

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

KAN-TESTİS BARIYERİNİN
DÜZENLENMESİNDE
ROL ALAN SİNYAL
YOLAKLARININ ARAŞTIRILMASI

Nazlı Ece ORDUERİ

DOKTORA TEZİ

Antalya, 2016

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

KAN-TESTİS BARIYERİNİN
DÜZENLENMESİNDE
ROL ALAN SİNYAL
YOLAKLARININ ARAŞTIRILMASI

Nazlı Ece ORDUERİ

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Çiler ÇELİK-ÖZENCİ

Bu tez TUBİTAK 2214/A Yurtdışı Doktora Bursu ve Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2013.03.0122.011. proje numarası ile desteklenmiştir

2016- ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Histoloji ve Embriyoloji Doktora Programında doktora tezi olarak kabul edilmiştir. .../...../.....

İmza

Tez Danışmanı:
(Ünvanı, Adı Soyadı) (Üniversite)

Üye :
(Ünvanı, Adı Soyadı) (Üniversite)

Üye :
(Ünvanı, Adı Soyadı) (Üniversite)

Üye :
(Ünvanı, Adı Soyadı) (Üniversite)

Üye :
(Ünvanı, Adı Soyadı) (Üniversite)

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

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.

Nazlı Ece ORDUERİ

İmza

Prof. Dr. Çiler ÇELİK-ÖZENCİ

İmza

TEŐEKKÜR

Tezimin planlanması, projelendirilmesi ve sonuçlarının değerlendirilmesinde önemli katkıları bulunan, benden ve ailemden maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, bana akademik nosyonu kazandıran çok değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Çiler ÇELİK-ÖZENCİ'ye,

Tezimin gerçekleşmesi için her türlü imkân ve desteği sağlayan Rockefeller Üniversitesi bünyesindeki "The Population Council" Biyomedikal Araştırma Laboratuvarı sorumlusu akıl hocam Sayın Dr. C. Yan CHENG'e,

İhtiyacım olduğunda yardımlarını esirgemeyerek her aşamada bana destek olan Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyelerine ve araştırma görevlisi arkadaşlarıma,

Akademik hayatımın başından itibaren benden maddi ve manevi desteğini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Arda TAŞATARGİL'e,

İhtiyaç duyduğum anda bana yardımcı oldukları için birlikte çalıştığım tüm ekip arkadaşlarıma ve değerli dostum Dr. Mustafa Gökhan Ertosun'a,

Aynı yolda yürüdüğümüz ve birlikte çalışmalarımızı yürüttüğümüz anabilim dalımızı değerli asistan arkadaşlarıma ve çalışanlarına,

Yardımları ile her zaman yanımda olan Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün değerli elemanlarına,

Son olarak, bu çalışmanın gerçekleştirilmesi esnasında her zaman yanımda olan ve bütün zorluklarla mücadele etmemi sağlayan sevgili eşim Emre ORDUERİ'ye, kızım Cemre ORDUERİ'ye, sevgili annem Hilal GÜNGÖR'e, sevgili babam Doğan GÜNGÖR'e, tüm ORDUERİ ailesine ve dostlarıma, en içten teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Amaç: Kan-testis bariyerinin (KTB) yeniden modellenmesi, aktin-tabanlı hücre iskeletinin yeniden organizasyonu ile gerçekleşmektedir. Bu çalışmada, hücresel Src kinaz (c-Src) substratı olan, hücre membranı ile aktin hücre iskeletine bağlanma özelliği gösteren ve Fokal adezyon kinaz (FAK) ile aktive olduğu bilinen ezrin proteininin KTB'deki işlevsel öneminin gösterilmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Primer sıçan Sertoli hücresi kültüründe *in vitro* olarak ve sıçan testisinde *in vivo* olarak RNA interferens (RNAi) aracılı ezrin yerleşimi sessizleştirilen modelde; kan-testis bariyeri bütünlüğü analizleri gerçekleştirilmiştir. KTB bütünlüğü Sertoli hücresi kültüründe, transeptilyal rezistans (TER) ölçümleri ile testiste ise fluoresan izotiyosiyanat (FITC)-inülin aracılı ajan ile değerlendirilmiştir. Ardından Sertoli hücresi lizatları ve testis lizatları elde edilerek, RT-PZR, immunoblot, immünofluoresan ve ko-immunopresipitasyon yöntemleri ile ezrin ilişkili KTB düzenleyici proteinler araştırılmıştır.

Bulgular: Ezrin yerleşiminin bazal ektoplazma özelleşmelerinde (BEÖ), seminifer epitel döngüsünün geç evre VIII'den evre IX' a kadar olan süreçte; apikal ektoplazma özelleşmelerinde (AEÖ) ise sadece evre VIII'e özgü ve basamak 19 spermatid- Sertoli arayüzünde sınırlı olduğunu gösterdik. Ezrin proteininin Sertoli hücresi kültüründe baskılanması ile aktin mikrofilamanlarının yapısındaki bozulmalar, KTB düzenleyen proteinlerin düzeylerinde ve lokalizasyonlarında değişiklikler tespit ettik. Ezrinin *in vivo* baskılanması ile spermatid taşınmasının geciktiğini gösterdik. Spermiyasyondaki bazı defektlere neden olan bu gecikmenin, spermatidlerin epitelin derinlerinde gömülü olması ve spermatid polaritesinin kaybına bağlı olduğu tespit ettik. Ayrıca, ezrinin atık sitoplazmalar ve fagozomlar ile ilişkili dağılım gösterdiğini, baskılandığında ise atık sitoplazmaların ve fagozomların apikalden bazal kompartmana doğru taşınmasında gecikmelere sebebiyet verdiğini ortaya koyduk.

Sonuç: Ezrinin, spermatogenez sürecinde aktin mikrofilaman organizasyonun düzenlemesini etkilediğini gerek *in vitro* gerekse *in vivo* olarak gösterdik. KTB yeniden kurulumunda BEÖ ve AEÖ düzenleyici proteinlerinin lokalizasyonlarını etkileyerek spermatogenez bozduğunu doğruladık.

Anahtar Kelimeler: Seminifer epitel döngüsü, kan-testis bariyeri, ektoplazma özelleşmeler ezrin, F-aktin

ABSTRACT

Objective: During spermatogenesis, the transport of spermatids and the release of sperms at spermiation and the remodeling of the blood-testis barrier (KTB) in the seminiferous epithelium of rat testes require rapid reorganization of the actin-based cytoskeleton. However, the regulatory molecule(s) remain unexplored. In this study, we aim to show the functional importance of ezrin which belongs to FAK activation, as c-Src substrate and also has adhesive to cell cytoplasm between actin and the cell membrane.

Method: By using *in vitro* primary rat Sertoli cell culture, and *in vivo* rat testis, siRNA duplexes were occurred to analysis blood testis-barrier integrity with Transepithelial Resistance (TER) measurements, FITC-inulin analysis, RT-PCR, immunoblot, immunofluorescent and co-immunoprecipitation experiments.

Results: Ezrin is expressed at the basal ES/KTB in all stages, except from late VIII to IX, of the epithelial cycle. Its knockdown by RNA interference (RNAi) *in vitro* perturbs the Sertoli cell tight junction-permeability barrier via a disruption of the actin microfilaments in Sertoli cells, which in turn impeded basal ES protein distribution, perturbing the KTB function. These findings were confirmed by a knockdown study *in vivo*. However, the expression of ezrin at the apical ES is restricted to stage VIII of the cycle and limited only between step 19 spermatids and Sertoli cells. A knockdown of ezrin *in vivo* by RNAi was found to impede spermatid transport, causing defects in spermiation in which spermatids were embedded deep inside the epithelium, and associated with a loss of spermatid polarity. Also, ezrin was associated with residual bodies and phagosomes, and its knockdown by RNAi in the testis also impeded the transport of residual bodies/phagosomes from the apical to the basal compartment.

Conclusion: Ezrin has an important effect in FAK signalling pathway and BTB restructuring by regulating actin microfilament organization at the ES in rat testes. In summary, both *in vitro* and *in vivo* knockdown of ezrin disrupt BTB and spermatogenesis, respectively.

Key words: Seminiferous epithelial cycle, blood-testis barrier, ectoplasmic specialization, ezrin, F-actin

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER	x
TABLolar	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Hipotezin Temeli ve Amaç	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Testis Histolojisi	5
2.2. Spermatogenez biyolojisi	6
2.2.1 Sıçanlarda seminifer epitel döngüsünün evrelendirilmesi	8
2.3. Sertoli hücresi ve hücre iskeleti	11
2.3.1. Sertoli hücresi bağlarının yapısal bileşenleri	13
2.4. Kan-testis bariyeri (KTB) tanımı ve işlevleri	14
2.4.1. Kan-testis bariyeri ve aktin filamanları	15
2.4.2. Sertoli hücrelerindeki aktin filamanları	16
2.4.3 Ektoplazma yapılarıdaki aktin filamanların işlevi	16
2.4.4. Ektoplazma özelleşmeler (EÖ)	17
2.4.5. Bazal ektoplazma özelleşmeler (BEÖ)	18
2.4.6. Apikal ektoplazma özelleşmeler (AEÖ)	19
2.4.7. Tübülobulbar kompleks (TBK)	21
2.5. Kan-testis bariyerini (KTB) etkileyen faktörler	22
2.5.1. Yaş ve hormonlar	22
2.5.2. Kadmiyum ve diğer toksik maddeler	24
2.6. Kan-testis bariyeri düzenlenme dinamiği	26
2.6.1. Fokal adezyon kinaz (FAK) ilişkisi	26

2.6.2.	Aktin bazlı hücre iskeleti ve Fokal adezyon kinaz	28
2.7.	Fokal adezyon kinaz, hücreSEL Src kinaz (c-Src) ve ezrin ilişkisi	31
2.7.1.	Ezrin proteini yapısal özellikleri	32
3.	GEREÇ ve YÖNTEM	35
3.1.	Deney hayvanları	35
3.2.	Primer Sertoli hücresi izolasyonu ve kültürü	35
3.2.1.	<i>İn vitro</i> kadmiyum klorür (CdCl ₂) ile indüklenmiş Sertoli hücresi kültürü	38
3.2.2.	<i>İn vivo</i> kadmiyum ile indüklenmiş sıçan testisi	39
3.3.	Germ hücre izolasyonu	39
3.4.	<i>İn vitro</i> kan-testis bariyeri oluşturma ve TER ölçümleri	40
3.5.	FAK/c-Src substratı olan ezrine özgü siRNA çiftleri kullanılarak, ezrin geninin RNAi tekniği ile Sertoli hücrelerinde <i>in vitro</i> baskılanması	42
3.6.	İmmünohistokimyasal (İHK) analizler	43
3.7.	Çift işaretli immunoflüoresan (İF) boyama analizleri	45
3.8.	İmmünoiblot (İB) analizleri	45
3.9.	Ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR)	47
3.10.	Birlikte-immünopresipitasyon (Ko-immünopresipitasyon) (Ko-İP)	49
3.11.	Ezrine özgü siRNA çiftleri kullanılarak, ezrin geninin RNAi tekniği ile testiste <i>in vivo</i> baskılanması	49
3.12.	Histolojik analizler	50
3.13.	<i>İn vivo</i> kan-testis bariyeri bütünlüğü analizleri	50
3.14.	Flüoresan yoğunluk analizleri	51
3.15.	İstatistiksel analizler	51

4. BULGULAR	52
4.1. Hipotezin temelini oluşturan bulgular	52
4.1.1. Ezrin geninin testiste, Sertoli ve germ hücrelerindeki varlığının gösterilmesi	53
4.2. Ezrin proteinin testiste, seminifer epitel döngüsünde evreye-özü varlığının gösterilmesi	54
4.3. <i>In vivo</i> kadmiyum etkisi altında ezrin protein düzeyleri	56
4.4. Ezrin proteini ile bazal EÖ, apikal EÖ, aktin düzenleyici ve hücre iskelet proteinleri yapısal etkileşim bulguları	58
4.5. Ezrinin ile F-aktin, p-FAK-Tyr ³⁹⁷ , β 1-integrin, JAM-A, okludin, N- kaderin ile birlikte lokalizasyonu	59
4.6. Farklı hücre yoğunluğu kullanılarak Sertoli hücresi kültüründe elde edilen ezrin ve F-aktin lokalizasyonlarının immünoflüoresan bulguları	60
4.7. Sertoli hücresi kültüründe kadmiyum etkisi altında ezrin yerleşimi ve F-aktin ile birlikte dağılımı	62
4.8. Ezrin geninin Sertoli hücrelerinde baskılanmasının immünoblot bulguları	63
4.9. Ezrin geninin Sertoli hücrelerinde baskılanmasının immünoflüoresan bulguları ile gösterilmesi	66
4.10. Ezrin geninin Sertoli hücrelerinde baskılanması ile edilen TER ölçüm bulguları	69
4.11. Ezrin geninin Sertoli hücresi kültüründe baskılanması ve RT- PZR bulguları	70
4.12. Ezrin geninin <i>in vivo</i> baskılanması ile apikal ektoplazma özelleşmelerinin işlevlerindeki bozulmaları gösteren bulgular	71

4.13.	Ezrin geninin <i>in vivo</i> baskılanmasının apikal ektoplazma özelleşmelerindeki histolojik bulguları	72
4.14.	Ezrin geninin <i>in vivo</i> baskılanması ile elde edilen seminifer tübül evresine özgün histolojik bulgular	74
4.15.	Ezrin geninin <i>in vivo</i> baskılanmasının bazal ektoplazma özelleşmelerindeki histolojik bulguları	76
4.16.	Ezrin geninin baskılanması ile apikal ektoplazma özelleşmelerdeki aktin bağlayıcı ve düzenleyici proteinlerin flüoresan bulguları	79
5.	TARTIŞMA	84
5.1	Ezrin proteininin kan-testis bariyerindeki rolü	84
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER	91
	KAYNAKLAR	93
	ÖZGEÇMİŞ	103

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AB	:	Adherens bağlantı
Abl	:	Abelson mürin lösemi viral onkogen homolog 1
AEÖ	:	Apikal ektoplazma özelleşmeleri
AF	:	Ara filamanlar
ARP2/3	:	Aktin-ilişkili protein 2 ve 3
BEÖ	:	Bazal ektoplazma özelleşmeleri
c-Src	:	Hüresel-Rous sarcoma virüsün sarkoma-indüklü geni
cAMP	:	Dibutiril siklik adenozin monofosfat
CdCl₂	:	Kadmiyum klorid
CSK	:	C-terminal Src kinaz
Di	:	Diploten spermatosit
ECM	:	Ekstraselüler matriks
EÖ	:	Ektoplazma özelleşmeleri
ERM	:	Ezrin radiksin moesin
FAK	:	Fokal adezyon kinaz
FAT	:	Fokal bağlayıcı odak
FERM	:	4.1 protein ezrin radiksin moesin
FITC-inulin	:	Flüoresan izotiyosiyanat inulin
FRK	:	Fyn-ilişkili Src kinaz
GAPDH	:	Gliseraldehit-3 fosfatdehidrojenaz
GH	:	Germ hücresi
Grb7	:	Büyüme faktör reseptör bağlayıcı protein
JAK (JAK-1)	:	Janus kinaz
Ko-İP	:	Birlikte immünopresipitasyon/ Ko- immünopresipitasyon
KTB	:	Kan-testis bariyeri
Ktrl RNAi	:	Kontrol RNAi
L	:	Leptoten spermatosit
LH	:	Leydig hücresi
MH	:	Miyoid hücre
N-WASP	:	Nöronal Wiskott–Aldrich Sendrom proteini
OB	:	Oluklu bağlantı
P	:	Pakiten spermatosit

