ler tümör invazyonunda önemli bir

rol oynar, çünkü ekstraselüler matriks ve bazal membranların bozulmasındaki anahtar faktörlerdir MMP-2 ve MMP-9, MMP ailesinin üyeleridir ve meme kanserinde upregüle olurlar (Liu ve ark., 2012). Daha önce yapılmış çalışmalar MMP'lerin AKT sinyalleşmesine dahil olduğunu göstermiştir (Chetty ve ark., 2010; Chien ve ark., 2010). Ser 600'de Akt-bağımlı fosforilasyonun, ARK5 aktivasyonunu indüklediği. Akt, ARK5 ve mTOR'un fosforilasyonu, EGF stimülasyonu ile CHD1L'nin downregüle olduğu hücrelerde önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir. Meme kanseri invazyon ve metastazına CHD1L'nin etkisinin altında yatan muhtemel bir moleküler mekanizmanın PI3K / Akt / ARK5 / mTOR sinyal yolunun olduğu gösterilmiştir (Mu ve ark., 2015).

CHD1L'nin farklı dokularda farklı rollere sahip olduğu da bilinmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda CHD1L'nin kanserde, kök hücre pluripotensisinde (Jiang ve ark., 2015), embriyonik kök hücrelerin kendilerini yenilemeleri ve farklanmalarında (Saladi ve de la Serna, 2010), hücre siklusunda (Snider ve ark., 2013), memeli gelişiminin erken evrelerinde (Wang ve ark., 2004) ve spermatogonyal kök hücre gelişiminde rolleri olduğu bildirilmiştir (Liu ve ark., 2016).

2.2.1. CHD1L'nin Testisteki Rolü

CHD1L'nin üreme sistemindeki olası rolleri hakkında literatürde oldukça sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Diğer yandan erkek üreme sistemindeki rolünü doğrudan araştıran 2016 yılında yapılan bir çalışmada, CHD1L'nin mRNA seviyesinin yenidoğan ve erişkin farelerde testis dokusunda diğer dokulara (kalp, karaciğer, böbrek, mide) oranla daha fazla olduğu gösterilmiştir (Liu ve ark., 2016). Bu sonuçtan yola çıkarak CHD1L'nin testiküler gelişimdeki rollerinin detaylı olarak değerlendirildiği bu çalışmada CHD1L'nin testiste doğumdan erişkin döneme doğru protein ekspresyonunun arttığı, hücre lokalizasyonuna bakıldığında yenidoğanda gonositlerde, erişkinde ise spermatogonyumlarda ve Sertoli hücrelerinde lokalize olduğu gözlenmiştir (Liu ve ark., 2016). CHD1L'nin farklanmamış spermatogonyal kök hücre belirteçleri (*Plzf*, *Gfra1*, *Oct4*) ile birlikte lokalize olduğu gösterilmiştir (Liu ve ark., 2016). CHD1L'nin baskılanması durumunda kök hücre belirteçlerinin (*Plzf*, *Gfra1*, *Oct4*) ekspresyonlarının azaldığı, bununla birlikte kök hücrelerin koloni oluşturma ve proliferasyon özelliklerinin azaldığı, apoptoz seviyelerinin ise arttığı gözlenmiştir (Liu ve ark., 2016). GDNF (Glial Cell Derived Neurotrophic

Factor), Sertoli hücrelerinden salınan spermatogonyal kök hücrelerin sağ kalımı ve kendini yenilemelerinde çok önemli bir faktördür. Fare spermatogonyal kök hücrelerinin GDNF varlığında kültüre edildiklerinde CHD1L ekspresyonunun arttığı ve kültür ortamından GDNF çıkarıldığında ise CHD1L'nin ekspresyonunun azaldığı gözlenmiştir (Liu ve ark., 2016). Ayrıca, CHD1L'nin baskılandığı durumda, GDNF bağımlı moleküllerin (*Bcl6b*, *Lhx1*, *Etv5*, *Pou3f*) ekspresyonlarının azaldığı gösterilmiştir (Liu ve ark., 2016). Tüm bu sonuçlar, CHD1L'nin spermatogonyal kök hücre gelişiminde (hücrelerin kendilerini yenilemelerinde) önemli bir role sahip olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada, CHD1L'nin Sertoli hücrelerinde de eksprese olduğu ancak rolünün araştırılması gerektiği de belirtilmiştir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları

Akdeniz Üniversitesi ‘‘Deney Hayvanları Ünitesi’’ tarafından sağlanan ve standart laboratuvar koşullarında beslenen 48 adet BALB/c ırkı yetişkin (5 haftalık) erkek fare kullanıldı. Kan testis bariyerinin bozulmasını sağlamak amacı ile erişkin farelere oral gavaj yolu ile MEHP uygulandı. Çalışma için aşağıdaki gruplar oluşturuldu.

1. MEHP Grubu: Bu gruptaki erişkin farelere 1gr/kg MEHP 300 µl mısır yağı içerisinde çözülerek tek doz uygulandı. Uygulandıktan 6 (n=6), 12 (n=6), 24 (n=6) saat sonra testis dokuları elde edildi.
2. Taşıyıcı grubu: Bu gruptaki erişkin farelere 300 µl mısır yağı tek doz uygulandı. Uygulandıktan 6 (n=4), 12 (n=6), 24 (n=6) saat sonra testis dokuları elde edildi.

3.2. Doku Takibi ve Kesit Alma

Doku takibi için alınan testis dokuları fiksasyon için Bouin fiksatif ile +4 °C’de gece boyu bekletildi. Artan dereceli alkol serilerinden ve ksilolden geçirilerek parafin bloklar hazırlandı. Hazırlanan parafin bloklardan 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Her gruptan elde edilen testis dokularına kan-testis bariyerinin yıkıldığını göstermek amacı ile PAS-H boyanması ile histopatolojik değerlendirme yapıldı ve western blot tekniği ile β1-integrin protein ekspresyonu değerlendirildi. Deney modelinin oluştuğu gösterildikten sonra immünohistokimya tekniği ile CHD1L, MMP-2, TIMP-2, MMP-9 proteinlerinin lokalizasyon analizleri yapıldı.

3.3. PAS-H Boyanması

Testis dokuları Bouin fiksatif ile fikse edildi ve dereceli alkollerden ve ksilolden geçirilerek parafin bloklar hazırlandı. Parafin bloklardan 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitlerden parafin giderildi ve alkollerden geçirilerek sulandırıldı. Daha sonra musluk suyundan geçirilerek ve %1’lik periyodik asitte (H₅IO₆) 10 dakika oksadize edildikten sonra akan musluk suyunda 5 dakika yıkandı. Ardından Schiff’in kimyasalına 10 dakika daldırılarak ve her biri 2’şer dakika 3 değişim olmak üzere M/20 (% 0.52) NaHSO₃ ‘ten geçirildi. Bu işlemde sonra akan musluk suyunda 10 dakika yıkandı, asit hemalum ile 6 dakika boyandı. Boyanma işleminden sonra kesitler musluk suyunda

yıkandı. İkişer değişimli %95 ve %100 alkol içinde suyu giderilerek, %100 alkol-ksilen 1:1 oranında ve 2 değişim olacak şekilde ksilen içinde saydamlaştırıldı ve entellan ile kapatıldı.

3.4. Testis Değerlendirmesi (Johnsen Kriterleri)

Germinal epitelin matüritesi modifiye Johnsen testiküler biyopsi skoru kullanılarak değerlendirildi (Tablo 3.4). X40 büyütme kullanılarak 100 adet tübül her bir doku kesitinde değerlendirilerek, her bir tübüle 1 ile 10 arasında bir skor verildi, 100 tübülün ortalama skoru Ortalama Testis Biyopsi Skoru (OTBS) olarak kaydedildi.

Tablo 3.4. Johnsen skor değerlendirmesi

SKOR	
10	Germinal epitelin santral lumen çevresinde çok katlı yapıda olması, lümenin açık ve çok sayıda spermatozoon içeriyor olması
9	Germinal epitel görülmekle birlikte lümeni tıkayabilecek önemsiz miktarda döküntü, tıkalı lümende spermatozoon ve döküntü epitel görülmesi
8	Germinal epitelin çok tabakalı olması ancak lümende 10'dan az sayıda spermatozoon bulunması
7	Çok sayıda spermatid olması ve hiç spermatozoon olmaması
6	Spermatozoon olmaması ve 10'dan az sayıda spermatid olması
5	Sadece spermatositlerin olması, spermatid ya da spermatozoonların hiç olmaması
4	Hiç spermatozoon ve spermatid olmaması ve 5'den az sayıda spermatosit varlığı
3	Germ hücreleri olarak sadece spermatogonium varlığı
2	Sadece Sertoli hücreleri olması ve hiç germ hücre olmaması
1	Seminifer tübül lümeninde hiç hücre olmaması

3.5. İmmünohistokimya Yöntemi

Testis dokuları Bouin fiksatif ile fikse edildi, dereceli alkollerden ve ksilolden geçirilerek parafin bloklar hazırlandı. Parafin bloklardan 5 µm kesitler alındı, ardından ksilol ve alkol serilerinden geçirilip kesitler distile suya alındı. Daha sonra antijen retrieval uygulaması yapıldı (sitrik asit solüsyonunda 700 watt'ta 7 dakika boyunca kaynatıldı) ve 20 dakika oda ısısında soğumaya bırakıldı. Distile suda yıkama gerçekleştirdikten sonra dokuda endojen peroksidadz aktivitesini baskılamak için hidrojen

peroksit solüsyonu (63ml metanol+7ml hidrojen peroksit) ile kesitler 15 dakika muamele edildi. Bu işlemden sonra kesitler PBS (Phosphate Buffer Salin) solüsyonunda 3 kez 5'er dakika yıkandı. Bir sonraki adımda 'Ultra V Block' ile 7 dakika muamele edilerek sekonder antikorun non-spesifik bağlanma bölgeleri blokladı. Bloklama işleminden sonra primer antikorlar (CHD1L, MMP-2, TIMP-2 ve MMP-9) kullanma kılavuzlarında belirtilen dilüsyonlarda ve miktarlarda kesitler üzerine uygulandı. CHD1L ekspresyonu, sıçan ve insan testis kesitlerine de uygulanmıştır. Negatif kontrol için kullanılan kesitlere primer antikor ile aynı protein miktarında izotip kontrol uygulandı. Primer antikor uygulandıktan sonra +4 derecede gece boyu kesitler inkübe edildi. Ertesi gün PBS (Phosphate Buffer Salin) solüsyonunda 3 kez 5'er dakika yıkandıktan sonra sekonder antikor kesitler üzerine damlatıldı. Tekrar PBS solüsyonunda 3 kez 5'er dakika yıkanan kesitler streptavidin peroxidase solüsyonu ile 30 dakika oda ısısında inkübe edildi. İnkübasyondan sonra DAB (Di-Amino Benzidine) kromojeni uygulanarak reaksiyon görünür hale getirildi. Reaksiyonlar mikroskop altında görüntülendi ve değerlendirildi.

3.6. Western Blot Analizi

Taşıyıcı grubunda (6, 12, 24. Saat) ve MEHP gruplarından (6, 12, 24. Saat), alınan testis örneklerinde CHD1L ve β 1-integrin protein ekspresyonu western blot ile değerlendirildi.

3.6.1. Western Blot İçin Örneklerin Hazırlanması

Taşıyıcı ve MEHP grubundan 6, 12 ve 24 saat sonra alınan dokular ezilip tartıldı ve 0,2 gr doku başına 600 μ l Lysis Buffer, 10 μ l Proteaz inhibitör kokteyl (PIK) eklendi. Her bir tüp vortekslelendikten sonra sonikatör yardımı ile buz içerisinde örneklerin parçalanması gerçekleştirildi ve 1 saat buz içerisinde bekletildi. Lizatlar 15000 g de 10 dakika +4 $^{\circ}$ C santrifüj edilerek, elde edilen süpernatantlar yeni hazırlanan ependorf tüplerine alındı.

3.6.2. BCA (Bicinchoninic Acid) Protein Assay Kit ile Protein Miktarının Elde Edilmesi

-20 $^{\circ}$ C de bulunan süpernatantlar buz içinde muhafaza edildikten sonra BSA (Bovine Serum Albumin) oranı 1mg/1ml olacak şekilde 5mg/5ml distile su içerisinde hazırlandı. BSA için ependorf üzerine örnek sayısına göre S₀ dan başlayarak numaralandırıldı. S₀ numuneye mililitresinde 5 mg BSA'dan 1000 μ l konularak, diğer tüplere ise 500 μ l lysis

buffer eklendi. İlk tüpten 500 µl alınarak diğer tüpe ilave edildi ve böylece numune bir kez daha dilüe edilmiş oldu. Bu işlem diğer tüplere de aynı şekilde uygulandı. Çalışılan örnek sayısına göre standart-kör-numuneler 1/50 oranında ‘‘BCA Çalışma Solüsyonu’’ hesaplanıp hazırlandı. BSA standart hazırlarken her bir kuyucuğa 25 µl BSA + 200 µl BCA çalışma solüsyonu küçük hacim önce olacak şekilde eklendi. Kör hazırlarken ise her bir kuyucuğa 25 µl Lysis Buffer + 200 µl BCA çalışma solüsyonu küçük hacim önce olacak şekilde eklendi ve numuneler 25 µl 1/50 dilusyonlu örnek + 200 µl BCA çalışma solüsyonu küçük hacim önce olacak şekilde konuldu. 520 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçüm yapıldı.

Western Blot Protokolü

Proteinlerin kDA’larına göre jel hazırlandı. Her kuyucuğa eşit oranda olmak üzere örnekler yüklendi. Yüklemeden sonra elektroforez ile örnekler jel üzerinde elektriksel alanda yürütüldü. Ardından gece boyu blotlama yapılarak jel üzerindeki proteinler PVDF membrana aktarılması sağlandı. Blotlamadan sonra membranlar TBS-T(1X) solüsyonunda 4er tekrar 15 dakika olacak şekilde 1 saat yıkandı. Yıkama işleminin ardından primer antikor, süt tozu içerisinde hazırlandı ve gece boyu inkübe edildi. Daha sonra 3er tekrar 10 dakika olacak şekilde TBS-T(1X) solüsyonunda yıkandı. Yıkamadan sonra sekonder antikor süt tozu içerisinde hazırlanacak ve 1 saat boyunca membranlar sekonder antikorda inkübe edildi. Sekonder antikordan sonra 3er tekrar 10 dakika olacak şekilde TBS-T solüsyonunda yıkandı. Membranlar yıkandıktan sonra SuperSignal®WestPicoChemiluminescent Substrate ile 5 dakika muamele edildi. Daha sonra karanlık odada Hyperfilm cassette ile geliştirme yapıldı ve elde edilen western blot bantları İmage –J Programı ile (National Institutes of Health) ile değerlendirilerek rakamsal sonuçlara ulaşıldı ve gruplar arası karşılaştırma yapıldı.

3.7. Sertoli Hücre Kültürü

Fare Sertoli hücre hattı (Cat. No. 15p-1 (ATCC CRL-2618)) kullanıldı. Hücreler -80 °C’den çıkarıldıktan sonra çözünene kadar 32 °C’de su banyosunda bekletildi ve DMEM (Dulbecco’s Modified Eagle Medium) içerisine final konsantrasyonu %10 olacak şekilde FBS eklenerek complete growth medium hazırlandı. Hücreler çözüldükten sonra %70’lik alkol ile silindi ve 9 mL complete growth medium içerisine eklendi. 125g’de 5 dakika

santrifüj edildi ve süpernatant kısmı atıldı. Kalan pellet kısmı ise hazırlanan complete growth medium içerisine alındı ve 25 cm² flaska alındı ve 32°C’de %5 CO₂ olan inkübatörde inkübe edildi. Hücrelerin gelişimleri her gün sabah ve akşam olmak üzere mikroskopta gözlemlendi.

3.7.1. Hücre Çoğaltma (Subculturing) Aşamaları

Önceki kültür mediumu uzaklaştırılıp 3 mL DMEM ile 25 cm² olan flask yıkandı. 3 mL %25’lik tripsin-edta ile 7 dakika boyunca hücrelerin tutunduğu yüzeyden kalkmaları sağlandı. Tripsin-edta’nın etkinliğini durdurmak için 300 µL FBS eklendi. 125g’de 5 dakika santrifüj edildi ve hazırlanmış olan complete growth medium içerisine hücreler alındı. Hücrelerin çoğalmalarını sağlamak amacıyla daha büyük olan 75 cm² ‘lik flask kullanıldı. Hücreler mikroskopta kontrol edildikten sonra 32 °C olan inkübatöre alındı.

3.7.2 Hücre Lizatı Hazırlanması

Lizat için kullanılacak olan flasklardaki mediumlar toplandı. Daha önce hazırlanmış ve soğutulmuş olan PBS ile flasklar 2 tekrar olacak şekilde yıkandı. Scraper yardımı ile hücreler flask yüzeyinden kazınıp bir falkonda toplandı. Hücre lizatı için kullanılacak olan Cell Extraction Buffer oda ısısında sıvı hale gelmesi sağlandı. 5 mL Cell extraction buffer içerisine bir adet PİK tablet atıldı. Toplanan hücreler +4 °C’de 3200 rpm’de 5 dakika santrifüjlendi. Süpernatant kısmı atıldı, pellet kısmı pipetaj yapılarak karıştırıldı. Hazırlanmış olan cell extraction buffer ve pik karışımından 1000 mL alınarak pelletle pipetaj yardımı ile karıştırıldı. Buz içerisine alınıp 10 dakika aralıklarla 3 tekrar olacak şekilde vortekslendi. Bu solüsyon ependorfa alındı ve +4 °C 13000 rpm’de 10 dakika santrifüjlendi. Süpernatant kısmı -20 °C’de muhafaza edilmek üzere temiz bir ependorfa alındı. Western blot protokolü ile CHD1L ekspresyonu değerlendirildi.

3.7.3 İmmü Floresan Boyama

2. pasaj sonunda hücre sayısı çoğaltılan Sertoli hücreleri 48 bölmeli well plate’e alınmak üzere 75 m² ‘lik flask yüzeyinden kalkmaları için Tripsin-EDTA ile 5 dakika boyunca muamele edildi. Bu sırada 48 bölmeli wellere yuvarlak lameller ve hücreleriniyuvarlak lamel yüzeyine tutunmaları için 400 µl FBS eklenerek 15 dakika boyunca 32°C’lik inkübatörde inkübe edildi. 15 dakikalık süre sonunda FBS çekilip yerine complete growth medium içerisine alınmış olan hücreler wellere 500 µl olarak ekildi ve mikroskopta

gözlendi. Ertesi gün tekrar gözlenen hücrelerin yüzeye tutunmaları ve morfolojileri kontrol edildi. Deney gruplarını oluşturmak üzere 12 ve 24 saat olmak üzere iki farklı saat dilimi ve MEHP dozu için ise 200 μ M ve 400 μ M olarak belirlenen dozlar uygulandı. MEHP için çözügen olarak complete growth medium kullanıldı. MEHP uygulandıktan sonra 12 saat MEHP ile muamele olmuş hücrelerden MEHP uzaklaştırıldı ve PBS ile yıkandı. Hücreleri fikse etmek için ise %4'lük PFA kullanıldı, hücreler 30 dakika boyunca %4'lük PFA ile fikse edildi. Fiksasyon işleminden sonra 5 dakika PBS ile hücreler yıkandı ve immünfloresan deneyi için kullanılmak üzere hazırlandı. Aynı işlemler 24 saat grubunda da tekrarlandı ve immünfloresan boyama gerçekleştirildi.

PBS-T ile yıkanan hücreler blocking buffer ile 45 dakika bloklandı ve bloklama işleminden sonra +4'de gece boyu olmak üzere 1/500 dilüsyonda CHD1L antikoru ile boyandı. Ertesi gün 3x5 PBS-T ile yıkama gerçekleştirildi. Yıkama işleminden sonra Alexa Fluor 488 (FITC) ile 1/500 dilüsyonda 90 dakika oda ısısında inkübe edildi. Sekonder antikor aşamasından sonra 3 tekrar olacak şekilde 5 dakika boyunca PBS-T ve sonrasında 5 dakika PBS ile hücreler yıkandı. 1 dakika DAPI (çekirdek) boyanması yapıldı ve ardından kapatma solüsyonu (mounting medium) ile kapatıldı. Kapatma işleminden sonra İmmünfloresan mikroskopunda boyanmalar değerlendirildi.

Pozitif kontrol olarak HELA hücresi kullanılırken, izotip kontrol olarak da Rabbit IgG kullanıldı.