PII	:	Prolinden zengin domeyn II
PIII	:	Prolinden zengin domeyn III
P130Cas	:	Crk ilişkili substrat
P38 MAPK	:	p38 MAP kinaz
PAS	:	Periyodik asit-Shiff
PI-3K	:	Fosfoinositid 3-kinaz
PI	:	Preleptoten spermatosit
PLC-γ	:	Fosfolipaz-C- γ
PTK2	:	PTK2 kodlu protein tirozin kinaz
RNAi	:	RNA interferens
RT-PZR	:	Ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu
SB	:	Sıkı bağlantı
SH	:	Sertoli hücresi
SH2	:	Src homoloji 2
SH3	:	Src homoloji 3
siRNA	:	Küçük interferens RNA
SKH	:	Spermatogonyal kök hücre
SS	:	Standart sapma
ST	:	Seminifer tübül
T	:	Testis
TBK	:	Tübülobulbar kompleks
TEC	:	Tec ailesi protein kinaz
TER	:	Transepitelyal Elektrik Rezistans
US	:	Uzayan spermatid
YS	:	Yuvarlak spermatid
Z	:	Zigoten spermatosit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
1.1.1.	Çevresel toksik madde etkisi ile artan oksidatif stresin artışına bağlı olarak c-Src/ FAK yolağı üzerinden kan-testis bariyerinin bozulması	2
1.1.2.	KTB açılma-kapanma modeli	2
2.1.	Seminifer epitel hücre dağılımı	6
2.2.	Spermatogenez biyolojisinin şematik çizimi	7
2.2.1.	Sıçanda seminifer epitel döngüsü evreleri	10
2.3.	Sıçan seminifer epitelinde Sertoli hücresi iskeletinin temel elemanlarının devam eden spermatogenez evrelerindeki dağılımı	12
2.4.4.	Sıçanlarda BEÖ'lerin elektron mikrografları	18
2.4.6.	Apikal ve bazal ektoplazma özelleşmeler (sıçan)	20
2.4.7.	Tübülobulbar kompleksin şematik çizimi.	21
2.6.1.	Farklı FAK domeynlerinin şematik çizimi	27
2.6.2.	Sıçan testisinde seminifer epitelin anatomik özelliklerinin şematik çizimi	30
2.7.	Src-kökenli ezrin Y145 fosforilasyon geri bildirim mekanizması	32
2.7.1.	Ezrin, radiksin moesin ve merlin ailesi proteinlerinin fonksiyonel domeynlerinin ve fosforilasyon bölgelerinin şematik çizimi	33
3.4.	Sertoli hücrelerinin çift odacıklı birim içinde yerleşiminin şematik çizimi	41
4.1.1.	Erişkin sıçan testisinde ezrin protein ve mRNA ekspresyon düzeyleri	53
4.2.1.	Ezrinin erişkin sıçan testisinde seminifer epiteldeki lokalizasyonu	54
4.2.2.	Ezrinin ince bağırsakta duodenum bölgesindeki lokalizasyonu.	55
4.2.3.	Ezrinin sıçan testisinde ki hücresel lokalizasyonu.	56
4.3.1	Kadmiyum klorid (CdCl ₂) ile indüklenmiş testis modelinde seminifer epitel döngü evrelerine-özü ezrin yerleşiminin bozulduğunun immünoflüoresan ile gösterilmesi	56

4.3.2.	Kadmiyum klorid ile indüklenmiş testis modelinde ezrin-aktin etkileşiminin immünopresipitasyon yöntemi ile gösterilmesi.	57
4.3.3.	Sertoli hücrelerinde ezrinin F-aktin ile birlikte lokalizasyonu.	57
4.4.	Ezrin proteininin kan-testis bariyerindeki BEÖ, AEÖ, aktin düzenleyici ve hücre iskelet proteinleri ile yapısal etkileşiminin gösterilmesi	58
4.5.1.	Seminifer tübül evre VIII'de AEÖ'de, uzayan spermatidlerin konveks bölgelerinde ezrin yerleşimi	59
4.5.2.	Seminifer tübül evre VIII'de KTB'de ezrin yerleşimi	59
4.6.1.	Sertoli hücresi kültüründe (0.5×10^6) çiftli immünoflüoresan boyama	60
4.6.2.	Sertoli hücresi kültüründe (0.05×10^6) çiftli immünoflüoresan boyama	61
4.7.	Kadmiyum klorid uygulanan Sertoli hücrelerinde ezrin protein düzeyleri ve F-aktin ile birlikte lokalizasyonları	62
4.8.1.	Ezrine-özgü siRNA çiftleri ile gen baskılanması sonrası Sertoli hücresi kan-testis bariyerindeki sıkı bağlantı/BEÖ, aktin bağlayıcı proteinler ve sinyal proteinlerinin immüno blot sonuçları	63
4.8.3.	Ezrine-özgü siRNA çiftleri ile gen baskılanması ile Sertoli hücresi kan-testis bariyerindeki sıkı bağlantı/BEÖ, aktin bağlayıcı proteinler ve sinyal proteinlerinin immüno blot sonuçları grafiksel analizleri	65
4.9.1.	Sertoli hücrelerinde ezrin geni baskılanması ile ezrinin yerleşimindeki ve lokalizasyonundaki değişikliklerin immünoflüoresan bulguları	67
4.9.2.	Ezrin proteini flüoresan sinyal yoğunluğunun (Image-J) ile ölçümü	68
4.10.	Sertoli hücresi kültürü günlerine bağlı olarak KTB geçirgenliğindeki değişiklikler	69
4.11.	RT-PZR deneyleri ile ezrin ekspresyonunun mRNA düzeyinde azaldığının gösterilmesi	70

4.12.1.	Ezrin geninin <i>in vivo</i> baskılanması ve ezrin etkinliğinin RT-PZR sonuçları	71
4.12.2.	Ezrin geninin <i>in vivo</i> baskılanması ve hedef KTB proteinlerinin immüno blot sonuçları	71
4.12.3.	Ezrin geninin <i>in vivo</i> testiste baskılanması ile Sertoli hücresi KTB'nde ki ilişkili protein düzeylerinin gösterilmesi	72
4.13.1.	Ezrin geninin baskılanmasının etkinliğini gösteren immüno flüoresan bulguları	72
4.13.2.	Ezrin geni <i>in vivo</i> baskılandığında spermatid polaritesindeki bozulmanın immüno flüoresan sonuçları	73
4.14.	Testis parafin kesitlerinde hematoksilin-eozin boyanması	75
4.15.1.	Kan-testis bariyeri bazal EÖ'lerdeki protein yerleşimleri	76
4.15.2.	Şekil 4.15.1'de yer alan flüoresan sinyallerin yoğunluğunun grafiksel analizleri	77
4.15.3.	İnterstisyel aralığa FITC- inülin verilerek adlüminal kompartmandaki flüoresan işaretlerin dağılımı incelenerek kan-testis bariyeri bütünlüğünün değerlendirilmesi	78
4.16.1.	Ezrin geninin baskılanması ile AEÖ'de ki aktin bağlayıcı ve düzenleyici proteinlerin yerleşimlerinde ki değişiklikler	80
4.16.2.	Şekil 4.16.1'de ekspresyon paterni gösterilen proteinlerin flüoresan yoğunluğu ölçümleri	81
4.16.3.	Ezrin geninin baskılanması ile AEÖ'deki apikal adezyon molekülleri proteinlerin yerleşimlerindeki değişiklikler	82
4.16.4.	Şekil 4.16.3'de ekspresyon paterni gösterilen proteinlerin flüoresan yoğunluğu ölçümler	83
5.1.	Ezrinin, sıçan kan-testis bariyerini oluşturan apikal ektoplazma özelleşmelerindeki rolünün şematik çizimi	89

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo		Sayfa
3.6.	İmmünoblot, immünopresipitasyon, immünoflüoresan ve immünohistokimya deneylerinde kullanılan antikorlar	44
3.9.	RT-PZR deneylerinde kullanılan primer çiftleri	48
4.14.	Ezrin geninin <i>in vivo</i> baskılanmasının seminifer tübülde histolojik yansımaları	74

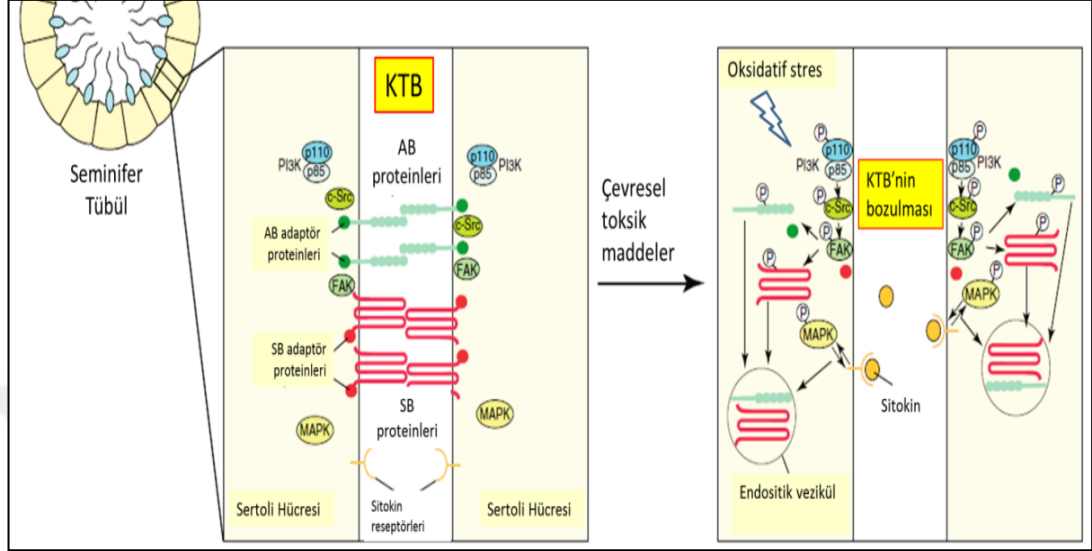


1. GİRİŞ

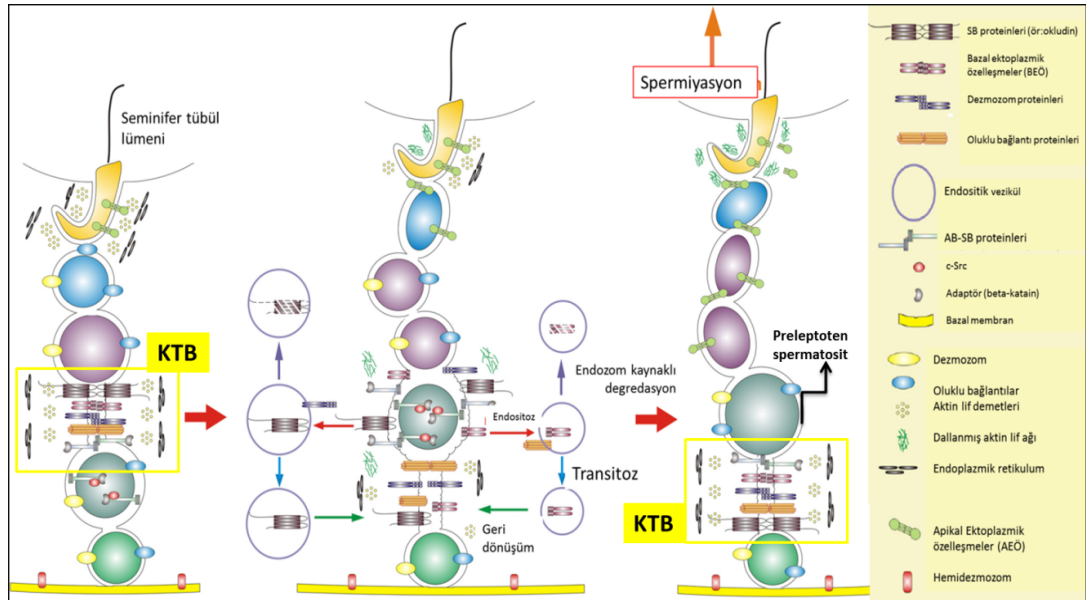
1.1. Hipotezin Temeli ve Amaç

Testis seminifer epitelinde, komşu iki Sertoli hücrelerinin bazal membran yakınında oluşturduğu kan-testis bariyerinin alt kompartmanı olan bazal kompartmanında tip A spermatogonyumların mitoz bölünmeler geçirmesi ile spermatogenez başlar. Tip B spermatogonyumların primer spermatositlere farklılaşması ve preleptoten spermatositlerin KTB'nin üst kompartmanı olan adlüminal kompartmana geçerek spermiyogenez aşamasında spermatozoaya farklılaşacak olan yuvarlak spermatidleri oluşturması ile devam eder. Spermatogenez süreci oldukça karmaşıktır ve fertilizasyon yeteneği için yeterli sayıda ve sağlıklı spermatozoa üretiminde gerekli önemli faktörlerden biri; kan-testis bariyerinin bütünlüğü ve devamlılığıdır. Kan-testis bariyeri, bazal membranın yakınındaki seminifer epitelde yer alan komşu Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar (SB), testise-özümlü adherens bağlantılar (AB) olarak da bilinen bazal ektoplazma özelleşmeler (BEÖ) ve oluklu bağlantıların (OB) bir araya gelmesi ile oluşmuş önemli bir yapıdır (Cheng ve Mruk 2009). Aktin lif demetleri ile bağlantılı SB'lar ve BEÖ'ler, gelişen germ hücreleri ile kan arasında bir engel oluştururlar. KTB'nin bozulması, primer spermatositin sonraki gelişim aşamalarının gerçekleştiği özel mikro çevrenin ve Sertoli-germ hücreleri arasında bulunan apikal ektoplazma özelleşmelerinin (AEÖ) bozulmasına, dolayısıyla prematür durumdaki ve fertilizasyon için yetersiz spermatidlerin serbest bırakılmasına ve infertiliteye neden olmaktadır (Wong ve Cheng 2011). KTB'nin bu dinamiğini açıklayan, "açılma-kapanma" mekanizması olarak da tanımlanan güncel bir model Cheng ve arkadaşları tarafından ortaya konmuştur (Cheng ve Mruk 2009) (**Şekil 1.1.1**). Bu modelde, PI3K (fosfatidilinositol 3-kinaz) aracılı c-Src'nin (hücrel-Rous sarcoma virüsün sarkoma-indüklü geni) FAK'ı (fokal adezyon kinaz) aktive ettiği ve sonuç olarak FAK'ın fosforillenmesi ile KTB'nin bozulduğu gösterilmiştir. FAK'ın fosforillenmesi sonucunda, SB ve AB'ların hücre içine alınarak polarite proteinleri tarafından endositozla veziküllerde toplanması, ardından da bu veziküllerin endozom-kaynaklı interselüler degradasyona uğramasına bağlıdır.

KTB'nin bütünlüğünün PI3K/c-Src/ FAK sinyal yolağı aracılığı ile bozulduğu kanıtlanmış ve bu sinyal yolağının, oksidatif stresin artışıyla ilgili olarak aktif hale geldiği gösterilmiştir (Wong ve Cheng 2011) (Şekil 1.1.2.).



Şekil 1.1.1. Çevresel toksik madde etkisi ile artan oksidatif stresin artışıyla ilgili olarak c-Src/ FAK yolağı üzerinden kan-testis bariyerinin bozulması (Wong ve Cheng 2011).



Şekil 1.1.2. KTB açılma-kapanma modeli. Preleptoten spermatozoidin geçişi için "eski" KTB'nin yıkılması ve geçişin ardından spermatozoidin arkasında oluşan "yeni" KTB (Wong ve Cheng 2011).

Bu tezin amacı; *in vitro* model kullanarak KTB dinamiklerini anlamak, bariyerin bozulmasında etkili olan sinyal yollarını araştırarak altında yatan mekanizmayı aydınlatmak ve hangi düzenleyici proteinler etkisinde değiştiğini belirlemektir. Amacımız doğrultusundaki bu çalışmada amaçlarımız kapsamında gerçekleştirdiklerimiz aşağıda yazdığımız maddelerde kısaca özetlenmiştir:

- 1- Sertoli hücresi kültüründe, özel bir kültür kabı sistemi (çift odacıklı birim) kullanılarak kan-testis bariyerinin oluşturulması sağlanmıştır. TER ölçümleri kullanılarak, bariyerin oluşumu kontrol edilmiştir. *In vivo*'yu çok iyi taklit eden kültür ortamında oluşturulacak *in vitro* KTB modelinde, komplementer DNA (cDNA) tasarımı, RNAi teknolojisi ile small interfering RNA (siRNA) çiftlerinin hazırlanması ve hücreye transfeksiyonu gibi son teknolojiler kullanılarak Sertoli hücrelerinde düzenleyici hedef proteinlerin bölge-özü mutagenezi gerçekleştirilmiştir.
- 2- İkinci hedef olarak, her bir deney için gerekli sayıda Sertoli hücresi kültürü ile *in vitro*, deney hayvanları ile *in vivo* deney grupları oluşturulmuştur. *In vitro* deney grupları: (i) KTB oluşturulmuş ve RNAi teknolojisinde kullanılan aracı ve kontrol RNAi ile muamele edilmiş **kontrol RNAi Sertoli hücresi grubu**, (ii) RNAi teknolojisi kullanılarak hazırlanan c-Src substratı olan ezrin geninin baskılandığı **ezrin RNAi Sertoli hücresi grubu**. *In vivo* deney grupları: (i) Erişkin sıçanlara uygulanan RNAi teknolojisinde kullanılan aracı ve kontrol RNAi ile muamele edilmiş **kontrol RNAi testis grubu**, (ii) RNAi teknolojisi kullanılarak hazırlanan ezrin geninin baskılandığı **ezrin RNAi testis grubu** oluşturulmuştur.