3.8. İstatistiksel analizler

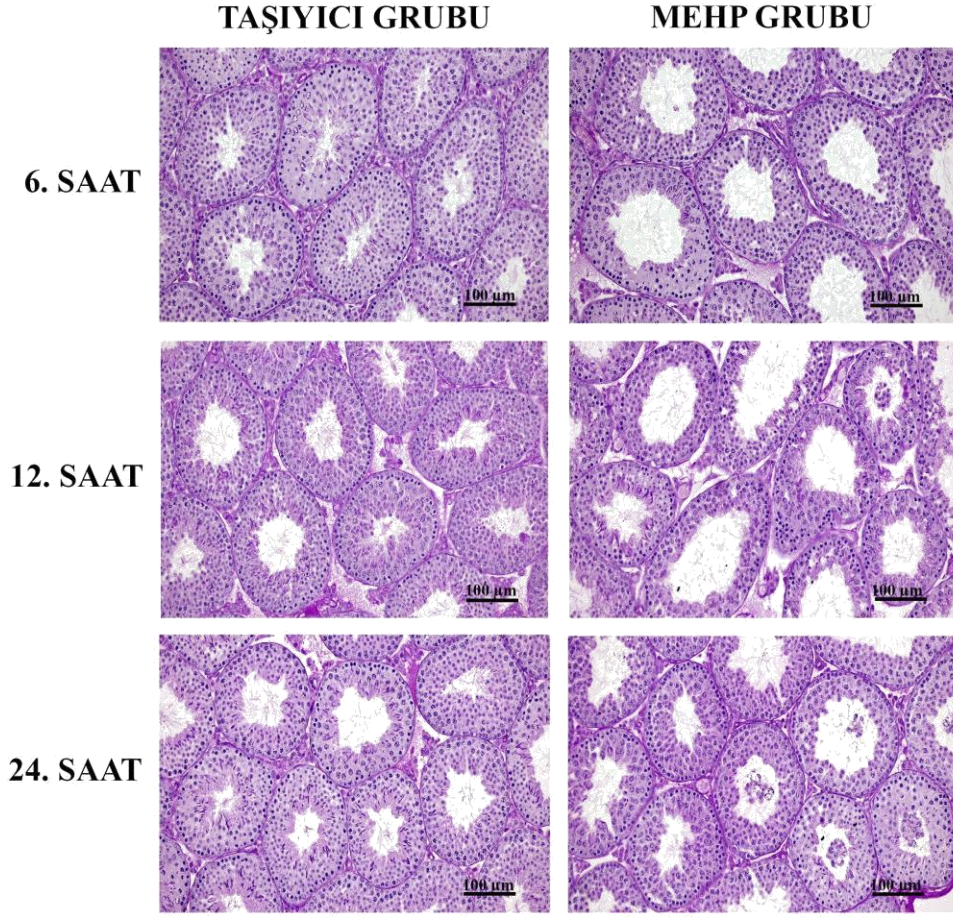
6, 12 ve 24 saat taşıyıcı ve MEHP gruplarında testis değerlendirilmesi sonucu 'Mann-Whitney Rank Sum' testi ile değerlendirildi.

Western blot analizleri için gruplar arasındaki fark 'Student's t' testi ile değerlendirildi.

4. BULGULAR

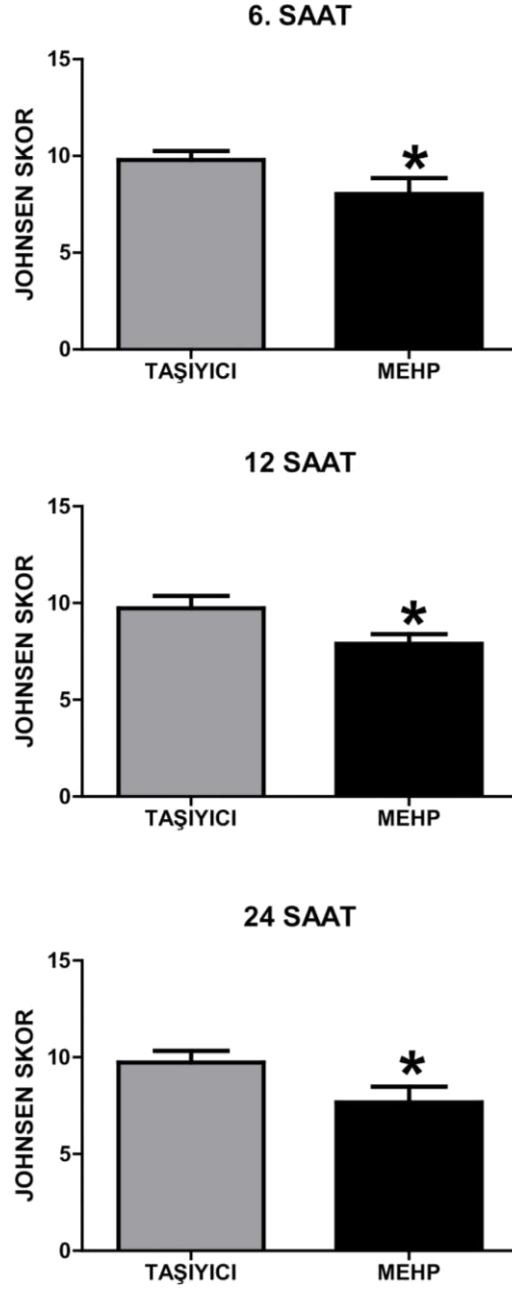
4.1. MEHP Uygulanması Sonucu Kan Testis Bariyerinin Bozulmasının Gösterilmesi

Deney gruplarının oluşması için taşıyıcı grubuna oral gavaj ile mısır yağı uygulanırken MEHP grubuna dozu 1g/kg olacak şekilde mısır yağı içerisinde çözdürülmüş MEHP oral gavaj ile uygulandı. Deney gruplarının oluştuğunu ve MEHP uygulanan grupta kan testis bariyerinin bozulduğunu göstermek için PAS-H boyanması yapıldı. Kan testis bariyerinin bozulması sonucunda 6, 12 ve 24. saat MEHP gruplarında vehicle grubuna göre seminifer epitel organizasyonunda bozulmalar, özellikle MEHP 12. Saat grubunda seminifer epitel kalınlığının azalması ve seminifer tübül lümenine erken salınan immatür germ hücreleri gösterilmiştir (Şekil 4.).



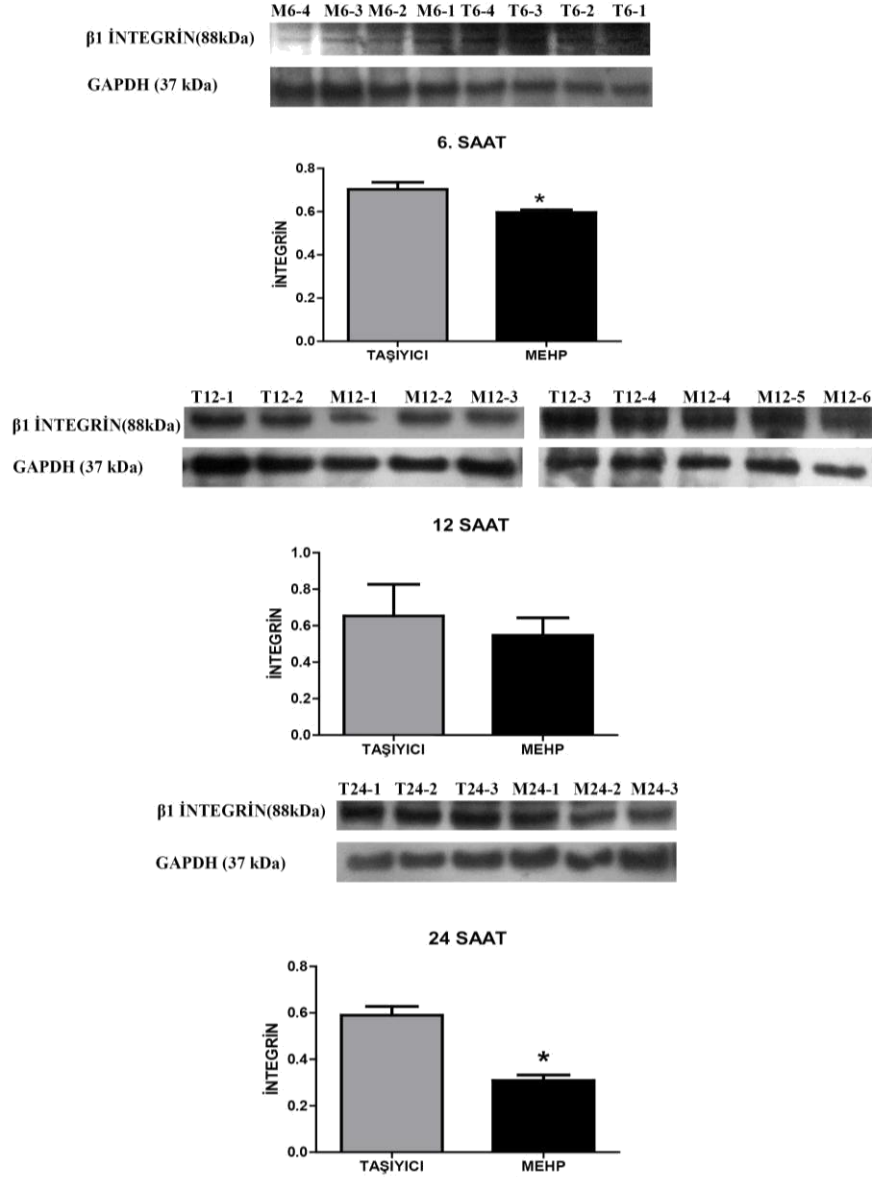
Şekil 4. 6, 12 ve 24. saatlerde taşıyıcı ve MEHP gruplarında PAS-H boyanması

Deney gruplarının oluşturulduğu gösterildikten PAS-H boyanması ile gösterildikten sonra istatistiksel olarak testis seminifer tübül hasarını değerlendirmek için Johnsen testis değerlendirilmesi yapılmıştır. Testis değerlendirilmesi sonucunda 6, 12 ve 24. saatlerde MEHP grubunda taşıyıcı grubuna oranla anlamlı farklılık vardır (Şekil 4. 1.).



Şekil 4. 1. 6, 12 ve 24. saatlerde taşıyıcı ve MEHP gruplarında Johnsen testis değerlendirilmesi.

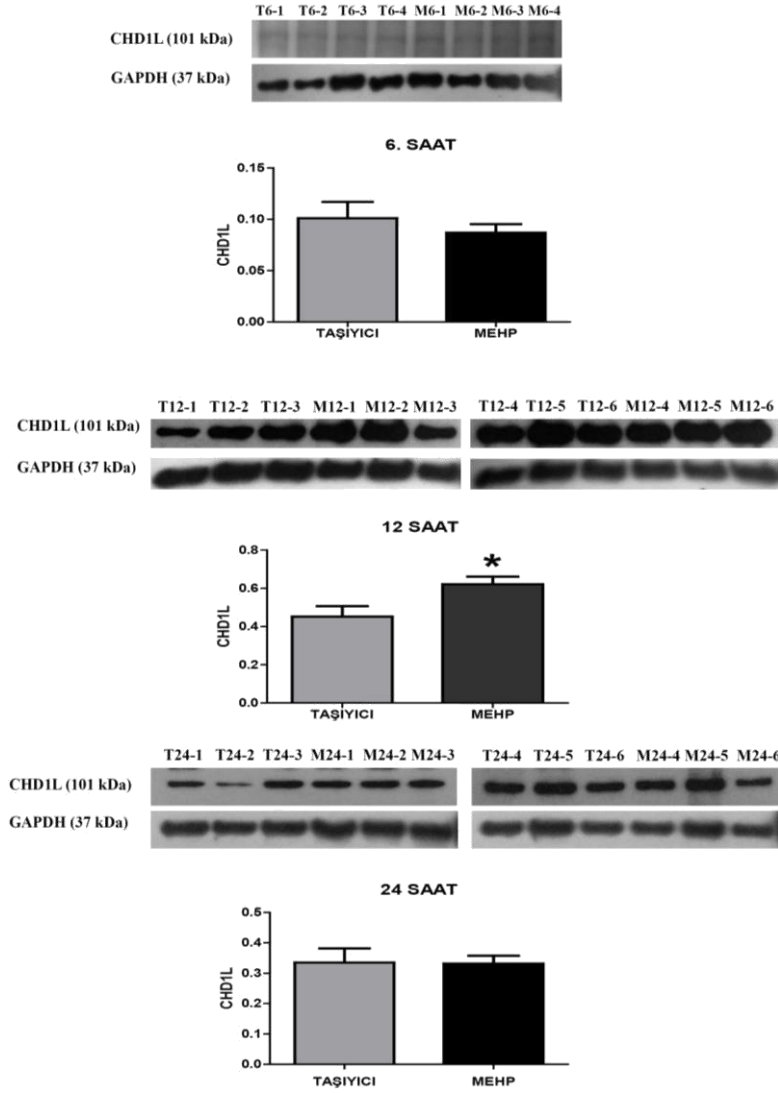
Kan testis bariyerinin moleküler olarak da bozulduğunu kanıtlamak için apikal ektoplazmik özelleşme proteinlerinden olan β_1 İntegrin ekspresyonunun 12. saatte MEHP grubunda azaldığı ancak gruplar arasında anlamlı farklılık olmadığı, 6. ve 24. saatte ise MEHP grubunda taşıyıcı grubuna oranla β_1 integrin ekspresyonunda anlamlı bir azalma olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.2.).



Şekil 4. 2. 6, 12 ve 24. saat taşıyıcı ve MEHP gruplarında β_1 integrin ekspresyonlarının değerlendirilmesi. T6: taşıyıcı 6. saat, T12: taşıyıcı 12. saat, T24: taşıyıcı 24 saat, M6: MEHP 6. saat, M12: MEHP 12. saat, M24: MEHP 24. saat

4.2. MEHP ile Kan Testis Bariyerinin Bozulduğu Modelde CHD1L Ekspresyonun Değerlendirilmesi

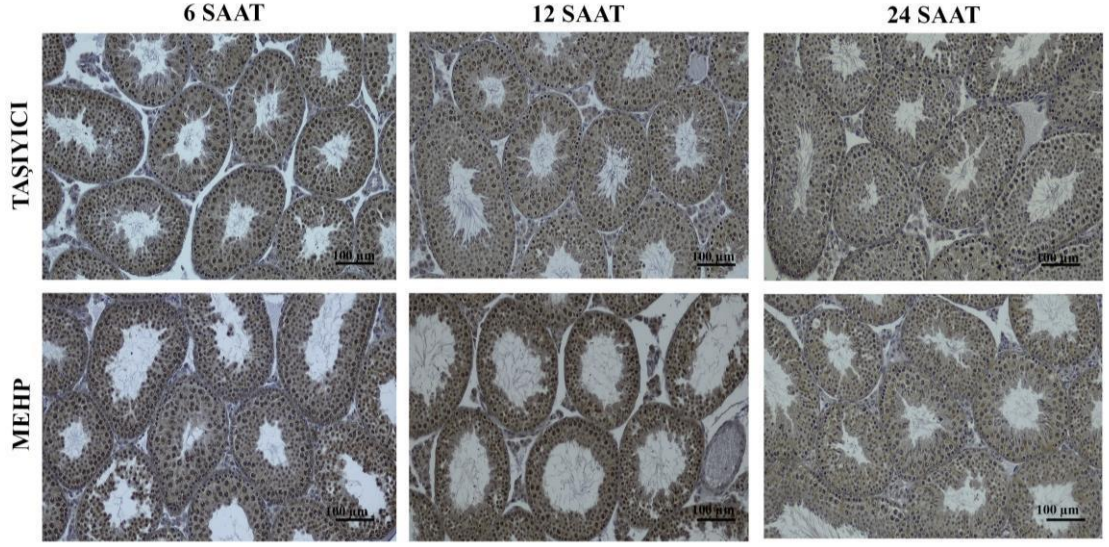
Kan testis bariyerinin bozulduğu modelde 6. saatte ki CHD1L ekspresyonu gruplar arasında benzer, 12. saatte ki CHD1L ekspresyonu MEHP grubunda taşıyıcı grubuna anlamlı olacak şekilde bir artış ve 24. saatte ise gruplar arasında ki ekspresyon benzerdir (Şekil 4. 3.).



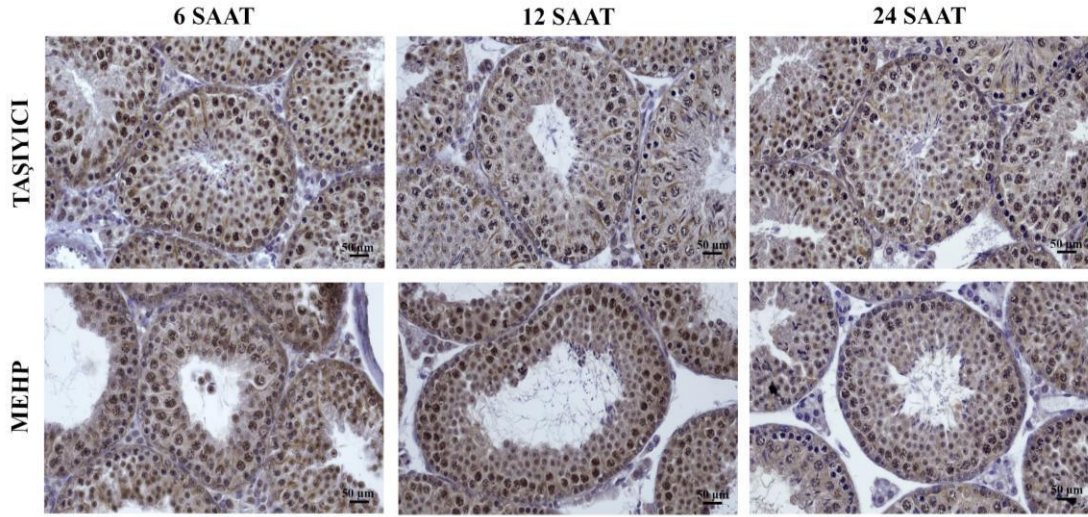
Şekil 4. 3. 6, 12 ve 24. saatlerde taşıyıcı ve MEHP gruplarında CHD1L ekspresyonunun değerlendirilmesi. T6: taşıyıcı 6. saat, T12: taşıyıcı 12. saat, T24: taşıyıcı 24 saat, M6: MEHP 6. saat, M12: MEHP 12. saat, M24: MEHP 24. saat

CHD1L'nin testis seminifer tübüllerindeki ekspresyonu değerlendirildiğinde taşıyıcı grubunda 6, 12 ve 24. saat gruplarında benzer olup hücresel olarak spermatogonyumlarda yok/zayıf, preleptoten/leptoten spermatositlerde zayıf/orta, pakiten spermatositlerde şiddetli, yuvarlak spermatidlerde orta ve nükleer ekspresyon gösterirken, Sertoli hücrelerinde şiddetli sitoplazmik olarak ekspresyonu gösterilmiştir. MEHP grubunda ise 6. saatte ekspresyon taşıyıcı grubu ile benzer, 12. saatte taşıyıcı grubuna göre ekspresyon

seviyesinin arttığı ve 24. saatte de CHD1L ekspresyonunun taşıyıcı grubu ile benzer olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.4, Şekil 4.5)



Şekil 4. 4. 6, 12 ve 24. saatlerde taşıyıcı ve MEHP gruplarında CHD1L hüresel lokalizyonunun değerlendirilmesi

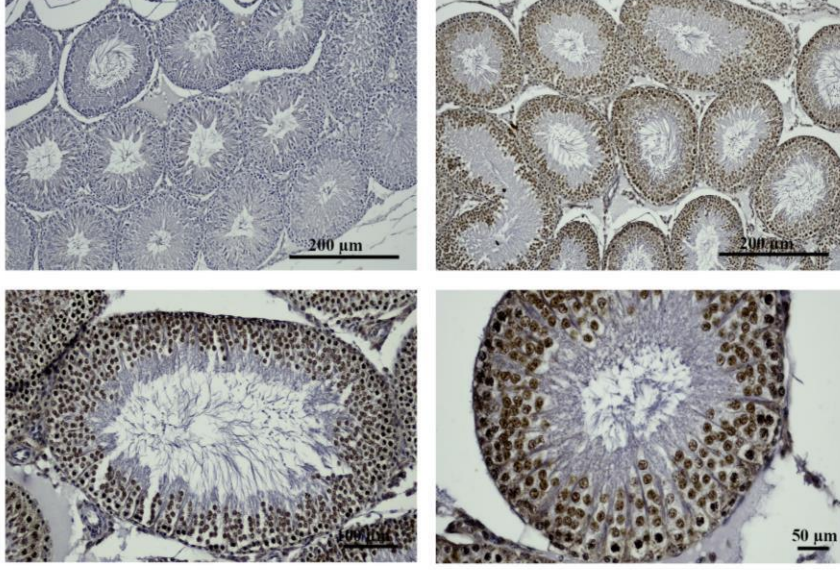


Şekil 4. 5. 6, 12 ve 24. saatlerde taşıyıcı ve MEHP gruplarında CHD1L hüresel lokalizyonunun değerlendirilmesi.