- 3- Bir sonraki aşamada; gruplar arası değişkenler, immünoiblot, ko-immünopresipitasyon, KTB bütünlüğü ölçümleri ile belirlenmiştir. KTB düzenleyici proteinlerinin her bir gruptaki durumu çift-işaretili immünoflüoresan analizleri ile değerlendirilerek fotoğraflanmıştır.
- 4- Hedeflenen son aşama; elde edilen verilerin bir araya getirilmesi, istatistiklerinin yapılması ve yorumlanması sonrasında tüm bulguların literatüre sunulması şeklinde gerçekleştirilmiş ve bu çalışmaya ait 2 derleme ve 1 orijinal makale yayınlanmıştır.

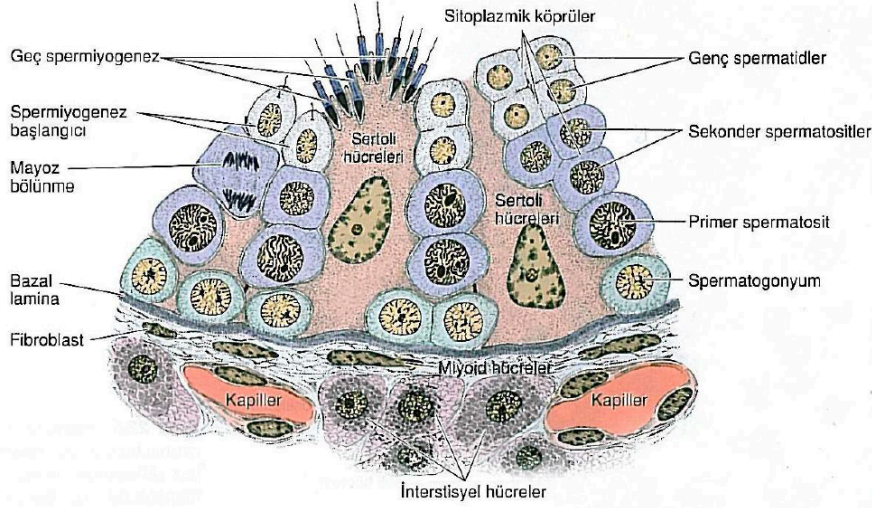


2. GENEL BİLGİLER

2.1. Testis Histolojisi

Testisler karın boşluğunun dışında skrotum içinde yer alan bir çift organdır. Bu yerleşimleri testislerin vücut ısısından 2-3°C derece düşük bir ısıda olmalarını sağlar. Normal spermatogenez için 34-35°C gereklidir. Testisler rete testisin bulunduğu yerde kalınlaşarak mediastinumu oluşturan tunika albugina ile çevrenir. Mediastinumdan testislere doğru uzanan fibröz septumlar dokuyu 250-300 lobçuğa böler. Her bir lobçuk 1-4 seminifer tübülü içerir. Her bir seminifer tübül yaklaşık 150 mikrometre çapta ve 80 cm uzunluktadır; iki ucu U şeklinde olan ve rete testise açılan tüplerdir (Ünlükal 2011).

Rete testis, seminifer epitelin ürünlerini (testiküler sperm, salgısal proteinler ve iyonlar) toplayan kanallar ağıdır. Seminifer tübül iki belirgin hücre popülasyonunu içeren özelleşmiş seminifer epitel ile döşeli merkezi bir lümeden oluşur (Junqueira LC 2006). Seminifer tübül çok sıralı olan germinal ya da seminifer epitel ile döşelidir Epitel ince bir bazal lamina üzerine oturmuştur ve dıştan özelleşmiş fibröz doku ile sarılıdır. Seminifer tübülleri çevreleyen fibröz dokuya peritübül doku ya da membrana propria denir. Membrana propria, seminifer tübüllere desteklik yapar ve tübül hücrelerini dış etkenlerden korur (Christensen ve Fawcett 1966). Seminifer tübül fibröz bir bağ dokusu kılıfı, belirgin bir bazal lamina ve karmaşık bir germinal ya da seminifer epitelden oluşur. Seminifer tübülü saran fibröz tunika propria birkaç fibroblast katmandan oluşmuştur. Bazal laminaya yapışık olan en içteki katman, düz kas özellikleri de gösteren yassılaştırmış miyoid hücreler içerir. Seminifer epitelde iki tip hücre vardır. Sertoli ya da destek hücreleri ile spermatogenik seriyi oluşturan hücreler; spermatogenik seri hücreler 4-8 tabaka halinde düzenlenmiştir (**Şekil 2.1**); işlevleri spermatozoonlar üretmektir. Spermatozoon üretimi, 'spermatogenez' olarak adlandırılır. Bu süreç, mitoz ve mayoz hücre bölünmeleri içerir ve hücreler sonunda spermatozoonlara farklılaşır; bu aşama spermiyogenez olarak adlandırılır (Junqueira LC 2006).



Şekil 2.1. Seminer epitel hücre dağılımı (Junqueira LC 2006)

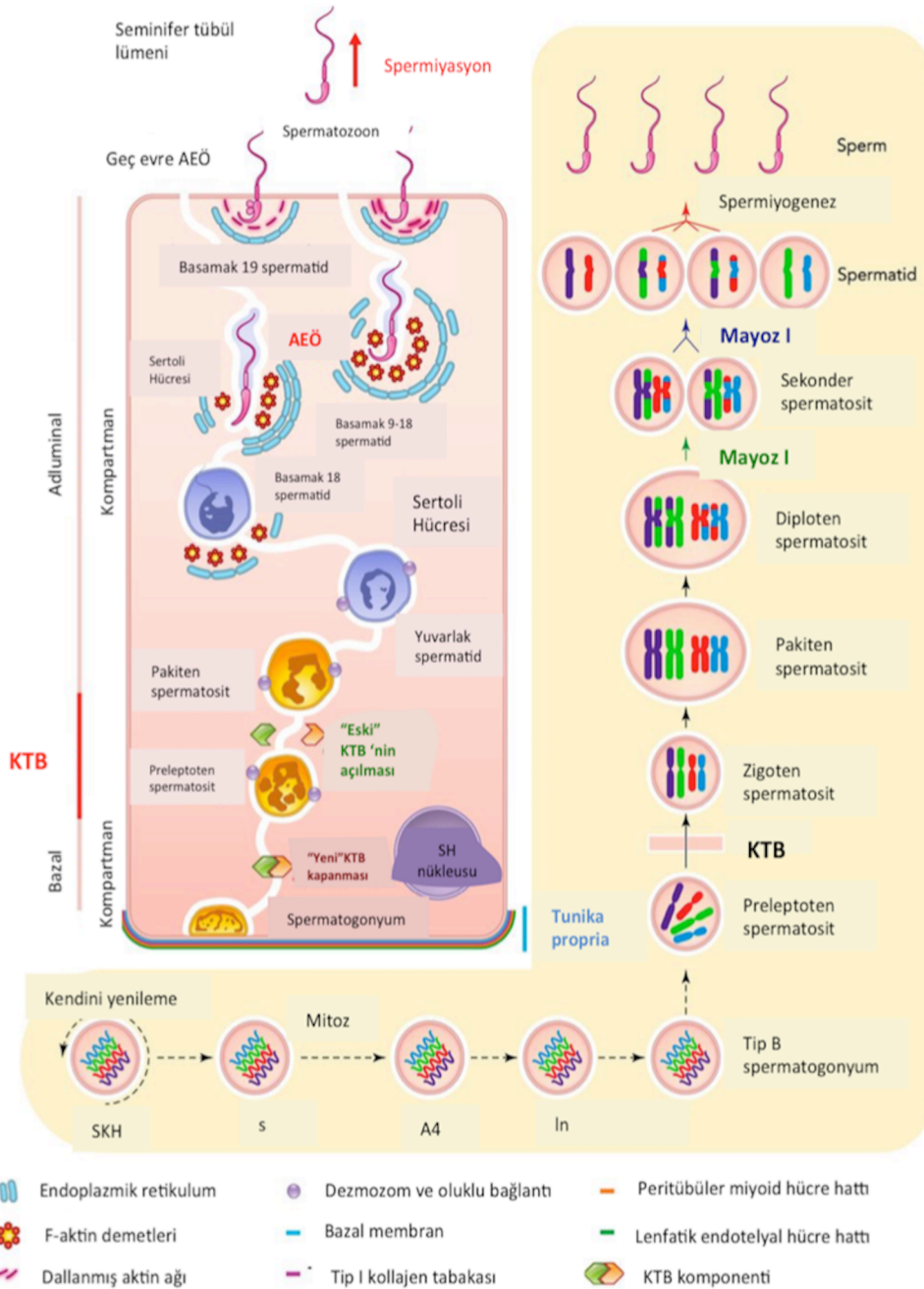
2.2. Spermatogenez biyolojisi

Seminifer tübüller testisin, bir insanın puberteden (yaklaşık 12 yaş) sonra tüm hayatı boyunca günde yaklaşık 300-400 milyon spermatozoa üretilmesini sağlayan işlevsel birimdir. Spermatogenez, tunika propria üzerindeki Sertoli ve germ hücrelerinin yer aldığı seminifer tübül içerisinde gerçekleşir (**Şekil 2. 2.**).

Spermatogenez kompleks, koordine ve devamlılığı olan spermatogonyumdan olgun sperm oluşumuna kadar gerçekleşen bir süreçtir. Sıçanlarda, ilk spermatogenik dalga doğumdan birkaç gün sonra başlar. Gonositler (prespermatogonya) proliferasyon yeteneklerini yeniden kazanırlar ve farklanmamış spermatogonyum ya da spermatogonyal kök hücre (SKH) haline gelirler. Spermatogonyal kök hücreler farklılaşma sürecine başladıklarında, altı başarılı mitotik bölünmeye gider ve mayotik spermatositleri oluşturur. Spermatositler iki ardışık bölünme ve tek döngü DNA replikasyonu ile haploid spermatide dönüşürler. Son basamak ise, spermatidlerin spermatozaya dönüştüğü spermiyogenez aşamasıdır.

Bazal membran yakınındaki spermatogonyal kök hücrelerden köken alan spermatogonyum, spermatogenez sürecine başlayarak As (single) spermatogonyaya farklılaşır ve A1-A4 ile devam eder. A1-A4 spermatogonya, kan-testis bariyerini (KTB) seminifer epitel döngüsünün evre VIII'inde geçmesi gerekli olan tip B spermatogonyum, preleptoten spermatosite dönüşene kadar ara (In)

spermatogonyumlara farklılaşmaya devam eder. KTB ayrıca, seminifer epiteli adlüminal ve bazal kompartman olarak ikiye bölmektedir. Mayoz I ve II ve bütün hücrel postmayotik gelişim olayları spermiyogenez ve spermiyasyon olarak bilinmektedir ve adlüminal kompartmanda gerçekleşmektedir. Bu süreçte, milyonlarca spermatozoa düzenlenir ve seminifer tübül lümen kenarına ulaşması sağlanır. Böylece olgun sperm seminifer tübülden epididimiste hareket kabiliyeti kazanmak üzere salınır (Xiao ve ark. 2014).



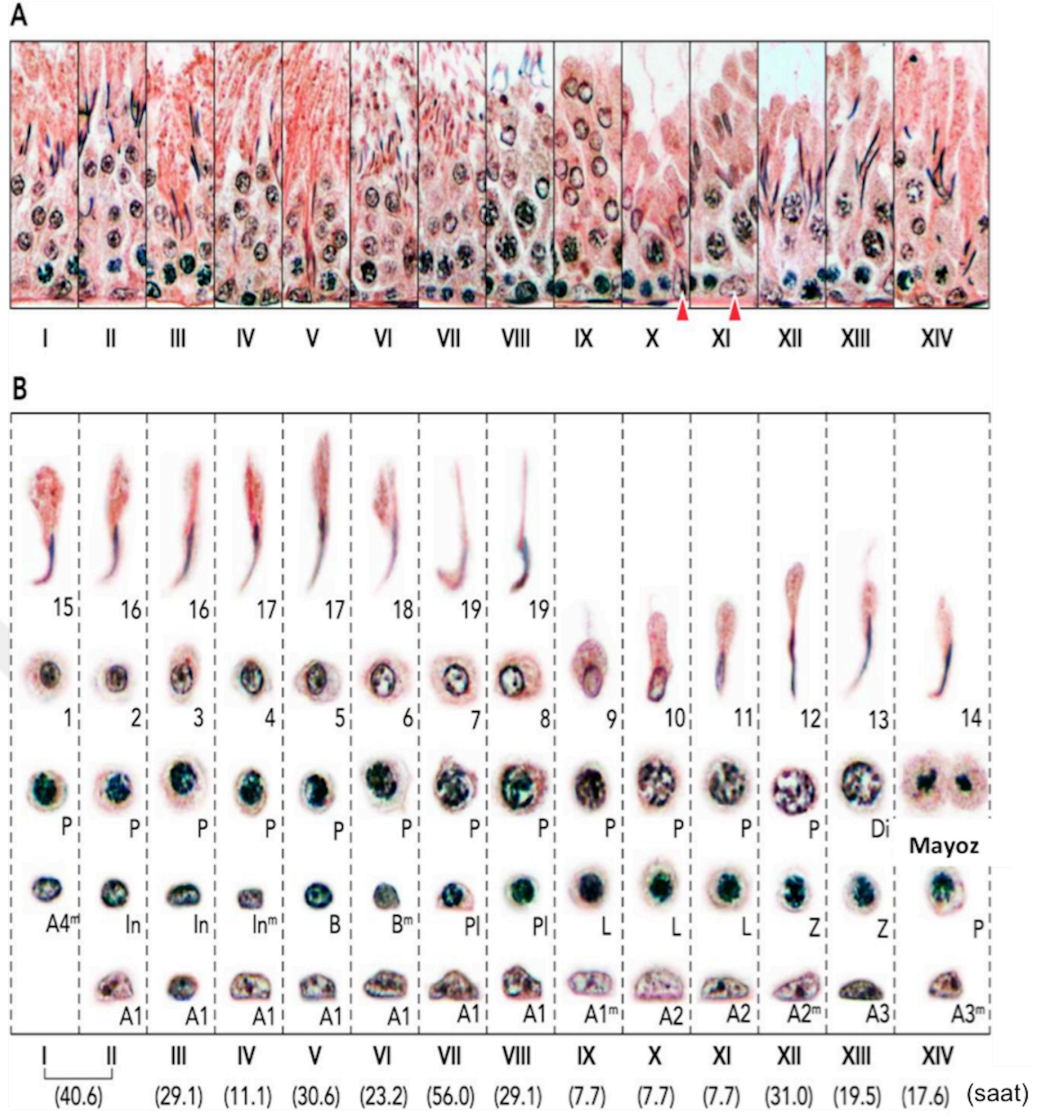
Şekil 2.2. Spermatogenez biyolojisinin şematik çizimi (Xiao ve ark. 2014)

2.2.1. Sıçanlarda seminifer epitel döngüsünün evrelendirilmesi

Spermatogenez sırasında döngüsel pek çok hücrel olay gerçekleşmektedir. Spermatogenezin seminifer epitel döngüsünün işleyişi, periyodik asit-Shiff reaksiyonu (PAS) ile seminifer tübülde gelişen spermatidlerin gözlemlenmesi prensibine dayanır (Leblond ve Clermont 1952, Clermont ve Harvey 1965). Germ hücreleri gelişimlerinin farklı evrelerinde Sertoli hücreleri ile birlikte paralel bir dağılım göstererek evreye-özü bir patern oluşturmaktadır. Sıçanlarda, evre I ile XIV arasında gerçekleşen, germ hücre tiplerinin bulunduğu ve özün hücrel olayların gerçekleştiği tipik seminifer epitel döngü **Şekil.2.2.1.**'de anlatılmıştır. Spermatogenezin seminifer epitel döngüsü, germ hücrelerinin seminifer tübül içersinde kırmızı ok ile gösterilen Sertoli hücreleri eşliğindeki döngüsel dağılımı olarak tanımlanan spermatogenez sürecini kapsamaktadır (Leblond ve Clermont 1952). Sıçan testisinde seminifer epitel döngüsü evre I ile XIV arasında iken farede I-XII ve insanda ise I-VI şeklinde organize olmuştur (Amann 2008, Hess ve Renato de Franca 2008, Mruk *ve ark.* 2008).