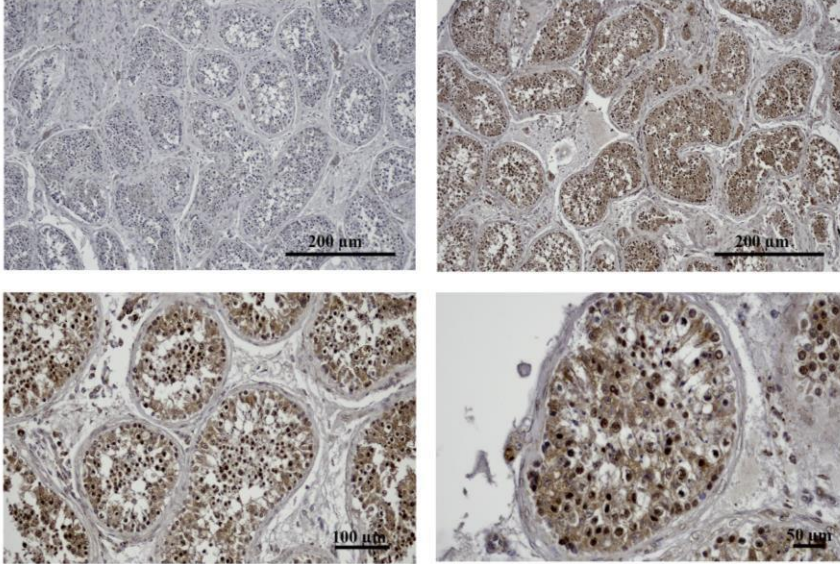
4.3. Sıçan ve İnsan Kontrol Testisinde CHD1L Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

Sıçan ve insan kontrol testisinde CHD1L'nin ekspresyonu, faredekine benzer olarak spermatogenik seri hücrelerinde nükleer görülürken, Sertoli hücresinde sitoplazmik ekspresyon görülmüştür (Şekil 4. 6.).

SIÇAN KONTROL TESTİSİ



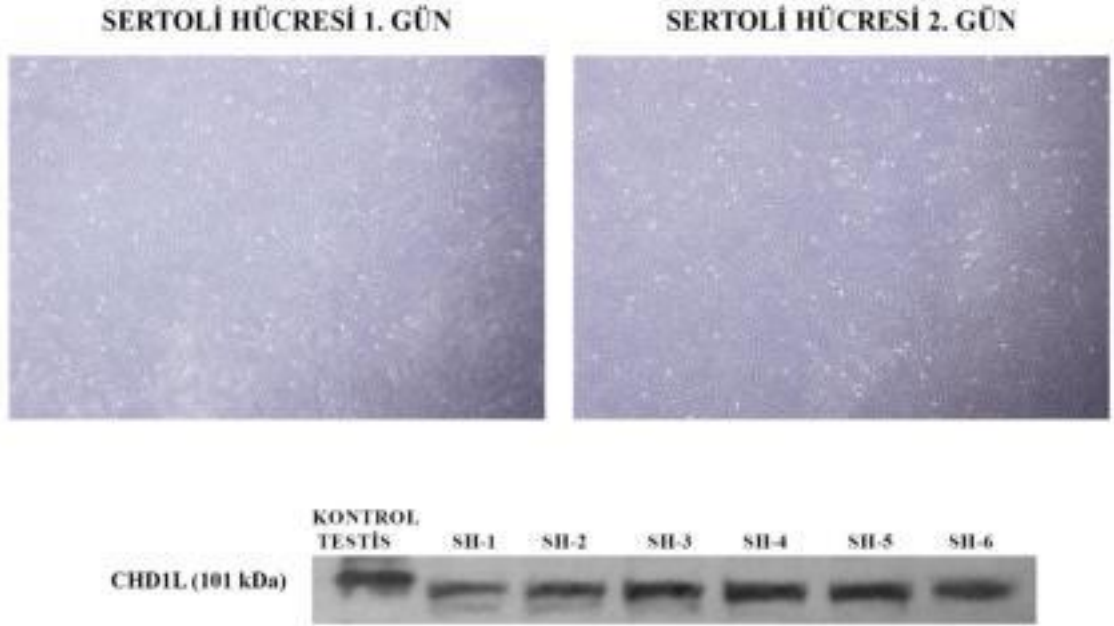
İNSAN KONTROL TESTİSİ



Şekil 4. 6. Sıçan ve insan kontrol testisinde CHD1L ekspresyonu.

4.4. Sertoli Hücre Hattında CHD1L Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

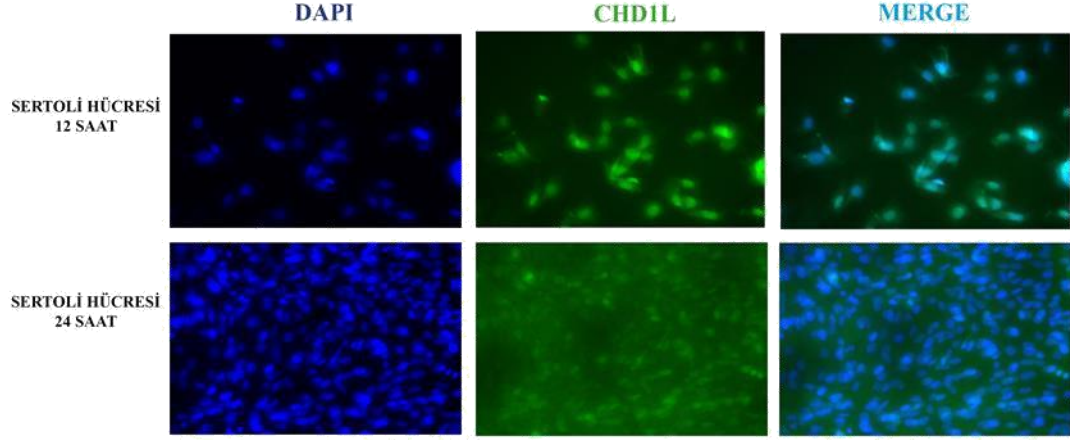
Hücre kültürü ortamında çoğaltılan Sertoli hücre hattında CHD1L protein ekspresyonu gösterilmiştir (Şekil 4.7.).



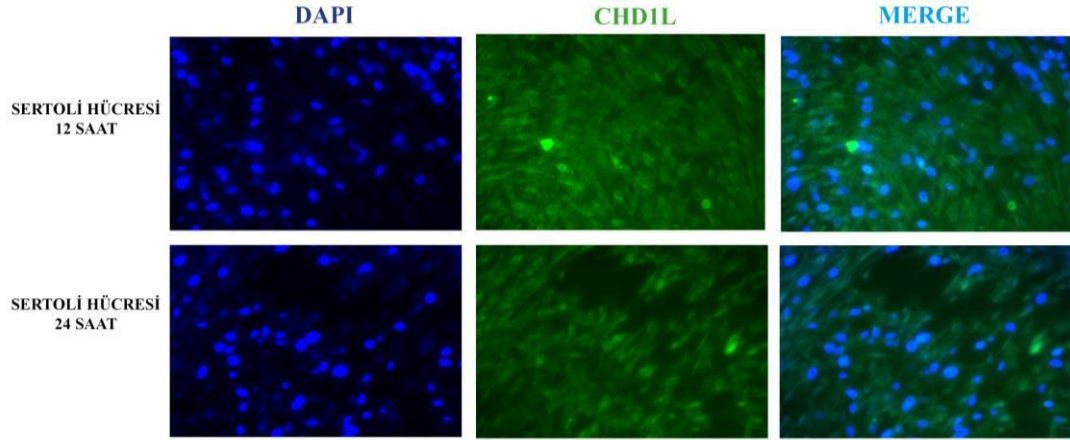
Şekil 4. 7. Sertoli hücre hattında CHD1L protein ekspresyonu. ikinci pasaj 1. ve 2. kültür günleri

4.5. Sertoli hücre hattında CHD1L ekspresyonunun İmmüno Floresan Yöntemi ile Değerlendirilmesi

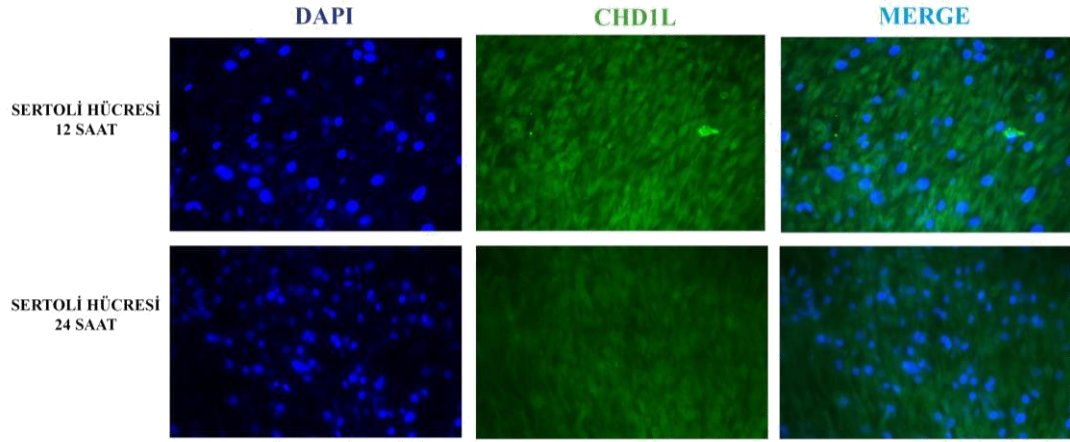
Sertoli hücre kültüründe MEHP doz ve saat denemelerinin ilk sonuçları elde edilmiştir (Şekil 4. 8., Şekil 4. 9., Şekil 4. 10.). Uygun doz ve saat belirlenmesi için tekrar denemeler yapılacaktır.