Döngünün her bir evresi o evreye özün germ hücreleri ve Sertoli hücresi dağılımı göstermektedir. Her bir evrede farklı germ hücresi tipleri bulunmaktadır (**Şekil 2.2.1.**). Örneğin, sıçan seminifer epitel döngüsünde, yaklaşık 29.1. saatin sonunda, basamak 19 spermatidler tübül lümenine yakın apikal bölgede evre VIII'e özün olarak spermiyasyon için hazırlanırken aynı zamanda evre VII'de ilk defa beliren preleptoren spermatosit kaynaklı tip B spermatogonyum, evre VII-VIII'de KTB'den taşınarak bazal kompartmandan apikal kompartmana geçer. Bu nedenle, evre VIII'de sadece tip A1 spermatogonya, preleptoten spermatosit, pakiten spermatosit ve basamak 8 ve 19 spermatidler bulunmaktadır. Ayrıca, mayoz sadece evre XIV'de gerçekleşir. Özetle, sıçanlarda evre I'den evre XIV'e kadar tüm epitelyal döngünün tamamlanması yaklaşık 12.9 gün sürer. Ancak, evre II'deki tip A1 spermatogonyum, evre VIII'deki basamak 19 spermatide epitelyal döngü boyunca yaklaşık 4.5 kere dönüşmektedir, bu da sıçanlarda yaklaşık 58 günde sonlanır.

Germ hücreleri seminifer epitel döngü sırasında, seminifer tübül bazalinden luminal kenarına kadar taşınmasına rağmen, interstisiyal alanda yer alan fibroblastlar, makrofajlar ve nötrofiller motil hücreler değildirler çünkü lamelliopodya ve filopodya yapılarından yoksunlardır. Lokomatif görevi için, gerek Sertoli hücreleri gerekse germ hücreleri Arp2/3 protein kompleksi ve diğer hücre iskeleti düzenleyici proteinlerini sentezlerler. (Wong ve Cheng 2009, Cheng ve Mruk 2011, Cheng ve Mruk 2011, Tang *ve ark.* 2013). Evre IV'de apikal kompartmanın luminal kenarına taşınan basamak 17 spermatidler, evre V'de epitelin bazaline, bazal kompartmanın yanına geri taşınırlar; evre VI'da adlüminal kompartmana tekrar taşınmadan önce basamak 18 spermatidlere farklılaşırlar ta ki basamak 19 spermatidler evre VII'da lümen kenarına dizilip evre VIII'de salınmak için hazırlanana kadar ve spermatozoaya dönüşene kadar bu farklılaşma devam etmektedir.



Şekil 2.2.1. Sıçanda seminifer epitel döngüsü evreleri (Xiao ve ark. 2014). A, Seminifer tübül evreleri; PAS boyası. B, A’da gösterilen evrelere özgü germ hücresi tipleri. A1, tip A1 spermatogonyum; A1^m, mitozaya giren tip A1 spermatogonyum; In, “intermediate” ara spermatogonyum; In^m, mitozaya giren ara spermatogonyum; B, tip B spermatogonyum; B^m, mitozaya giren tip B spermatogonyum; Pl, preleptoten spermatosit; Di, diploten spermatosit; L, leptoten spermatosit; Z, zigoten spermatosit; P, pakiten spermatosit; 1-19, spermiyogenez sırasında morfolojik değişiklikler geçiren basamak 1’den 19’a kadar olan spermatidler; A1- A4 aralığı: farklı morfolojiye sahip mayoz geçiren germ hücreleri.

2.3. Sertoli hücresi ve hücre iskeleti

Memeli Sertoli hücrelerinin hücre iskeleti diğer pek çok hücre ile karşılaştırıldığında en ayrıntılı çalışan ve hücre iskeleti dinamiğine sahip olan hücredir. Aktin filamanları, ara filamanlar ve mikrotübüller Sertoli hücresi içinde farklı dağılım biçimleri sergilerler ve bu durum spermatogenez sırasında değişiklik gösterir. Bunların, Sertoli hücrelerinin arasında süregelen sperm oluşumu ile spermatositlerin hareketlerinin düzenlenmesi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

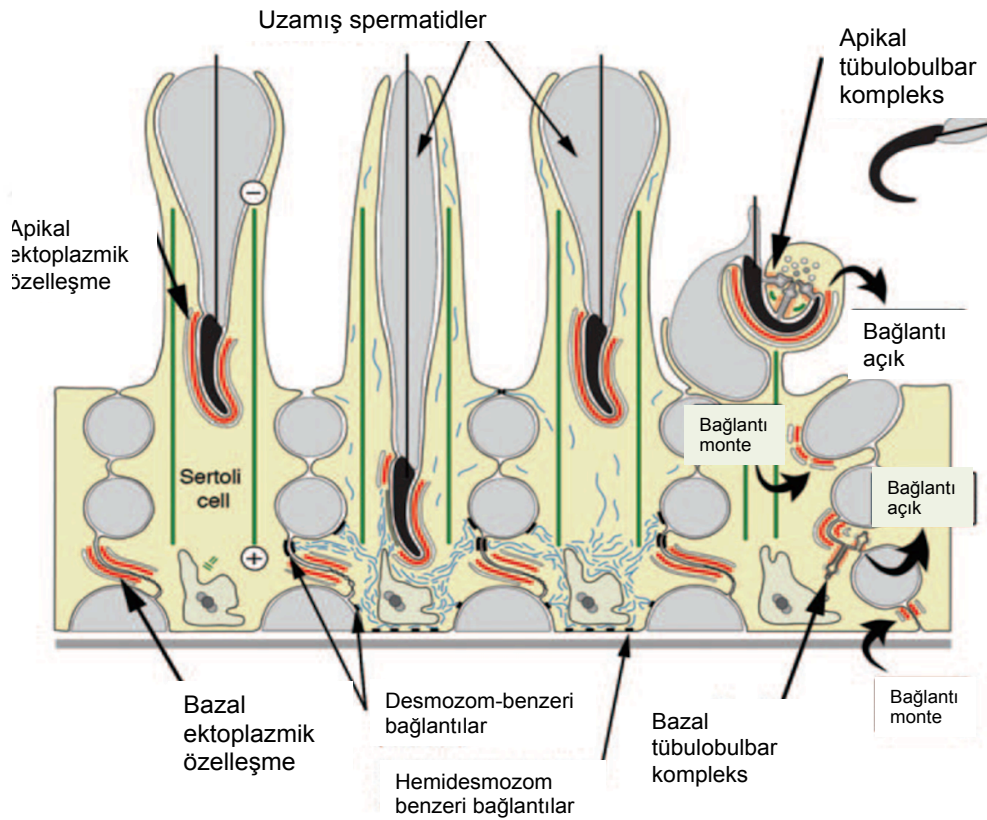
Perinükleer ağ içinde oluşan ara filamanlar Sertoli hücreleri ile intertisiyel alan hücreleri arasında desmozom benzeri periferik uzantılar oluşturmaktadır. Aynı zamanda Sertoli hücreleri bazal lamina ile de hemidesmozom benzeri bağlantıları oluşturmaktadırlar. Ara filamanların keratin tarzında olduğu epitelin çoğunun aksine, olgunlaşmış Sertoli hücrelerinin ara filamanları vimentin tipindedir. Sertoli hücrelerindeki ara filamanların işlevi tamamen açık olmamakla birlikte, filaman dağılım biçimi ve elde edilen deneylerin sonuçlarına göre hangi sinyal yollarının etkin olduğu bilinmektedir (Cheng 2008). Mikrotübüller Sertoli hücrelerinde bol miktarda bulunmaktadır ve hücrenin uzun aksına paralel biçimde ağırlıklı olarak yer almaktadırlar. Mikrotübüller Sertoli hücrelerinin kolonumsu yapısını korumada rol alırlar. Ayrıca sitoplazmada hücre organellerinin nakli ve yerleşimi ile seminifer tübülde sperm salınımı ile de ilgilidirler. İlaveten, hücreler arası birleşimlerin yanı sıra mikrotübül-bazlı nakil aracı da epiteldeki birbirine yakın spermatidlerin yer değiştirmeleri ve konumlanmaları ile ilgili işleve sahiptir. Sertoli hücrelerinin hücre iskeleti genel olarak diğer adeziv hücreler ile ortak yapısal ve işlevsel benzerlikler gösterse de, bazı özellikler kendine özgüdür ve spermatogenez süreci ile ilişkilidir.

Sertoli hücresi iskeleti aktin filamanlarından, ara filamanlardan ve mikrotübüllerden oluşmaktadır. Bu filamentöz polimerler ilgili moleküllerin varlığı ile ilişkilidir ve bahsi geçen moleküller çözülebilen altbirimler ile polimerlerin dengesinin sağlanmasına yarar. Bunun oluşumu ise polimerlerin benzerleri ya da farklı olanlar ile bağlanması ve de değişik moleküllerin, karma proteinlerin ve hücre organellerinin hücrelerdeki taşınması ve yerleşimi ile oluşur.

Hücre iskeleti sadece hücre şeklini belirlemez aynı zamanda hücre bölünmesini,

hücreler arası iletişimi, hücre hareketleri ile doku organizasyon ve entegrasyonunun oluşturulup korunmasında rol oynar. Bunlar aynı zamanda dinamiklerdir. Diğer bir deyişle, spermatogenez (Amlani ve Vogl 1988) sırasında organizasyonel yapıları değişiklik gösterir. İlginç olan ise hücre iskeletinin üç elementinin de en azından kısmen hücreler arası bağlantı ile ilişkili oluşudur. Bu, aynı zamanda, seminifer epiteldeki spermatogenik hücrelerin yer değişimi, yerleşimi ve tutunmalarında önemli rol oynar.

Hücreler arası birleşimler ile bununla ilişkili özel yapılar arasındaki bağlantılar, hücre iskeletinin de sperm salınım mekanizmasında ve spermatositlerin bazal Sertoli iç bağlantılarında hareket etmesi ile ilgili rolü olabileceğini göstermektedir zira bu hücreler epitelin bazal kompartmanından apikal (apikal) kompartmanına hareket ederler. Sertoli hücrelerinde aktin filamanları, ara filamanlar ve mikrotübüller bol miktarda bulunmaktadır ve belirli bölgelerde yoğunlaşmışlardır (Şekil 2.3.).



Şekil 2.3. Sıçan seminifer epitelinde Sertoli hücresi iskeletinin temel elemanlarının devam eden spermatogenez evrelerindeki dağılımı (Cheng 2008).

2.3.1. Sertoli hücresi bağlantılarının yapısal bileşenleri

Son zamanlarda, kan testis bariyerinin bir bölümünü oluşturan Sertoli hücresi bağlantılarının protein bileşenleri hakkında çok fazla bilgi elde edilmiştir. Ana bileşenler okludin, klaudin, zonula okludens (ZO) ve bağlantısal adezyon molekülleri (JAM) dir. Okludin, klaudin-11 ve JAM-1 transmembran proteinlerdir ve bunların ekstraselüler kısımları sıkı bir bağ kuracak şekilde komşu Sertoli hücresinin benzer yapısı ile 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 (Toyama *ve ark.* 2001). Okludin 60/65 kDa ağırlığında bir transmembran proteindir ve bir intraselüler ve iki ekstraselüler olmak üzere membranı dört kez kateder. Sıçanlarda ve farelerde Sertoli hücrelerinin arasındaki sıkı bağlantı yerlerinde bulunmaktadır. Fakat kobayda ve insanlarda bulunmamaktadır (Ng 1999). Okludin geninin nokta mutasyonunu taşıyan farelerde testisler normal gelişim gösterir fakat fareler 40-60 haftalık olduklarında, seminifer tübüller atrofik olur ve germ hücrelerinin hepsi kaybedilir (Le *ve ark.* 2002). Bu nedenle, okludinin spermatogenezden çok önce, embriyonik gelişiminin 13.gününde fetal testiste oluşması ilginçtir. Bu da göstermektedir ki okludinin bariyer oluşumundan farklı işlevleri bulunmaktadır. Sıçanlarda doğum sonrası yaklaşık 5. günde okludinin yerleşimi yüksektir. Okludin daha sonra Sertoli hücrelerinin yan plazma membranına yerleşir. Daha sonra 14.günde sıkı bağlantılara yakın olan epitelin bazalinde ki yerleşimi yoğun şekilde kendini gösterir (Russell *ve ark.* 1989). Okludinin ikinci ekstraselüler Sertoli hücresi tarafından geri kazanım zamanına denk gelecek şekilde farelere 22-amino asit sentetik peptit enjekte edilmesi ile birlikte kan testis bariyeri etkilenir ve spermatogenez bozuntuya uğrar (Coulombe *ve Wong* 2004). Klaudinler 20 proteinden oluşan bir ailedir ve yaklaşık olarak 22 kDa'dır (Fudge *ve ark.* 2003) ve klaudin-11 Sertoli hücrelerinin arasındaki sıkı bağlantı yerlerinde bulunur fakat öncelikle fetal testiste görülür.

Klaudin-11 geni silinmiş erkek fareler infertildir ve bu hayvanlarda sıkı bağlantılar bulunmamaktadır (Fuchs ve Cleveland 1998). İntegrinlerin testiküler hücrelerle ekstraselüler germ hücreleri arasındaki bağlantılarla ilişkili oldukları düşünülmektedir (Toyama *ve ark.* 2001) fakat integrin $\alpha 6\beta 1$ 'in Sertoli hücresi bağlantılarında ve özellikle spermatogenezin belli aşamalarında ve Sertoli hücresi içeren testislerde (Franke *ve ark.* 1979) bulunduğu dair bulgular (Worman ve Courvalin 2005) elde edilmiştir.

2.4. Kan-testis bariyeri (KTB) tanımı ve işlevleri

Kan testis bariyeri, ilk kez Chiquoine (Chiquoine 1964) tarafından kadmiyumun testis üzerindeki etkileri üzerine yazılan bir makalede yer almıştır fakat böyle bir bariyerin olduğunun yirminci yüzyılın ilk yıllarından bilindiğine dair kanıtlar bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda, hayvanlara boya maddesi enjekte edildiğinde, bunların dokuların çoğunu boyadığı fakat beyin ve testisin seminifer tübüllerine etki etmediği görülmüştür. Bu gözlem ele alınarak kan-beyin bariyerinin (Rubin ve Staddon 1999) temelini oluşturmak üzere geliştirilmiştir daha sonra Kormano *ve ark.* nın çalışmalarında önceki gözlemlerin testis üzerindeki etkilerinin önemi anlaşılabilmiştir (Kormano 1967). Boyaların, puberte öncesindeki hayvanlarda dağılım gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca, Kormano interstisyel hücrelerin akriflavin ile işaretlenmesinin puberte dönemine denk geldiğini bulmuştur ve bu durum kan damarlarında da bir değişiklik olduğuna işaret etmektedir. Kormano'nun çalışmaları ile hemen hemen aynı zamanda, Waites ve Cheng, rubidyumlu indikatör ile ölçülen testis kan akımının iyodoantipirine kıyasla çok daha düşük değerler verdiğini tespit etmiştir. Aynı şekilde benzer değerler beyin (Waites ve Setchell 1966) dışındaki organların çoğunda bulunmuştur. Bu ise rubidyumun beyinde olduğu gibi testisin de bazı kısımlarından belirli ölçüde ayrı tutulduğunu göstermektedir. Yine aynı zamanda, Waites ve Cheng koyunların rete testisinden (Voglmayr *ve ark.* 1966, Voglmayr *ve ark.* 1967, Setchell *ve ark.* 1969) ve sığanların rete testisleri ile seminifer tübüllerinden (Tuck *ve ark.* 1970) sıvı toplanabilmesi için teknikler geliştirmişlerdir ve hem rete testis hem de seminifer tübül yapılarının, kan plazmasından veya testiküler lenflerden belirgin şekilde farklılık gösterdiği tespit edilmiştir.

Böylesi değişiklikler özellikle inozitol (Setchell *ve ark.* 1968, Hinton *ve ark.* 1980) benzeri ufak hidrofilik organik bileşenler muhafaza edilebilirler zira testis içindeki farklı sıvı bölümleri arasında serbest iletişim olmadığına dair kanıtlar bulunmaktadır. Bu ise farklı radyoaktif işaretleyicilerin boğalarda kan dolaşımından rete testise (Setchell *ve ark.* 1969) ve de sıçanlardaki rete testis ve seminifer tübüle (Setchell ve Wallace 1972, Waites *ve ark.* 1973) geçiş hızı üzerine yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur.

Kan damarlarındaki sıvı ile seminifer tübüllerin arasında üç çeşit hücre bulunmaktadır. Bunlar kan damarlarındaki endotelial hücreler, peritübüler hücre ve Sertoli hücreleridir. Sertoli hücreleri, tübül lümenine kadar uzanabilen tek hücredir ve bu durum ya Sertoli hücresinin temeli ile seminifer epitel arasında gelişen germ hücreleri ya da bir çift Sertoli hücresi ile Sertoli hücresinin lüminel yüzeyinde bulunan kriptler arasındaki hücreler arası kısımda gelişen germ hücreleri ile sağlanmaktadır (Fawcett 1975). İşte bu yapı KTB'nin temelidir. Her üç tip hücre de tübüllere maddelerin geçiş hızını etkileyebilmektedir (Ploen ve Setchell 1992) fakat en büyük görev Sertoli hücrelerindedir.

2.4.1. Kan-testis bariyeri ve aktin filamanları

Aktin, ökaryotik hücrelerde çok miktarlarda görülen bir proteindir ve sitokinez, hücre hareketi, hücreler arası geçiş, hücre kutuplaşması ile hücre-hücre ya da hücre-substratı bağlantıları gibi temel işleyişler ile ilişkilidir (DeMali ve Burridge 2003, Bos 2005, Winder ve Ayscough 2005). Aktin monomerleri globüler proteinlerdir ve normal çekirdekleşme koşulları altında 5-8 nm çapında kutupsal filamanlara polimerleşirler. Altmıştan fazla çeşit aktin bağlayıcı protein bulunmaktadır ve bunlar aktin monomerlerine ayırırlar ve çekirdekleşirler, ayırırlar, stabilize olurlar, çapraz bağlantı kurarlar ve filamanlar boyunca hareket ederler (Pollard 1999). Aktin filamanları boyunca oluşan hareketlerle ilişkili aktin-bağımlı motor proteinleri miyozinlerdir (Mooseker ve Cheney 1995). Hücrelerden aktin filaman yapıları ile ilgili iki ana modelleme bulunmaktadır. Bunlardan birisi Arp2/3 kompleks yapısıdır ve üç boyutlu ağlar şeklinde dallanmış aktin filamanları meydana getirir (Pollard ve Borisy 2003).

Bir diğeri forminlerle ilişkilidir (Kovar 2006) ve uzun dallanmamış filamanlar oluşturur ve bunlar çapraz şekilde biraraya gelip bağlanmazlar. Forminler ve Arp2/3 kompleksleri, aktin yapıları meydana getirmek için bazı durumlarda birlikte hareket edebilirler (Zigmond 2004).

2.4.2. Sertoli hücrelerindeki aktin filamanları

Sertoli hücrelerindeki aktin filamanları iki ana bölgede toplanmışlardır: (1) ektoplazma yapılar ve (2) tübülobulbar kompleks yapıları. Her iki durumda da filamanlar intraselüler bağlantı ile ilgili olan plazma membran yerleşimleri ile ilişki halindedir. Ektoplazma yapılar öncelikle aktin-bağlantılı interselüler bağlantı biçimidir. Tübülobulbar kompleks yapıları ise sperm salıverilmesinden önce bağlantıları ve spermatositlerin hareketlerini düzenlemeye yarayan yapılardır. Ektoplazma yapılarında aktin filamanları grup halinde oluşur ve burada filamanlar tek kutupludur ve parakristallere (altıgen dizilişler) yakın bulunmaktadır. Tübülobulbar kompleks yapılarında filamanlar üç boyutlu ağ oluştururlar.

2.4.3. Ektoplazma yapılarıdaki aktin filamanların işlevi

Erkek kontraseptif yöntemleri ile ilgili potansiyel molekül hedefleri olabilecekleri düşünülen ektoplazma düzenlenmesi yakın zamanda oldukça ilgi görmektedir (Lee ve Cheng 2004, Xia ve Cheng 2005, Yan ve Cheng 2005). Ektoplazma yapılarıdaki aktin polimerizasyonu ve depolimerizasyon mekanizmaları detaylı olarak incelenmemiştir. Fakat aktin dinamiklerindeki değişikliklerin, plazma membranındaki proteinlerde görülen değişikliklere bağlı olduğu düşünülmektedir.

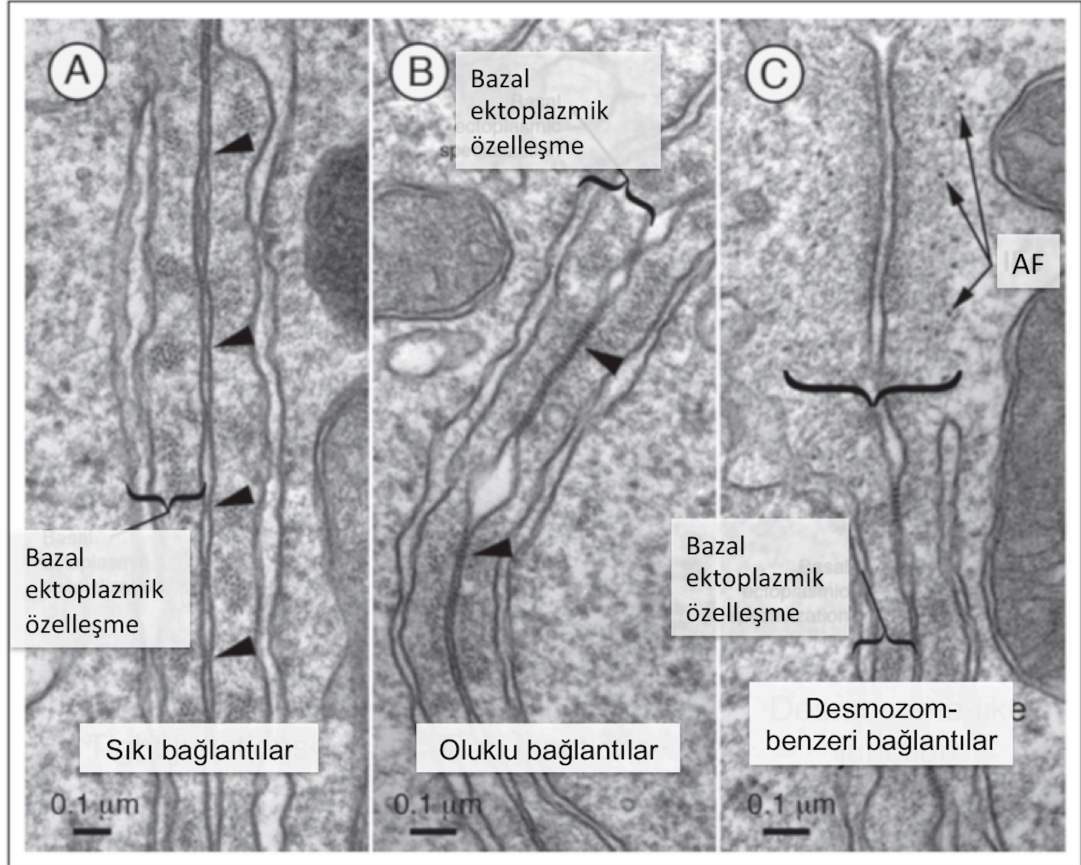
Memeli ektoplazma yapılarındaki aktin gruplarının oluşumu ve aktin filamanlarının altıgen şeklindeki konumları, epiteldeki büyük hücrelerarası bağlantıların güçlenmesi ve durağan olmasında rol oynamaktadır. Epitelde hücreler aşamalı olarak spermatogenez sırasında ve plazma membranının düzensiz hatlarının olduğu bölgelerde yerlerini ve şekillerini değiştirirler. Bu özellikle Sertoli hücrelerinin spermatid baş kısımlarına bağlandığı apikal bölgelerde geçerlidir. Spermatogenez sırasında ektoplazma yapılarıdaki aktin gruplarının, olgunlaşan spermatid baş kısımlarının şekline uygun olacak şekilde değiştiğine dair yapılan gözlemler, ilişkili işlevle uyumludur.

Sitokalazın D'nin intratestiküler enjeksiyonundan sonra, Sertoli hücreleri ile uzayan spermatidler arasındaki bağlantının kaybolması (Russell *ve ark.* 1988) ve bazal kompleks oluşumların yapısal ve işlevsel bütünlüğün bozulması (Weber *ve ark.* 1988) aktin filamanlarının plazma membranındaki bağlayıcı kısımları sabitlediği ettiği düşüncesi ile birebir örtüşmektedir.

2.4.4. Ektoplazma özelleşmeleri (EÖ)

Ektoplazma özelleşmeleri, seminifer epitelin bazal ektoplazma özelleşmelerinde ve apikal ektoplazma özelleşmelerinde testise özgün olan aktin-temelli bağlayıcı işlevsel birimdir (Russell 1977, Vogl *ve ark.* 2000, Mruk ve Cheng 2004). Hem bazal hem de apikal EÖ'in Sertoli hücrelerinin plazma membranı ile endoplazmik retikulumun sisternası arasında altıgen şeklinde aktin grupları bulunmaktadır. BEÖ, KTB'deki Sertoli-Sertoli hücresi arayüzünde bulunmaktadır ve sıkı bağlantı (SB), desmozom-tipi bağlantılar ve oluklu bağlantıların (OB) yanındadır. Apikal ektoplazma özelleşme, gelişen ve uzayan spermatidlerin baş kısımları ile (sıçan ve fare testislerinde basamak 8 spermatid ve ötesi) Sertoli hücrelerinin arasında bulunur. Daha sonra apikal tubulobulbar kompleksinin (TBK) uzayan spermatidin baş kısmına gelmesi gerçekleşir ve bu, yetişkin fare testislerinde seminifer epitel döngüsünün VIII'inci fazında oluşan spermiyasyondan sadece birkaç saat önce olur (Russell 1977).

Sertoli hücrelerinin bazal kısımlarındaki bağlantılarda ektoplazma oluşumları birbirine bitişik olan hücrelerde meydana gelirler ve bu nedenle bağlantılar çift taraflıdır. Ektoplazma yapıları, sıkı ve oluklu bağlantılar gibi diğer bağlantı çeşitleri ile de örtüşmekte ve bütünleşmektedir (Dym ve Fawcett 1970, Pelletier ve Friend 1983, Pelletier 1988) (**Şekil 2.4.4.**). Desmozom tipi bağlantılar ve diğer bağlantı çeşitleri ile birlikte ektoplazma yapılar büyük bağlantı kompleksleri oluştururlar. Bu yapılarıdaki sıkı bağlantılar ve adherens bağlantılar ise "kan-testis" ya da "kan-Sertoli" bariyerini oluştururlar.



Şekil 2.4.4. Sıçanlarda bazal EÖ'lerin elektron mikrografları. A, karşılıklı iki EÖ'de ki sıkı bağlantılar (ok başları) B, Adezyon kompleksi olarak oluklu bağlantılar (ok başları). C, EÖ'ler ile yakın benzerlik gösteren braket ile sınırları belirtilen desmozom-benzeri bağlantılar, AF: ara filamanlar.

2.4.5. Bazal ektoplazma özelleşmeleri (BEÖ)

Kaderinler (Lee ve ark. 2003) ve nektin-3 (Ozaki-Kuroda ve ark. 2002) BEÖ'de bulunan iki adherens bağlantı (AB) transmembran proteinidir. Yakın zamanda yapılan çalışmalar BEÖ ve sıkı bağlantı proteinleri arasında bir bağlantı mekanizması olduğunu göstermiştir ve bu durum periferal komponentler, kateninler ve ZO-1 (Yan ve Cheng 2006) vasıtasıyla olmaktadır. Bunu da KTB'nin bariyer olma işlevini güçlendirerek ve KTB'yi "en sıkı" kan-doku bariyerine dönüştürerek sağlamaktadırlar. Bu mekanizmanın seminifer epitel döngüsünün VIII'inci aşamasında preleptoten/leptoten evrelerindeki spermatositlerin KTB üzerinden geçişini kolaylaştırdığı ileri sürülmüştür.

Sıkı bağlantı ve BEÖ proteinleri bariyer üzerinden germ hücrelerinin geçişini kolaylaştırmak için KTB yeniden yapılanması sırasında “bağlantısız” kalmaktadırlar. Diğer taraftan bazal ve apikal EÖ arasındaki karışık mekanizmaların anlaşılabilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Bazal membran yakınındaki KTB'nin “açılımı” (yeniden yapılanması) ile epitelin lüminal kısmındaki spermiyasyonda apikal TBK'in bozulması hemen hemen aynı zamanda oluşmaktadır ve de her iki yapının da Sertoli hücresi epitelinin zıt uçlarında olması sebebiyle bu aktivitelerin Sertoli hücresi tarafından gerçekleştirildiği düşünülmektedir. Yakın zamanda yapılan çalışmalar, fokal adezyon kinazın (FAK) BEÖ'ye girişinin KTB'de kısıtlandığını ve de onun aktive edilmiş ve fosforlanmış biçimi olan fosforile FAK'ın (pFAK) AEÖ'ye girişinin kısıtlandığını göstermektedir (Vogl *ve ark.* 2008) ve bu da AEÖ ve BEÖ'de bulunan protein kinazların Sertoli hücresi epitelinin zıt uçlarında oluşan farklı aktivitelerin arasındaki çapraz ilişkilerin koordinasyonunda önemli rol oynayabileceğini göstermektedir.