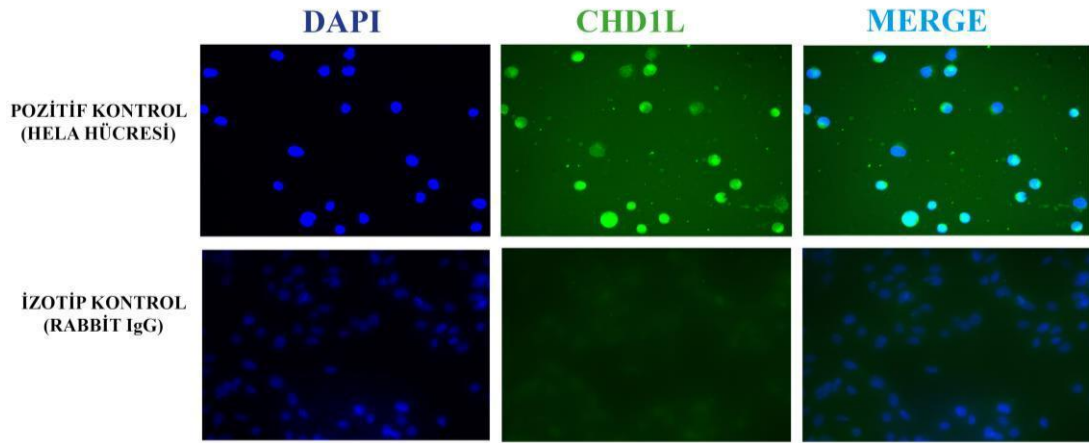
Şekil 4. 8. 12 ve 24 saat kültüre edilmiş Sertoli hücrelerinde CHD1L ekspresyonu



Şekil 4. 9. Sertoli hücre hattında 12 ve 24 saat 200 μ M MEHP ile kültüre edilmiş Sertoli hücrelerinde CHD1L ekspresyonu



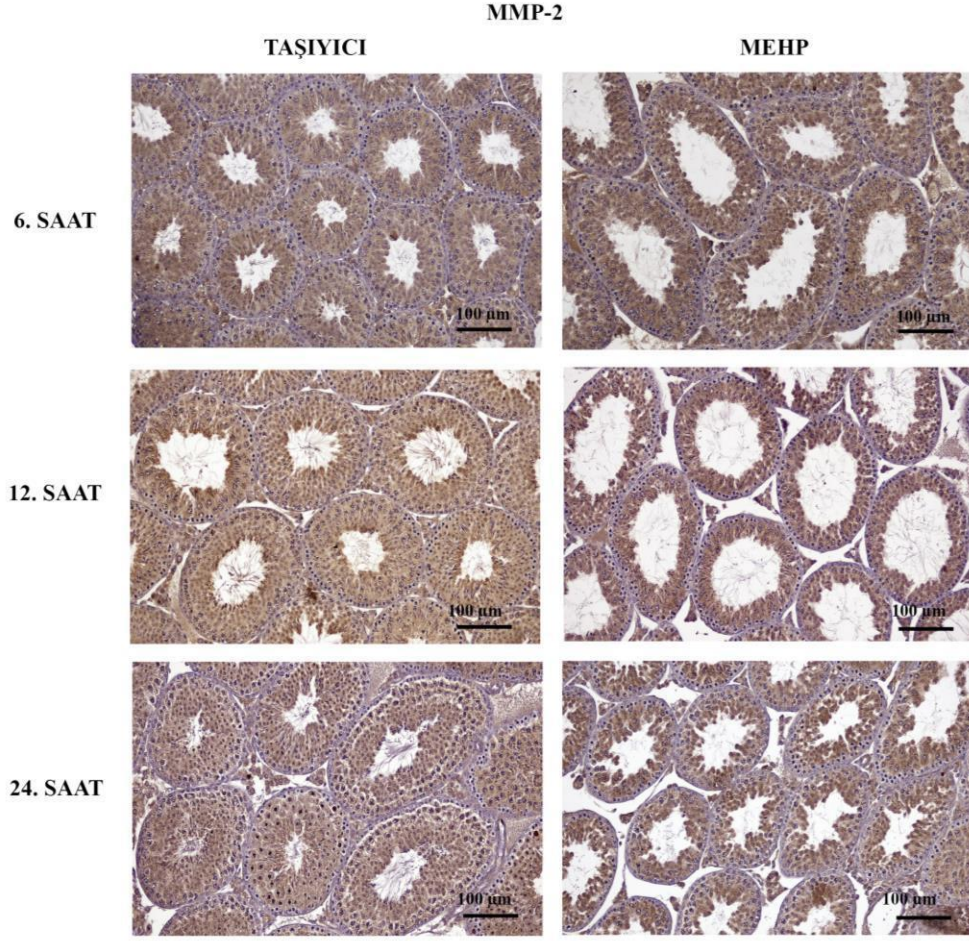
Şekil 4. 10. Sertoli hücre hattında 12 ve 24 saat 400 μ M MEHP ile kültüre edilmiş Sertoli hücrelerinde CHD1L ekspresyonu



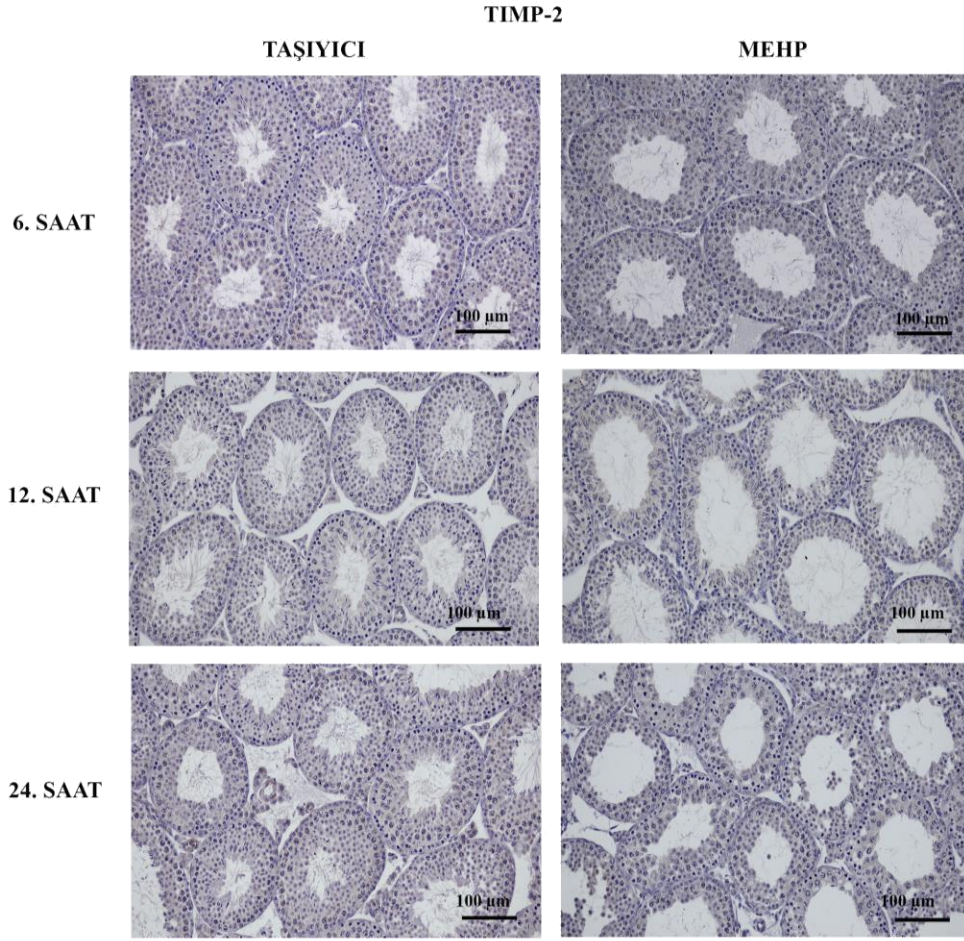
Şekil 4. 11. Pozitif (HELA hücresi) ve izotip (Rabbit IgG) kontrol(ler)

4.6. MEHP ile Kan Testis Bariyerinin Bozulduğu Modelde MMP-2, TIMP-2 ve MMP-9 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

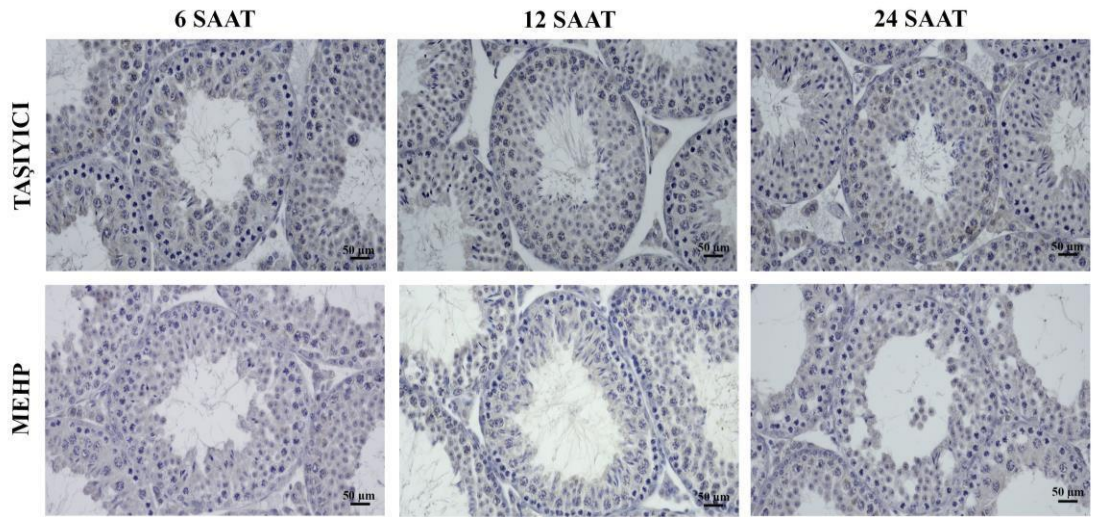
Kan testis bariyerinin bozulduğu modelde 6, 12 ve 24. saatlerde MEHP grubunda taşıyıcı grubuna oranla MMP-2 ve MMP-9 ekspresyonlarının sitoplazmik olduğu ve arttığı gösterilmiştir (Şekil 4.12, Şekil 4.15).