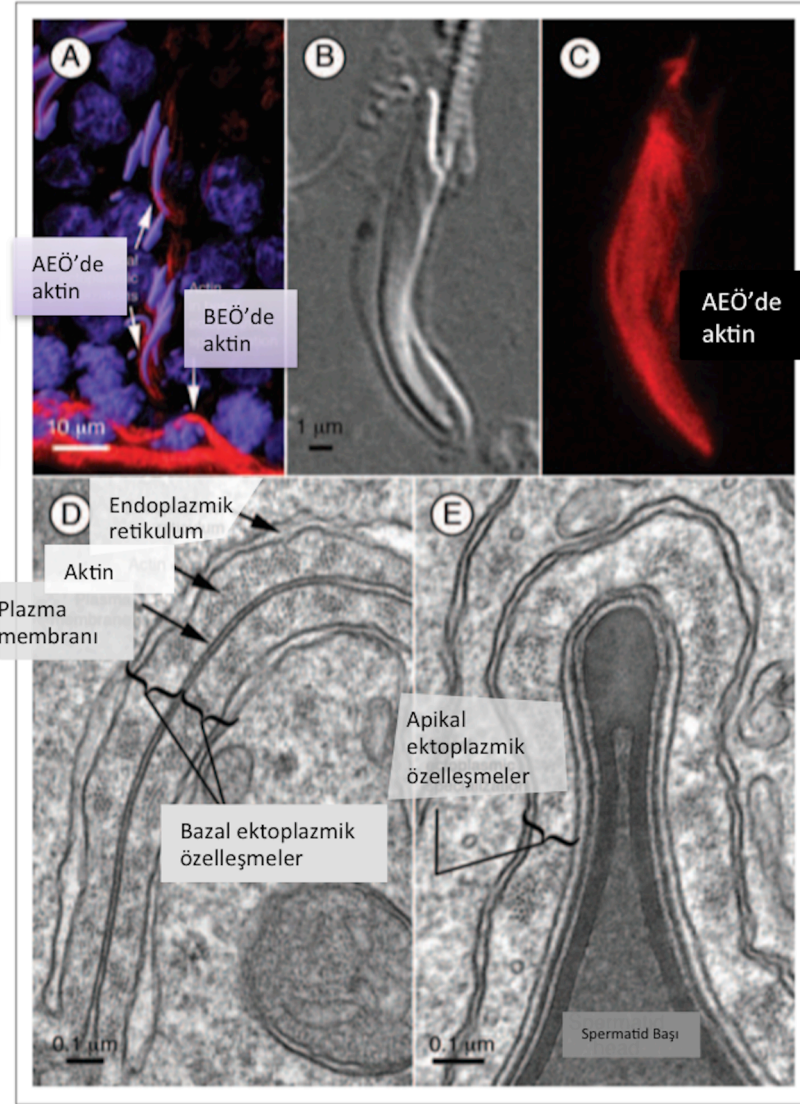
2.4.6. Apikal ektoplazma özelleşmeler (AEÖ)

Ektoplazma yapılar üç kısımdan oluşurlar. Bunlar aktin tabakası, filaman tabakasının bir tarafındaki hücreler arası bağlantı ile ilgili olan plazma membranının kısımları ve de diğerinde bulunan endoplazmik retikulumun sisternalarıdır (Dym ve Fawcett 1970, Russell ve Peterson 1985, Vogl 1989, Vogl *ve ark.* 2000, Lee ve Cheng 2004). Ektoplazma yapılarıdaki hücreler arasındaki aralık 9 nanometre kadar daralmaktadır (Dym ve Fawcett 1970). Ektoplazma oluşumları Sertoli hücrelerinde iki bölümde gerçekleşirler (**Şekil 2.4.6.**). Seminifer epitelin apikal bölgelerindeki Sertoli hücreleri ile spermatidlerin arasındaki heterotipik bağlantı yerlerinde; (2) Seminifer epitelin bazaline yakın bölümdeki Sertoli hücrelerinin homotipik bağlantılarında.

Apikal bölgelerde, spermatidler polarize olup apikal Sertoli hücresi kriptlerine yerleşince, ektoplazma yapıları birleşirler. Ektoplazma yapıları Sertoli hücrelerinde spermatik baş kısımlarının akrozomal bölgeleri yakınındaki kriptlerde gerçekleşirler. Ektoplazma yapılarına benzer oluşumlar spermatid baş kısımlarında gelişim göstermezler.

Spermatogenezin belli aşamalarında ve özellikle sıçanlarda V. evrede, ara filaman bağlantıları (desmozom tipi), spermatid baş kısımlarının arkasına yakın bölgelerde ektoplazma yapılarına katılırlar (Amlani ve Vogl 1988, Guttman *ve ark.* 1999) ve daha

sonrasında ortadan kaybolurlar. Spermatidler seminifer epitelden mekanik olarak ayrıldıklarında, ektoplazma yapılar hücre yüzeylerinde kalırlar ve bu da bağlantının üç bileşeninin yapısal bir bütünlük oluşturduğunu göstermektedir (plazma membranı, aktin filamanları, ve Sertoli hücresinin endoplazmik retikulumu (Romrell ve Ross 1979).

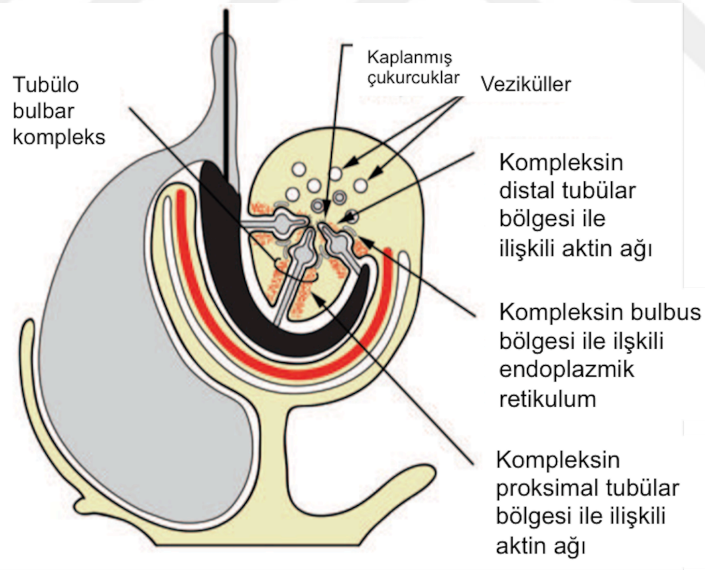


Şekil 2.4.6. Apikal ve bazal ektoplazma özelleşmeler (sıçan) (Cheng 2008). A, Konfokal mikroskop ile görüntülenen yaklaşık evre V'de görülen apikal EÖ ve bazal EÖ; aktin kırmızı, çekirdek mavi. B, Faz Kontrast mikroskobu ile görüntülenen uzamış spermatid. C, B'de ki uzamış spermatidin baş bölgesine tutunmuş olan Sertoli hücresi apikal EÖ aktin boyanması (kırmızı). D, Bazal EÖ elektron mikroskop görüntüleri. E, Apikal EÖ elektron mikroskop görüntüleri

Çalışmalardan elde edilen kanıtlar doğrultusunda, EÖ'lerde integral membran adezyon moleküllerinin, integrin (Palombi *ve ark.* 1992, Salanova *ve ark.* 1995), nektin 2 (Ozaki-Kuroda *ve ark.* 2002) ve JAM-C (Glikli *ve ark.* 2004) olduğu ortaya konmuştur.

2.4.7. Tübülobulbar kompleks (TBK)

Tübülobulbar kompleksler, seminifer epiteldeki hücrelerarası bağlantıların apikal ve bazal bölgelerinin incelikle işlenmiş yapılarıdır. Sperm salınması için pek çok kez düzenlenmesi gerekli olan Sertoli hücreleri ve spermatidler arasındaki adezyonun apikal bölgelerinde yerleşim gösterirler (**Şekil 2.4.7.**) (Russell ve Clermont 1976). Bu apikal lokasyonda, yapılar, komşu Sertoli hücrelerinin spermatid başlarının plazma membranı ile yaptığı invaginasyonlarıdır. Aktin filaman ağı Sertoli hücrelerinin uzun tübül invaginasyonlarını endoplazmik retikulum sisternalarına yakın olarak adeta kelepçeler. Bu komplekslerin terminal parçaları, pek çok vezikül ile karakterizedir ve bazıları lizozom olarak tanımlanmaktadır (Russell ve Clermont 1976, Russell 1979).



Şekil 2.4.7. Tübülobulbar kompleksin şematik çizimi. Apikal bölgelerdeki yapıların gösterilmesi (Russell 1979).

Tübülobulbar kompleksin önerilen pek çok işlevi vardır. Sperm salınmasından önce ki son yapılar olarak tanımlanan bu kompleksler spermatidin Sertoli hücresi yüzeyine tutunmasında rol oynadığı (Russell ve Clermont 1976, Russell 1979), Sertoli hücresi için spermatidten geri alınması gerekli atık sitoplazma için yön verdiği (Russell 1979) ve son olarak, spermatidin şeklinin düzenlenmesinde morfolojik olarak yönlendirdiği düşünülmektedir.

2.5. Kan-testis bariyerini (KTB) etkileyen faktörler

2.5.1. Yaş ve hormonlar

Daha önce de belirtildiği gibi, seminifer tübüllere belirli boyaların giriş yapması üzerine yapılan çalışmalar, bu boyaların yalnızca 20 günden daha fazla yaşı olan sıçanların tübüllerine girmediğini göstermiştir (Kormano 1967). Ayrıca, sıçanların testislerinin interstisyel dokularına enjekte edilen elektron-opak işaretleyicilerin yaşı 16 günlükten az olan sıçanlarda kolaylıkla tübüllere girdikleri görülmüştür. 16 ve 19 günlük olan sıçanlarda, Sertoli hücrelerinin arasında kapanan bağlantılar oluşur ve söz konusu maddelerin tübüler lümenine girişi engellenmiş olur (Vitale *ve ark.* 1973). Olgun olmayan sıçanların testislerinde, boşluk bağlantıları bulunsa da kapanan bağlantılar bulunmamaktadır. Diğer taraftan hipertonic lityum klorür perfüzyonu, olgun testislerdeki Sertoli hücresi bağlantıları dışındaki hücrelerin büzüşmesine sebep olmuştur ve bu durumun bağlantı iç kısımlarına etkisi olmamıştır. 13 günlük sıçanların testislerinde, hücrel büzüşme tübüller üzerinden gerçekleşmiştir (Gilula *ve ark.* 1976). Hipertonic solüsyona maruz kalma sonucunda oluşan adlüminal hücrelerin büzüşmesi 14-18 günlük olan sıçanlarda azalış göstermiştir (Russell *ve ark.* 1989). Benzer şekilde, koyalarda Sertoli hücresi bağlantı kompleksleri doğumdan sonraki 15 günde oluşmaktadır (Gilula *ve ark.* 1976) ve farelerde ise bu bağlantılar 16 gün sonra oluşmaktadır (Nagano ve Suzuki 1976) 15 günlük sıçanlarda, bariyer seminifer tübülün germ hücrelerinin pakitene ulaştıkları kısımlarında oluşur (Bergmann ve Dierichs 1983). Djungarian hamsteri (Bergmann 1987) gibi mevsimsel üreyen cinslerde üreme sezonunda elektron opak işaretleyiciler Sertoli hücresi bağlantılarının dışında kalmaktadır fakat testiküler regresyon sırasında söz konusu partiküller tübüllerden içeri girerler. Vizon üzerinde yapılan çalışmalarda görülmüştür ki işaretleyicinin tübüllerin dışında kalması herhangi bir germ hücresinden ziyade tübül lümenine bağlı olarak gerçekleşmiştir.

Seminifer tübüllerdeki lümen gelişimi aşamalı olarak gerçekleşir, doğumdan sonraki 10.günde başlar ve çapı 30. güne kadar yavaşca büyür ve 50. günden sonra bu büyüme hızlanır (Setchell *ve ark.* 1988, Setchell *ve ark.* 1996). Testis ağırlığına göre sıvı salgılanması sıçanlar 45 günlük olana kadar artmaya devam eder (Setchell 1970, Russell *ve ark.* 1989).

Kan-testis bariyerinin bir göstergesi olan Sertoli hücrelerinin iki bölümündeki transepitelyal elektriksel direnç (TER) oluşumu, FSH ile günlerce geciktirilebilir ve oluşmasından sonra düşer, kontrol düzeylerine gelir ve yükselir. Testosteron tek başına TER'in hızlı yükselmesine neden olur ve testosteron ile folikül stimülan hormon (FSH) birlikte daha yüksek TER seviyelerine sebebiyet verir. Dihidrotestosteron, testosterondan daha etkili olmuştur ve  stradiyol etkisiz kalmıştır (Janecki *ve ark.* 1991). Küçük miktarlardaki dibutiril siklik adenozin monofosfat (cAMP), TER gelişimini harekete geçirmiştir. Diğer taraftan yüksek dozları engelleyici olmuştur. Kolera toksin, FSH'a benzer etki göstermiştir (Janecki *ve ark.* 1991). Okludinin proteazom-duyarlı ubikutinleşmesi cAMP'ın Sertoli hücresi bağlantılarına etkisine aracılık etmiştir (Lui ve Lee 2005). TGF-β3 ayrıca kan-testis bariyer dinamiklerini düzenlemektedir ve bunu p38 MAP kinaz (p38 MAPK) sinyal yolu üzerinden okludin ve ZO-1'in istikrarlı düzeylerini belirleyerek gerçekleştirmektedir (Xia ve Cheng 2005). Sıçanların testislerine direk olarak enjekte edilen tümör nekroz faktörü (TNF), okludin, zonula okludin-1 ve N-kaderin düzeylerini düşürerek kan-testis bariyerini geçici olarak bozabilmektedir (Li *ve ark.* 2006).

2.5.2. Kadmiyum ve diğerk toksik maddeler

Memelilerin çoğunda testisler, diğerk dokuların aksine kadmiyum tuzlarının etkilerine aşırı derecede duyarlıdırlar. İlk incelemelerde (Chiquoine 1964) testislerin kan damarları üzerinde durulmuştur ve kadmiyum kloridin bir kere enjekte edilmesinden birkaç saat sonra vasküler geçirgenliğin artması sonucu sıçanlarda testis kan akımının azaldığı görülmüştür (Waites ve Setchell 1966). Daha sonra yapılan çalışmalar kan-testis bariyerinin rubidyum geçirgenliğinin vasküler geçirgenlikten daha önce olduğunu göstermektedir (Setchell ve Waites 1970). Gine domuzlarında ise, deri altından enjekte edilen akriflavin ile, interstisyel dokunun lekelenmesi seminifer tübüllerdeki lekelenmelerde görülen artışlardan daha önce oluşmuştur (Johnson 1969). Fakat küçük dozlardaki kadmiyum, vasküler sistemde görülebilir değişikliklere sebep olmadan spermatogenezi etkileyebilmektedir ve bu etkiler çinko tuzları uygulanarak azaltılabilir (Lee ve Dixon 1973). Çift odacıklı birimlerde, Sertoli hücresi kültürlerinin kadmiyum tuzlarına maruz bırakılmaları, TER ile ilgili olarak ilerleyici ve doz-bağımlı bir düşüşe neden olmuştur (Chung ve Cheng 2001). Sıçanların küçük dozlarda kadmiyum klorid ile işlem görmesi, enjeksiyondan 24 saat sonra Sertoli hücrelerinin sıkı bağlantılı mikrofilamanlarında değişikliklere sebep olmuştur fakat 4 saatin sonunda herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir (Hew ve ark. 1993). Kadmiyumun olduğu durumlarda TER ile ilgili gözlemlenen düşüş miktarı testosteron ve FSH ilave edildiğinde artmıştır (Chung ve Cheng 2001). Bariyerin bozulması, testiküler TGF- β 2 ve 3 ile fosforlanmış p38 MAPK ile aktive olan protein kinazı geçici olarak yükselmesi ile ilişkilidir ve bunun doğal sonucu olarak bariyer bölümündeki okludin ve ZO-1 miktarlarında kayıp gözlemlenmektedir (Wong ve ark. 2004). KTB'nin bozulması sırasında Sertoli-Sertoli hücresi bağlantılarındaki α 2-makroglobulin miktarında artış görülmüştür (Wong ve ark. 2005). Bazı farelerin testislerinin kadmiyum etkilerine karşı daha dayanıklı olmaları ilginçtir ve bu durum testislere daha az miktarda kadmiyum gitmesi ile ilişkilidir. Kadmiyum taşıyıcısı doyurulabilir ve çinko ile engellenebilir fakat kalsiyumla baskılanamaz ve de tübüler hücrelerle ilgili olmayıp büyük olasılıkla endotelial hücrelerde bulunmaktadır (King ve ark. 1999). Sıçanlarda kan-testis bariyerinin bütünlüğü, bir mikrofilaman önleyici olan Sitokalazin D ile intratestiküler bir uygulanma yapılması ile değişikliğe uğrar (Weber ve ark. 1988).

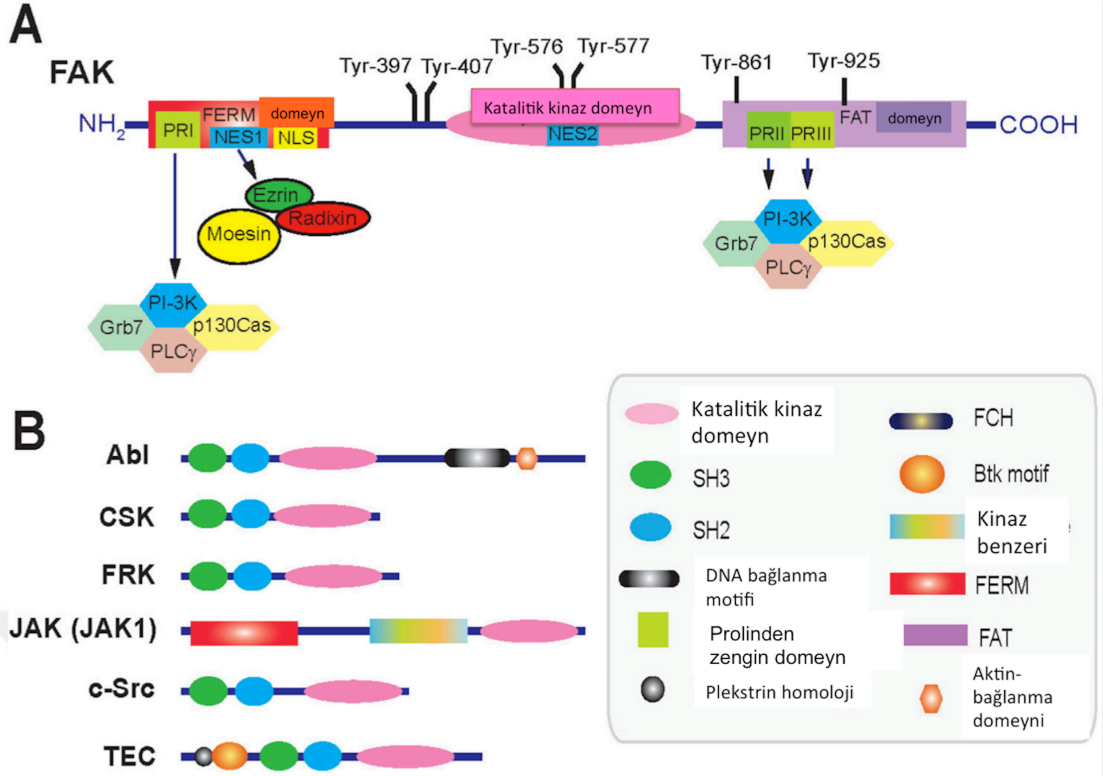
Bununla ilgili kanıtlara elektron-opak işaretleyicilerin penetrasyonu üzerine yapılan çalışmalarla, hipertonic solüsyonların perfüzyonu ile radyoaktif inulinin seminifer tübüler sıvıya geçişinin etkileri görülerek ulaşılmıştır. Sıçanların testislerine enjekte edildiğinde kan-testis bariyerini bozan bir diğer madde ise gliseroldür. Bu hayvanlarda seminifer tübüllerin ve rete testislerin sıvılarına giren radyoaktif inulin ve albümin miktarlarında artış gözlemlenmiştir (Eng ve ark. 1994) ve bu hayvanlarda ayrıca Sertoli hücrelerinde sıkı bağlantılı mikrofilamanlar, okludin ve mikrotübüllerde bozulmalar görülmüştür (Wiebe ve ark. 2000). Kan-testis bariyerini etkileyen diğer maddeler arasında heksanediyon (Hall ve ark. 1991) cis-platin (Pogach ve ark. 1989) sarin (Jones ve ark. 2000) DEET (Abou-Donia ve ark. 2001) bulunmaktadır fakat paslanmaz çelik korozyon ürünleri, kan-testis bariyerini etkilemeden spermatogenezi etkileyebilmektedirler (Pereira 1995) Bisfenol A (Toyama ve ark. 2004) ve Adjudin (AF 2364) (Mruk ve Cheng 2004) gibi diğer uygulamalar, kan-testis bariyerini etkilemeden, Sertoli hücreleri ile spermatidler arasındaki bağlantıları bozmaktadırlar.

2.6. Kan testis bariyeri düzenlenme dinamiği

2.6.1. Fokal adezyon kinaz (FAK) ilişkisi

Memeli hücrelerinde 125 kDa sitosolik protein olan FAK, c-Src'nin bir alt sinyal yolağıdır. FAK ilk olarak 1992 yılında tavuk embriyo fibroblastlarında keşfedilmiştir (Schaller *ve ark.* 1992). Aynı yıl farelerde de bulunmuştur (Hanks et al., 1992). İnsanda PTK2 kodlu protein tirozin kinaz 2 (PTK2)'dir (Andre ve Becker-Andre 1993) ve bulunduğu yer ise 24.3 pozisyonunda 8 nolu kromozomun uzun kısmında (q)'dır (diğer bir değişle: sitogenetik yerleşimi: 8q24.3) (Fiedorek ve Kay 1995). FAK'ın pek çok hücre aktivitesinde yer aldığı bilinmektedir. Bunlar hücre bağlantılarının kurulumu ile ekstraselüler matrikste hücre göçünün sağlanması, F-aktin dinamiklerinin düzenlenmesi ve integrin bazlı reseptörlere sinyaller aktarılmasıdır (Hall *ve ark.* 2011, Cheng ve Mruk 2012, Wehrle-Haller 2012, Pentassuglia ve Sawyer 2013).

Fokal adezyon kinaz, tüm memeli hücrelerinde ve/veya dokularında bulunmaktadır (Cheng ve Mruk 2012). FAK aynı zamanda fibrotik hastalıklar (Lagares ve Kapoor, 2013) ile tümörogenez (Ucar ve Hochwald 2010, Lechertier ve Hodivala-Dilke 2012, Claesson-Welsh ve Welsh 2013) gibi pek çok hastalığın terapi hedefidir. Zira tümör hücrelerinin proliferasyonu, göç etmesi ve yayılması ile ilişkili olan pek çok kanser çeşidinde aşırı derecede üretilmektedir. Yakın zamanda yapılan alışmalar FAK'ın tümör gelişimi sırasında hücre apoptozu (Wang *ve ark.* 2014) ve T hücre sinyalleşme işlevi ile ilgili olduğunu ortaya koymuştur (Chapman *ve ark.* 2013). FAK, c-Src'nin bir alt yolağı olarak ve FAK-Src çift kinaz kompleksi kanser tedavisinde önde gelen iyileştirici bir hedeftir (Mitra ve Schlaepfer 2006, Bolos *ve ark.* 2010, Ammoun *ve ark.* 2014).



Şekil 2.6.1. Farklı FAK domeynlerinin şematik çizimi. A, Fokal adezyon kinaz yapısal özellikleri ve domeynleri, B, Reseptör olmayan kinaz ailesi üyeleri ve domeynleri. (Gungor-Ordueri ve ark. 2014).

Fokal adezyon kinaz nükleer sinyalizasyon ve inflamasyon ile ilişkili gen transkripsiyonunun düzenlemesi ile ilişkilidir (Lim ve ark. 2012). Hepsi birlikte değerlendirildiğinde, bu bulgular FAK'ın memelilerin hem sağlık hem de hastalık durumlarıyla ilgili fizyolojik açılarından önemini ortaya koymaktadır. FAK'ın farklı işlevsel durumları ile FAK ile bazı ortak özellikleri bulunan benzer reseptör olmayan protein kinazlarının özeti **Şekil 2.6.1.**'de verilmiştir. Fokal adezyon kinaz, N-terminali yakınında bir FERM domeyni ile onu izleyen katalizör kinaz domeyni ile C-terminali yakınındaki bir fokal bağlayıcı odaktan (FAT) oluşmaktadır (Zachary ve Rozengurt 1992, Hall ve ark. 2011). Diğer protein tirozin kinazların katalizör domeynlerini muhafaza eden analog motiflerini içeren merkez kinaz dışındaki diğer ikisi olan FERM ve FAT domeynleri, şu ana kadar bilinen diğer protein tirozin kinazlarla belirgin bir homoloji sergilememektedir (**Şekil 2.6.1.**). Örneğin FAK, plazma membran birleşmesi (asilasyon bölgeleri) için gerekli olan motifleri içermez ve aynı şey, FERM ve FAT alanlarındaki diğer protein tirozin kinazlarına benzerlik gösteren Src homoloji 2 (SH2) veya SH3 alanları için de geçerlidir. Böylece FAK

içinde, diğer protein tirozin kinazlarında olduğu gibi protein-protein etkileşimini meydana çıkarabilecek SH2 ya da SH3 alanları bulunmamaktadır. SH alanlarının eksikliğini kapatabilmek için FAK etkileşim içinde olabilecek proteinler bulunmaktadır. Bu proteinler, PI-3K (fosfoinositid 3-kinaz), Grb7 (büyüme faktör reseptör-bağlayıcı protein 7), PLC γ (fosfolipaz C- γ), p130Cas (Crk-ilişkili substrat), ve prolinden zengin 1 bölgesi aracılığıyla oluşan diğerlerdir (Kempnes *ve ark.* 1988). Yerleşik oldukları yer ise FERM alanı ile FAT alanındaki PRII ve PRIII kısımlarıdır (**Şekil 2.6.1.**). Böylelikle FAK, katalizör alandaki c-Src ile aktivasyonu sonrası protein tirozin kinaz olarak hareket etmesinden ayrı olarak, çok fazla sayıda proteini devreye sokarak bir sinyalleşme platformu da oluşturmaktadır ve buna çoklu uyarlayıcılar ve protein kinazlar dahil olacak şekilde hücrel aktivite düzenlenmesi için dev bir protein kompleksi oluşturulması da dahildir.

2.6.2. Aktin temelli hücre iskeleti ve fokal adezyon kinaz (FAK)

Testislerde seminifer tübüller spermatozoa üreten işlevsel birimlerdir. Her erkek ~12-13 yaşlarında ergenliğe girmesinden sonra ve yetişkinlik yılları boyunca günde ~400 milyon sperm üretir. Sıçanlar ise doğumdan sonra 45 günlük oluktan sonra spermatogenez ile ~70 milyon sperm üretirler (Johnson *ve ark.* 1980, Amann 2008) ve bu üretim Sertoli ve germ hücreleri bulunan seminifer epitelinde gerçekleşir. Sperm üretimi, Sertoli-Sertoli ve Sertoli-germ hücre arasındaki bağlantı komplekslerinin varlığına ve spermatogenez sırasında ve özellikle spermiyogenez esnasında germ hücresi morfolojisinde oluşan hızlı değişikliklere bağlı olarak sürdürülür. Seminifer epitel döngüsünün devamlılığı ve KTB'nin yeniden kurulumu için hızlı "bağlanma" ve "ayırılma" diğer bir deyişle "açılma" ve "kapanma" mekanizması gereklidir. Aynı şekilde spermatogenezin epitel döngüsünde kan-testis bariyerini geçip bazal bölümden adlüminal bölüme seminifer epitelinin üzerinden germ hücresi geçişi de gerçekleşmektedir (**Şekil 2.6.2.**).

İntegrinlerin, FAK, Ras-ilişkili C3 botulinum toksin substrat-1 Guanozin trifosfat fostat (Rac GTP'ler) ve uyarlayıcı proteinlerin koordinasyonunu gerektiren hareketli hücrelerin aksine (fibroblastlar, makrofajlar, lenfositler ve metastatik tümör hücreleri) (e.g., talin, vinsülin, paksilin) (Lechertier *ve Hodivala-Dilke* 2012, Wehrle-Haller 2012) spermatositler ve spermatidler hareketli hücreler değildir.

Aksine, preleptoten spermatositleri KTB üzerinden bazal bölümden adlüminal bölüme epitel döngüsünün VIII. evresinde mayoz I/II'ye hazırlanmak için Sertoli hücreleri tarafından taşınmaktadırlar. Hatta, mayozdan elde edilen spermatidler epitel döngüsü sırasında adlüminal bölüm üzerinden ileriye ve geriye taşınmaktadırlar ve 1-19 spermatidler epitelden ayrılırlar ve bu durum tüm basamak 19 spermatidler epitel döngüsünün VIII. evresinde seminifer tübül lümeninin kenarında düzgün biçimde dizilmesine kadar devam eder ve spermiyasyon sırasında sperm salınımından önce spermatozoaya dönüşüm gerçekleşir (Mruk ve Cheng 2004, Mruk *ve ark.* 2008, O'Donnell *ve ark.* 2011) (**Şekil 2.6.2.**).

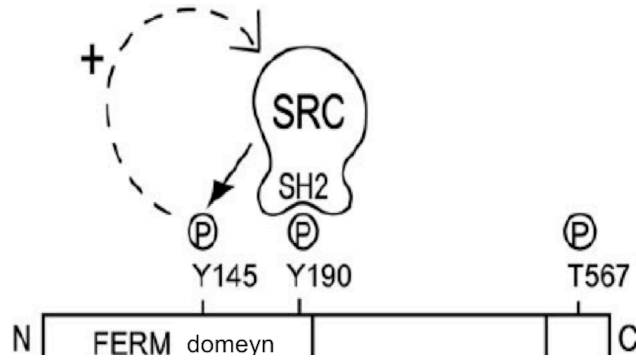
Görülmektedir ki, epitel döngüsü sırasında filamentöz aktin (F-aktin) yapısında yoğun değişiklikler meydana gelmektedir. Diğer taraftan, hücre iskeleti dinamiklerini düzenleyen moleküler mekanizmalar halen bilinmemektedir. Yakın zamanda yapılan çalışmalar memeli testislerindeki F-aktin yapısının iki çeşit aktin düzenleyici protein tarafından düzenlendiğini ortaya koymuştur. Bu proteinler aktin-gruplu ve dallanmış olan aktin-polimerizasyon proteinleridir ve bunlar spermatogenez sırasında hücre şeklindeki değişikliklere uyum sağlamak ve germ hücre geçişini kolaylaştırmak için esnek bir şekilde hareket ederler. Bazı kısıtlı sayıdaki çalışmalar bu aktivitelerdeki FAK'ın rolünü ortaya çıkarmaktadır. Epitel döngüsü sırasında, tübülün-bazlı hücre iskeletinin işlevi ile testisin mikrotübüler dinamiklerinde FAK'ın rolü büyük oranda bilinmemektedir (Tang *ve ark.* 2013).

Örneğin, p-FAK-Tyr³⁹⁷ ve -Tyr⁵⁷⁶ AEÖ'de fazlasıyla sentezlenirken BEÖ'de görülmemektedir. Erken evre VIII tübüllerinden çok VII. evredeki tübüllerde yerleşimleri sınırlanmıştır ve de spermiyasyonun olduğu geç VIII. evrede yerleşimleri önemli ölçüde azalmıştır (Siu *ve ark.* 2003, Lie *ve ark.* 2012). Bu bulgular, spermiyasyon sırasında sperm salınana kadar spermiyogenez sırasında seminifer epitelde spermatid-Sertoli bağlantılarının oluşması ve FAK formlarının AEÖ'nin bütünlüğünün sağlanması için gerekli olabileceğini göstermektedir. Diğer taraftan, p-FAK-Tyr⁴⁰⁷ hem apikal hem de BEÖ'de görülmektedir. Fakat p-FAK-Tyr⁴⁰⁷'in görülmesi VIII. evrenin sonlarında AEÖ'de neredeyse tespit edilemeyecek düzeylere inmiştir ve bu durum spermiyasyondaki sperm salınmasına denk gelmektedir. Fakat BEÖ'de görülmesi hayli yüksektir. Bu da p-FAK-Tyr⁴⁰⁷'nin AEÖ'deki etkilerinin yanı sıra, KTB'de Sertoli hücresi bağlanma fonksiyonunun düzenlenmesinde etkili olabileceğini göstermektedir (Lie *ve ark.* 2012)

2.7. Fokal adezyon kinaz, hücresel Src kinaz (c-Src) ve ezrin ilişkisi

Reseptör olmayan protein tirozin kinazların, kemirgenlerde en çok çalışılanı c-Src'dir. Src kinazların; embriyonik gelişimde, hücre büyümesinde, hücre hareketinde, hücre-matriks yüzeyindeki ve fokal adhezyon kompleksteki aktin-hücre iskeleti dinamiğinde ve FAK'a benzer olarak integrin-tabanlı sinyalleşmede gerekli olduğu kanıtlanmıştır (Tegtmeyer ve Backert 2011). Kan-testis bariyerinde ise c-Src'nin BEÖ'de, N-kaderin ile (Lee ve Cheng 2005) ve FAK ile yapısal olarak ilişkili olduğu gösterilmiştir (Yan ve Cheng 2006). Ayrıca, c-Src'nin KTB'de yapısal olarak desmoglein-2 ile etkileşime girdiği de ortaya konmuştur (Lie *ve ark.* 2010). Ek olarak, c-Src, KTB'de lokalize olan MTMR2 (hücre içinde endositotik vezikül-kaynaklı trafik olaylarından sorumlu lipid fosfataz MTM ailesi üyesi) (Zhang *ve ark.* 2005) ile işlevsel protein kompleksini oluşturmaktadır (Mruk ve Cheng 2011). Tüm bu bilgiler, c-Src'nin, KTB'de bulunan okludin, N-kaderin ve desmoglein-2 gibi protein kompleksleri ile bütünleşmiş, tamamlayıcı bir yapı olduğunu ortaya koymaktadır. Fokal adezyon kinaz, oksidatif stres ile indüklenmiş KTB hasarında, PI3K/c-Src sinyal yolağının alt mediyatörü olarak gösterilmiştir (Basuroy *ve ark.* 2010).