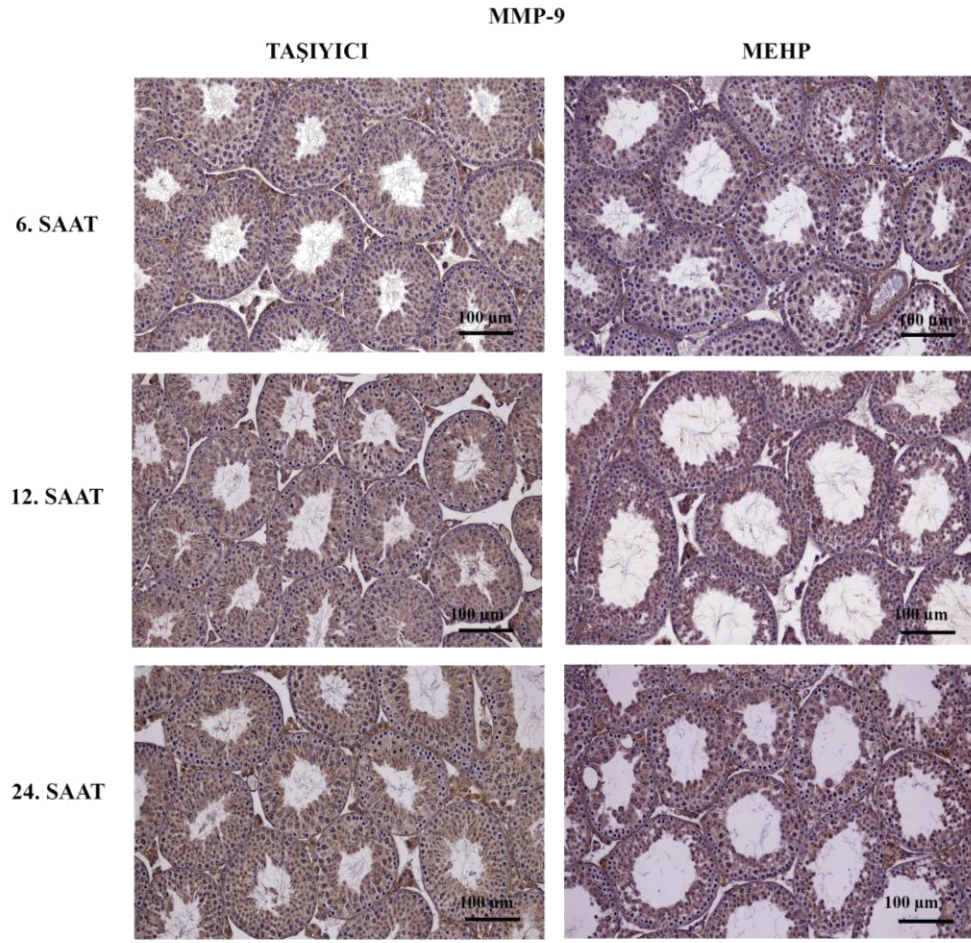
Şekil 4. 12. 6, 12 ve 24. saatlerde taşıyıcı ve MEHP grubunda MMP-2 ekspresyonu.



Şekil 4. 13. 6,12 ve 24. saatlerde taşıyıcı ve MEHP grubunda TIMP-2 ekspresyonu.



Şekil 4. 14. 6,12 ve 24. saatlerde taşıyıcı ve MEHP grubunda TIMP-2 ekspresyonu.



Şekil 4. 15. 6,12 ve 24. saatlerde taşıyıcı ve MEHP grubunda MMP-9 ekspresyonu

5. TARTIŞMA

CHD1L, ilk olarak hepatoselüler karsinomdan izole edilmiş ve bir onkogen olarak tanımlanmıştır (Chen ve ark., 2009). Tümörigenezdeki rolü transgenik fare modeli kullanılarak yapılan fonksiyonel bir çalışma aracılığıyla doğrulanmıştır (Chen ve ark., 2009)

Epidemiyolojik çalışmalar da CHD1L'nin kansere neden olan süreçlerle ilişkili olduğunu ve hepatoselüler karsinom, ovaryum kanseri, mide kanseri, mesane kanseri, kolorektal karsinom, meme kanseri, akciğer adenokarsinomu, glioma benzeri bazı kanserler için bir belirteç olarak kullanılabilceği ileri sürülmüştür.

Son yıllarda yapılan çalışmalardan birinde CHD1L'nin insan embriyonik kök hücrelerinin nöronal farklılaşmasını desteklediğini ve sinir sistemi gelişiminde önemli rol oynayabileceği gösterilmiştir (Dou ve ark., 2017).

2016 yılında yapılan bir çalışmada ise spermatogonyal kök hücrelerin hayatta kalması ve kök hücre özelliklerini devam ettirmede rolü olduğu gösterilmiştir. Aynı araştırmacılar tarafından 2018 yılında spermatogonyal kök hücrelerin kök hücre olarak kalma ve büyüme özelliklerini yöneten moleküler mekanizmaları araştırmak için yapılan bu çalışmada CHD1L'yi miRNA-486 ve MMP-2 ile ilişkilendirmişlerdir.

Bu tez çalışmasının ortaya çıkışında rol oynayan 2016 yılında yayımlanan çalışmada Sertoli hücresinde görülen ekspresyonun CHD1L'nin kan testis bariyerinin MEHP ile bozulduğu modelde ve bununla birlikte kan testis bariyerinin açılıp kapanmasında önemli rol oynayan MMP-2, TIMP-2 ve MMP-9'un da ekspresyonları değerlendirilmiştir.

Bulgularımızda spermatogonyal kök hücrelerde CHD1L'nin ekspresyonunun yanı sıra testiste seminifer tübüllerde yer alan ve spermatogenik seriyi oluşturan spermatosit, spermatidler ve Sertoli hücresinde de CHD1L ekspresyonu gösterilmiştir. CHD1L'nin ekspresyonunun özellikle 12. saatte arttığı ve 24. saatte azaldığı sonucu kan testis bariyeri bütünlüğünün tekrar sağlanmaya başlamasının bir göstergesi olabileceği düşünülmektedir. Taşıyıcı grubuna göre MEHP grubunda MMP-2 ve MMP-9

ekspresyonlarının artışı CHD1L'nin artışı ile ilişkili olabilir fakat CHD1L'nin MMP-2 ve MMP-9 ile ilişkisini açıklayabilmek için doğrudan bir değerlendirme gerekmektedir.

Testiste Sertoli hücrelerinin ekspresyonu görülmekle birlikte western blot analizindeki CHD1L ekspresyon seviyesine Sertoli hücrelerinin katkısı tüm testis dokusunun değerlendirilmesi sebebiyle ayırt edilemediğinden dolayı Sertoli hücre hattında da CHD1L ekspresyonu değerlendirilmiştir ve Sertoli hücrelerinde ki ekspresyonu ortaya konmuştur. Literatürde henüz yeterli bilgi bulunmadığından CHD1L ekspresyonunun fare dışında sıçan ve insan testis kesitlerinde de ekspresyonları gösterilmiştir ve fare ile benzer ekspresyona sahip oldukları gösterilmiştir.

Kan- testis bariyerinin yapısını bozmak için kullanılan MEHP'nin kan testis bariyerinde bulunan hücresel sıkı bağlantı proteinlerinin üzerinde olan etkilerinin dışında (Fiorini ve ark., 2004) ayrıca zaman ve doza bağlı bir şekilde, fetalatların testis kesitlerinde tübül başına Sertoli hücrelerinin sayısını doza bağımlı bir şekilde azalttığını, androjen reseptörünü ve folikül uyarıcı hormonu (FSH) azalttığını göstermiştir (Sosa ve ark., 2014). Bu etkiler steroidogenik enzimlerin ekspresyonunda bir azalmayı ve bunun sonucunda da testiküler gelişim etkilendiği için hasarlı tübül ve germ gelişimleri görülmesini sağlayabilir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında MEHP ile kan testis bariyerinin bozulması sağlanıp, CHD1L'nin testiste spermatogenik seriyi oluşturan germ hücrelerinde ve Sertoli hücresinde ki ekspresyonu temel deney protokolleri ile ilk kez değerlendirilmiş olup literatüre farklı bakış açıları kazandırarak yeni çalışmalara önemli katkı sağlayacaktır. Kan testis bariyerinin açılıp kapanmasında rol oynayan MMP-2 ve MMP-9 ve TIMP-2 ekspresyonları da kan testis bariyerinin bozulduğu modelde ekspresyonları gösterilmiştir.

CHD1L'nin siRNA teknolojisi kullanılarak sessizleştirilmesi ve ardından kan testis bariyerinin açılıp kapanma mekanizmasında rol oynayan MMP-2, TIMP-2, MMP-9 ve mTOR sinyal yolağı belirteci olan p-s6k'nın ekspresyon seviyelerinin değerlendirilmesi olası proje konularımızdan olup CHD1L'nin kan testis bariyeri ile ilgili rolünü ortaya çıkarmada literatüre önemli bilgiler sunabilecektir.

Sunulacak olan bu bilgilerin devamında kan testis bariyerinin açılıp kapanma mekanizmasının bozulduğu durumlarda ortaya çıkan germ hücre kaybı ve neticesinde meydana gelen erkek infertilitesinin moleküler sebeplerini anlamak ve çözümüne ilişkin önemli bilgiler sağlayacağını düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

A.J. Wein, L. R. K., A.W. Partin, C.A. Peters (Eds.). Campbell-Walsh Urology (11th ed.). 2016.

Ahel, D., Hořejší, Z., Wiechens, N., Polo, S. E., Garcia-Wilson, E., Ahel, I., . . . Jackson, S. P. Poly (adp-ribose)-dependent regulation of DNA repair by the chromatin remodeling enzyme alc1. *science*. 2009; 325 (5945): 1240-1243.

Byers, S. Sertoli cell junctions and the seminiferous epithelium barrier. *The Sertoli Cell*. 1993: 431-446.

Calabrese, E. J., & Baldwin, L. A. Hormesis: U-shaped dose responses and their centrality in toxicology. *Trends in pharmacological sciences*. 2001; 22 (6): 285-291.

Chen, L., Chan, T. H. M., & Guan, X.-y. Chromosome 1q21 amplification and oncogenes in hepatocellular carcinoma. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2010; 31 (9): 1165.

Chen, L., Chan, T. H. M., Yuan, Y.-F., Hu, L., Huang, J., Ma, S., . . . Xie, D. Chd11 promotes hepatocellular carcinoma progression and metastasis in mice and is associated with these processes in human patients. *The Journal of clinical investigation*. 2010; 120 (4): 1178-1191.

Chen, L., Hu, L., Chan, T. H. M., Tsao, G. S. W., Xie, D., Huo, K. K., . . . Guan, X. Y. Chromodomain helicase/adenosine triphosphatase DNA binding protein 1-like (chd11) gene suppresses the nucleus-to-mitochondria translocation of nur77 to sustain hepatocellular carcinoma cell survival. *Hepatology*. 2009; 50 (1): 122-129.

Chen, M., Huang, J. D., Hu, L., Zheng, B. J., Chen, L., Tsang, S. L., & Guan, X. Y. Transgenic chd11 expression in mouse induces spontaneous tumors. *PloS one*. 2009; 4 (8): e6727.

Cheng, C. Y., & Mruk, D. D. Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development. *Physiological reviews*. 2002; 82 (4): 825-874.

Cheng, C. Y., & Mruk, D. D. (2010). The biology of spermatogenesis: The past, present and future. In: The Royal Society.

Cheng, C. Y., & Mruk, D. D. The blood-testis barrier and its implications for male contraception. *Pharmacological reviews*. 2012; 64 (1): 16-64.

Cheng, W., Su, Y., & Xu, F. Chd11: A novel oncogene. *Molecular cancer*. 2013; 12 (1): 170.

Chetty, C., Lakka, S. S., Bhoopathi, P., & Rao, J. S. Mmp-2 alters vegf expression via $\alpha v \beta 3$ integrin-mediated pi3k/akt signaling in a549 lung cancer cells. *International journal of cancer*. 2010; 127 (5): 1081-1095.

Chien, C.-S., Shen, K.-H., Huang, J.-S., Ko, S.-C., & Shih, Y.-W. Antimetastatic potential of fisetin involves inactivation of the pi3k/akt and jnk signaling pathways with downregulation of mmp-2/9 expressions in prostate cancer pc-3 cells. *Molecular and cellular biochemistry*. 2010; 333 (1-2): 169.

Derrien, T., Johnson, R., Bussotti, G., Tanzer, A., Djebali, S., Tilgner, H., . . . Knowles, D. G. The gencode v7 catalog of human long noncoding rnas: Analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome research*. 2012; 22 (9): 1775-1789.

Dou, D., Zhao, H., Li, Z., Xu, L., Xiong, X., Wu, X., . . . Hu, L. Chd11 promotes neuronal differentiation in human embryonic stem cells by upregulating pax6. *Stem cells and development*. 2017; 26 (22): 1626-1636.

Fiorini, C., Tilloy-Ellul, A., Chevalier, S., Charuel, C., & Pointis, G. Sertoli cell junctional proteins as early targets for different classes of reproductive toxicants. *Reproductive Toxicology*. 2004; 18 (3): 413-421.

Franca, L. R., Auharek, S. A., Hess, R. A., Dufour, J. M., & Hinton, B. T. Morphofunctional and immunological aspects of the blood-testis and blood-epididymal barriers: pp in press, Landes Bioscience, Austin, TX; 2011, p:

Jiang, B. H., Chen, W. Y., Li, H. Y., Chien, Y., Chang, W. C., Hsieh, P. C., . . . Chiou, S. H. Chd11 regulated parp1-driven pluripotency and chromatin remodeling during the early-stage cell reprogramming. *Stem Cells*. 2015; 33 (10): 2961-2972.

Liu, D., Guo, H., Li, Y., Xu, X., Yang, K., & Bai, Y. Association between polymorphisms in the promoter regions of matrix metalloproteinases (mmps) and risk of cancer metastasis: A meta-analysis. *PloS one*. 2012; 7 (2): e31251.

Liu, S. S., Bai, Y. S., Feng, L., Dong, W. W., Li, Y., Xu, L. P., & Ma, N. F. Identification of chd11 as an important regulator for spermatogonial stem cell survival and self-renewal. *Stem cells international*. 2016; 2016: 4069543.

Ma, N. F., Hu, L., Fung, J. M., Xie, D., Zheng, B. J., Chen, L., . . . Chen, M. Isolation and characterization of a novel oncogene, amplified in liver cancer 1, within a commonly amplified region at 1q21 in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2008; 47 (2): 503-510.

Ma, N. F., Hu, L., Fung, J. M., Xie, D., Zheng, B. J., Chen, L., . . . Guan, X. Y. Isolation and characterization of a novel oncogene, amplified in liver cancer 1, within a commonly amplified region at 1q21 in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2008; 47 (2): 503-510.

Mok, K. W., Mruk, D. D., & Cheng, C. Y. Rps6 regulates blood-testis barrier dynamics through akt-mediated effects on mmp-9. *Journal of cell science*. 2014; 127 (Pt 22): 4870-4882.

Mruk, D. D., & Cheng, C. Y. Sertoli-sertoli and sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Endocrine reviews*. 2004a; 25 (5): 747-806.

Mruk, D. D., & Cheng, C. Y. Sertoli-sertoli and sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Endocrine reviews*. 2004b; 25 (5): 747-806.

Mu, Q.-J., Li, H.-L., Yao, Y., Liu, S.-C., Yin, C.-G., & Ma, X.-Z. Chromodomain helicase/atpase DNA-binding protein 1-like gene (chd11) expression and implications for invasion and metastasis of breast cancer. *PloS one*. 2015; 10 (11): e0143030.

Pelletier, R.-M. The tight junctions in the testis, epididymis, and vas deferens. *Tight junctions*. 2001; 599-628.

Pelletier, R.-M. The blood-testis barrier: The junctional permeability, the proteins and the lipids. *Progress in histochemistry and cytochemistry*. 2011; 46 (2): 49-127.

Rodriguez-Sosa, J. R., Bondareva, A., Tang, L., Avelar, G. F., Coyle, K. M., Modelski, M., . . . França, L. R. Phthalate esters affect maturation and function of primate testis tissue ectopically grafted in mice. *Molecular and cellular endocrinology*. 2014; 398 (1-2): 89-100.

Saladi, S. V., & de la Serna, I. L. Atp dependent chromatin remodeling enzymes in embryonic stem cells. *Stem cell reviews*. 2010; 6 (1): 62-73.

Siu, M. K., & Cheng, C. Y. Interactions of proteases, protease inhibitors, and the $\beta 1$ integrin/laminin $\gamma 3$ protein complex in the regulation of ectoplasmic specialization dynamics in the rat testis. *Biology of reproduction*. 2004; 70 (4): 945-964.

Snider, A. C., Leong, D., Wang, Q. T., Wysocka, J., Yao, M. W., & Scott, M. P. The chromatin remodeling factor chd11 is required in the preimplantation embryo. *Biology open*. 2013; 2 (2): 121-131.

Stanton, P. G. Regulation of the blood-testis barrier. *Seminars in cell & developmental biology*. 2016; 59: 166-173.

Wang, L., Dou, T., Li, S., & Liu, Y. Transcriptome profiling and pathway analysis of the effects of mono-(2-ethylhexyl) phthalate in mouse sertoli cells. *Experimental and therapeutic medicine*. 2019; 17 (4): 2821-2829.

Wang, Q. T., Piotrowska, K., Ciemerych, M. A., Milenkovic, L., Scott, M. P., Davis, R. W., & Zernicka-Goetz, M. A genome-wide study of gene activity reveals developmental signaling pathways in the preimplantation mouse embryo. *Developmental cell*. 2004; 6 (1): 133-144.

Wen, Q., Tang, E. I., Gao, Y., Jesus, T. T., Chu, D. S., Lee, W. M., . . . Cheng, C. Y. Signaling pathways regulating blood-tissue barriers - lesson from the testis. *Biochimica et biophysica acta*. 2017.

Wong, E. W., Mruk, D. D., & Cheng, C. Y. Biology and regulation of ectoplasmic specialization, an atypical adherens junction type, in the testis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 2008; 1778 (3): 692-708.

Yan, H. H., Mruk, D. D., Lee, W. M., & Cheng, C. Y. Ectoplasmic specialization: A friend or a foe of spermatogenesis? *Bioessays*. 2007; 29 (1): 36-48.

Yao, H. H.-C., Ungewitter, E., Franco, H., & Capel, B. (2015). Establishment of fetal sertoli cells and their role in testis morphogenesis. In *Sertoli cell biology* (pp. 57-79): Elsevier.

Yao, P.-L., Lin, Y.-C., & Richburg, J. H. Tnf alpha-mediated disruption of spermatogenesis in response to sertoli cell injury in rodents is partially regulated by mmp2. *Biology of reproduction*. 2009a; 80 (3): 581-589.

Yao, P.-L., Lin, Y.-C., & Richburg, J. H. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate-induced disruption of junctional complexes in the seminiferous epithelium of the rodent testis is mediated by mmp2. *Biology of reproduction*. 2010a; 82 (3): 516-527.

Yao, P. L., Lin, Y. C., & Richburg, J. H. Tnf alpha-mediated disruption of spermatogenesis in response to sertoli cell injury in rodents is partially regulated by mmp2. *Biology of reproduction*. 2009b; 80 (3): 581-589.

Yao, P. L., Lin, Y. C., & Richburg, J. H. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate-induced disruption of junctional complexes in the seminiferous epithelium of the rodent testis is mediated by mmp2. *Biology of reproduction*. 2010b; 82 (3): 516-527.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Gamze	Uyruğu	T.C.
Soyadı	TOSUN	Tel no	0536-033-46-05
Doğum tarihi	24.05.1989	e-posta	gmztsn@gmail.com

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		Mezuniyet yılı
Lise	Merzifon Lisesi	2006
Lisans	Ondokuz Mayıs Üniversitesi	2014
Yüksek Lisans		
Doktora		

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)

Burslar-Ödüller:

Yayınlar ve Bildiriler:

14. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 2018 ANTALYA, 'Farede MEHP aracılı kan-testis bariyerinin bozulduğu testiste CHD1L ve GATA4 ekspresyonlarının değerlendirilmesi' başlıklı yazılı bildiri, **Gamze Tosun**, Pınar Şahin, Çiler Çelik Özenci

14. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 2018 ANTALYA, 'FoxO3 transkripsiyon faktörü farede implantasyon ve desidualizasyonda rol alıyor olabilir' başlıklı yazılı bildiri, Dileyra Adıgüzel, Pınar Şahin, Nayçe İlayda Bektaş, **Gamze Tosun**, Nilay Kuşcu, Çiler Çelik Özenci