Fokal adezyon kinazın aktive olması ile sıkı bağlantılarda ve/veya AB'lardaki protein komplekslerinin tutucu işlevlerini değiştirmek üzere, bağlantı proteinlerinin tirozin fosforilasyonunda artış gözlenir. İlginç olarak, hücre tipine, oksidatif stres kaynağına ve tedavi süresine bağlı olarak FAK defosforile edilebilmektedir (Alderliesten ve ark. 2007). Sonuç olarak, oksidatif stres artışına bağlı olarak, FAK, c-Src tarafından aktive edilir ve hücre-hücre yüzeyindeki bağlantı proteinlerinin fosforilasyonu gerçekleşir. Adezyon kaynaklı sinyalleşmede ezrinin c-Src bağımlı, SH2 domeyni ile fosforillendiği (**Şekil 2.7.**) bilinmektedir (Srivastava ve ark. 2005). Ek olarak, c-Src, insan kanser tiplerinde de aktive olmaktadır. Kaderin-bazlı hücre-hücre bağlantılarının ve aktin hücre iskeletinin aşağı düzenlenmesini indükler. Aktin hücre iskeleti ile plazma membranı arasındaki karşılıklı bağlantıları sağlayan ezrinin de insan kanser tiplerinde aşırı ekspresyon göstermesinden yola çıkılarak ortak çalışmaları ihtimali araştırılmış ve c-Src ile ezrinin murin karsinoma hücre hattında birlikte çalıştığı gösterilmiştir (Elliott ve ark. 2004).

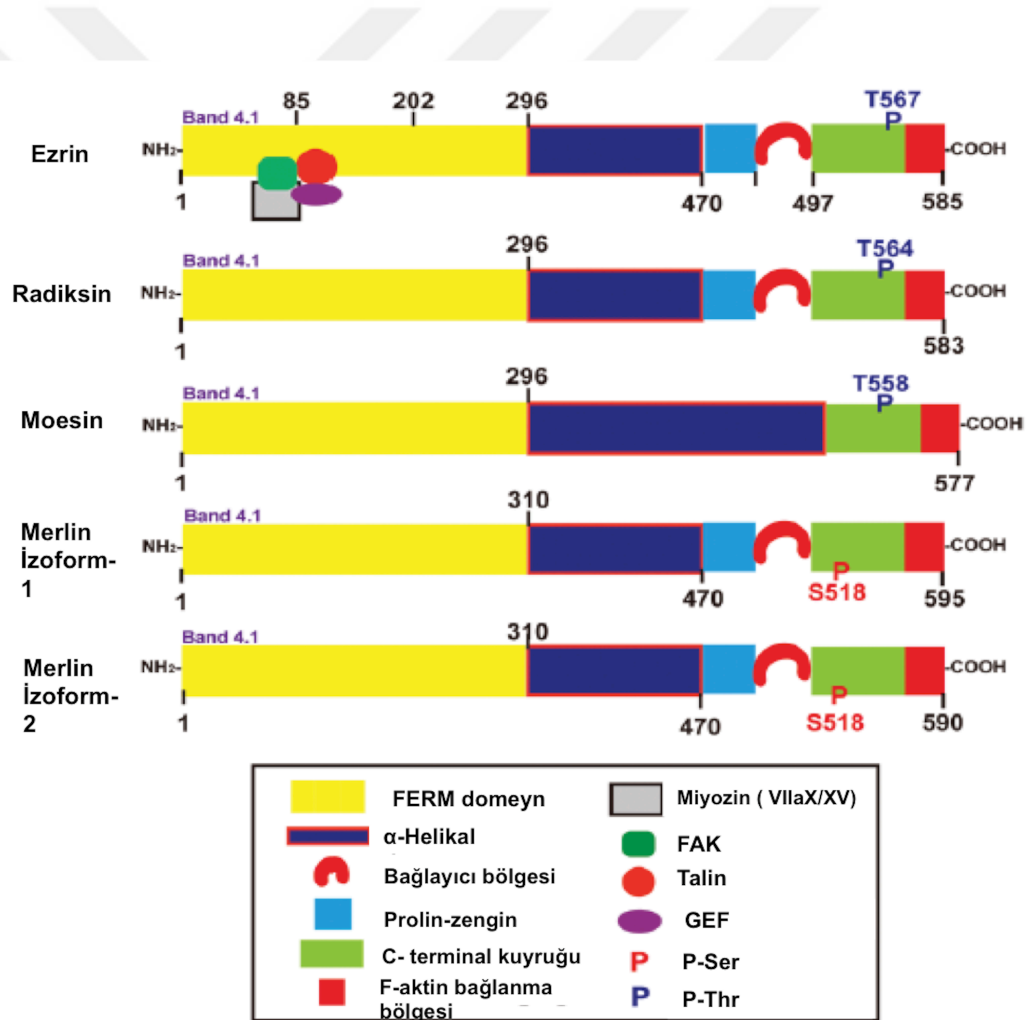


Şekil 2.7. Src-kökenli ezrin Y145 fosforilasyon geri bildirim mekanizması (Srivastava ve ark. 2005).

2.7.1. Ezrin proteininin yapısal özellikleri

Ezrin, radixin, moesin (ERM), merlin ile birlikte ERM-merlin protein ailesine aittir. Hücre proliferasyonunun, migrasyonunun ve yaşamını sürdürmesi için sinyal molekülleri arasında adeta bir iskele görevi görmektedir (Fehon ve ark. 2010, Stamenkovic ve Yu 2010, Arpin ve ark. 2011, Neisch ve Fehon 2011, Morrow ve Shevde 2012). ERM proteinlerinin hepsinde 4.1/ERM (FERM) domeyni olan korunmuş bir domeyni bulunmaktadır.

Bu korunmuş domeyni FAK, miyozin, talin, GEF gibi hücre iskeleti dağılımlı proteinler ile ortakır (Bretscher *ve ark.* 2000, Moleirinho *ve ark.* 2013). Bu proteinler ERM-merlin proteinleri ile FERM domeynleri ile bağlantı kurmaktadır (Şekil 2.7.1.). Bu protein ailesinden ezrin daha çok polarize epitel ve mezotel hücrelerinde sentezlenmektedir (Berryman *ve ark.* 1993, Saotome *ve ark.* 2004). Aynı zamanda plazma membranı altındaki mikrovilluslar ile de etkileşimde olan ezrini sitovilin ya da villin-2 olarak da tanımlanmaktadır (Arpin *ve ark.* 2011). Özetle, ezrin, integral membran ve sitoplazmik proteinleri aktin filamanlarına bağlamaktadır ve epitelin apikal membran bölgesindeki sıkı bağlantıları ve adherens bağlantıları organize etmektedir (Bretscher *ve ark.* 2002, McClatchey 2003, Fehon *ve ark.* 2010, Neisch *ve Fehon* 2011).



Şekil 2.7.1. Ezrin, radiksin moesin ve merlin ailesi proteinlerinin fonksiyonel domeynlerinin ve fosforilasyon bölgelerinin şematik çizimi (Gungor-Ordueri *ve ark.* 2015).

Ezrin geni silinmiş fareler, neonatal dönemde normal olarak doğmaktadır (Berryman *ve ark.* 1993) ancak, ezrinin oldukça yoğun sentezlendiği ince bağırsak epitelindeki defektler yüzünden postpartum 21. gün ölmektedirler (McClatchey 2003, Saotome *ve ark.* 2004). Ezrin yerleşimi immünohistokimyasal olarak fare testisinde; atık sitoplazmada, fagozomlarda ve AEÖ yapılarında gösterilmiştir (Wakayama *ve ark.* 2009). Ancak, ezrinin, spermatogenez ve kan-testis bariyerinin oluşum aşamalarındaki işlevi net olarak bilinmemekle birlikte, hücre iskeleti eş proteinleri de henüz tespit edilmemiştir.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney hayvanları

20 günlük Sprague Dawley erkek sıçan yavruları Rockefeller Üniversitesi Mary M. Wohlford Laboratuvarı Biyomedikal Araştırma Merkezi deney hayvanları ünitesinden elde edildi. Her bir *in vitro* Sertoli hücresi izolasyonu için 10 adet 20 günlük erkek sıçan kullanıldı. *In vivo* deneyler için her gruba ait en az 3 adet erişkin sıçan ile çalışıldı.

3.2. Primer Sertoli hücresi izolasyonu ve kültürü

Kullanılan malzemeler ve solüsyonlar

- Steril cam Erlenmayer (2 L)
- Steril kapaklı cam Erlenmayer flask (125 mL)
- %70'lik etanol
- Steril 50'lik polipropilen tüp
- Steril 15'lik polipropilen tüp
- Steril 100 mm çaplı cam Petri
- Steril kavisli makas
- Steril kavisli pens
- Steril iğne
- Steril iğne filtresi
- Dulbecco's Ham's F12/DMEM medium (Katalog no: D2906-10X1L)
- Matrijel (Katalog no: BD 354234)
- 40 mg Tripsin (Katalog no: T4799-5G) ve 0.8 mg DNaz (Katalog no: Sigma DN25)
- 20 mg kollajenaz (Katalog no: Sigma C0130) ve 0.2 mg DNaz içeren 40 mL F12/DMEM
- 40 mg kollajenaz ve 0.2 mg DNaz içeren 40 ml F12/DMEM
- 40 mg hyaluronidaz (Katalog no: Sigma H3506) ve 0.2 mg DNaz içeren 40 mL F12/DMEM
- Büyüme faktörleri içeren F12/DMEM medium: 10 mg/mL insülin (Katalog no: Sigma I5500-250MG), 5 mg/mL human transferrin (Katalog no:

Calbiochem/ 616424), 2.5 ng/mL EGF (Katalog no:Sigma E1257) ve 5 mg/mL bacitracin

- 6 ve 12 kuyucuklu kültür kapları
- 24 kuyucuklu çift odacıklı birim
- Steril pipet uçları
- 10 mL'lik steril Pasteur pipeti

Hücre izolasyonu için uygulanan teknik aşağıdaki gibidir:

1- 10 adet erkek Sprague-Dawley sıçanların kullanılacakları gün 20 günlük olmalarına dikkat edilerek seçildi (1 tanesinden yaklaşık $180-200 \times 10^6$ Sertoli hücresi izole edileceği planlandı).

2- Hayvanlara anestezi uygulandıktan sonra kullanım için hazırlandı.

3- Skrotal bölge %70 etanol ile temizlendi.

4- Testisler çıkartılarak, dekapsüle etmek için tunika albuginea çıkartıldı ve 20 adet testis yaklaşık 10 mL F12/DMEM içine 100 mm petriye yerleştirildi.

5- Bu basamaktan itibaren, kalan tüm kültür basamakları hücre kültürü laboratuvarında bulunan hücre kültür kabini içinde gerçekleştirildi.

6- Tüm testisler (20 total) yaklaşık 10 ml F12/DMEM içeren 100 mm yeni petriye alınarak steril kavisli makas yardımı ile yaklaşık 1 mm büyüklüğünde parçalara bölündü.

7- Testis parçaları 50 mL'lik polipropilen tüplere alınarak ve üzerine 50 mL'ye tamamlanacak kadar F12/DMEM eklendi. Kan hücreleri ile kontaminasyonunun engellenmesi için hafif çalkalama ile yıkanarak ve 800 g de 2 dk santrifüj edildi.

8- F12/DMEM steril Pasteur pipeti ile aspire edilerek ve yeniden 50 mL'ye tamamlanacak kadar F12/DMEM eklenerek, medium berrak hale gelene kadar yıkandı.

9- Testis parçaları, 40 mg tripsin ve 0.8 mg DNaz içeren 40 mL F12/DMEM ile yeniden süspansiyon haline getirildi.

10- Testis parçaları, steril 125 mL'lik kapaklı Erlenmeyer flasklara alınarak su banyosunda Leydig hücrelerini ve diğer interstisyel hücreleri serbest bırakmak üzere çalkalandı.

11- Seminifer tübüller, 50 ml'lik polipropilenlere alındı, F12/DMEM 50 mL'yi tamamlanacak şekilde eklendi ve 800 g'de 2 dk santrifüj edildi.

12- Seminifer tübüller pH:7.4 olan ve %0.01 STI, ve 0.8 mg DNaz içeren 40 mL 1M glisin, 2 mM EDTA ile süspanse edildi. Oda ısısında 10 dk aralıklı sürelerle çalkalamalarla birlikte Leydig hücrelerinin uzaklaştırılması için inkübe edildi.

13- Seminifer tübüller tekrar 50 ml'lik polipropilenlere taşınarak F12/DMEM eklendi 50 mL hacim doluncaya kadar ve 800 g'de 2 dk santrifüj edildi.

14- Hücrelere, 20 mg kollajenaz ve 0.2 mg DNaz içeren 40 mL F12/DMEM içinde, Pasteur pipeti ile hassas pipetleme uygulandı. Hücreler Erlenmeyer flasklara alınarak su banyosundan 5 dk çalkalanarak peritübüler miyoid hücrelerin uzaklaşması sağlandı.

15- Hücreler, 40 mg hyaluronidaz ve 0.2 mg DNaz içeren 40 ml F12/DMEM içinde hassas şekilde pipetlendikten sonra Erlenmeyer flaskalara alındıktan sonra su banyosunda 30 dk çalkalanarak ekstraselüler matriksin majör elemanı olan hiyaluronik asit yıkımı gerçekleştirildi.

16- Hücreler tekrar 50 mL'lik polipropilenlere alınarak ve 50 mL tamamlanincaya kadar F12/DMEM eklenerek, 2 dk 800 g' de santrifüj edildi.

17- Hücreler, 15 mL'lik polipropilen tüplere taşındı. 15 mL tamamlanincaya kadar F12/DMEM eklenerek ve 800 g' de 2 dk santrifüj edildi Hücre hacmine ve deney düzeneğine bağlı olarak hücreler yeniden süspanse edildi (0.5×10^6 hücre/cm²).

18- Hücreler, 10 mg/mL insulin, 5 mg/ml insan transferrin, 2.5 ng/mL EGF ve 5 mg/mL bacitracin içeren F12/DMEM içinde yeniden süspanse edilmek üzere hazırlandı.

19- Hücreler, düşük (5×10^4 hücre/cm²) ya da yüksek (0.5×10^6 hücre/cm²) yoğunlukta bir gece önceden matrijel ile kaplanmış kurgulanan deneye göre 6, 12, 24 kuyucuklu kültür kaplarına ekildi.

* Deneylerde kullanılan; çoklu kuyucuklu petrilere, cam ince lameller ve iki boşluklu kültür kuyucukları, hücre canlılığını ilerletmek için Matrijel ile izolasyondan bir gün önce kaplandı.

** Sıkı bağlantı permeabilite bariyer işlevlerinin değerlendirilmesi için hücre yoğunluğu $1-1.2 \times 10^6$ hücre/cm² olarak belirlendi.

Enzimatik sindirim ve yıkama basamaklarından oluşan Sertoli hücresi izolasyonunun ardından ekilen Sertoli hücrelerinin kültürü 35 °C ve %5 CO₂ lik etüvde her gün F12/DMEM solüsyonu değiştirilerek toplamda 7 gün sürdürüldü. Sertoli hücrelerinin izole edildiği ve petrilere ekildiği gün, kültüre başlangıç günü (0. gün) olarak kaydedildi. Hücre adezyonunun oluşumu (yaklaşık 2. gün) ve ardından KTB'nin tam oluşumunun gerçekleştiği gün (yaklaşık 4. gün) deney grupları arasındaki farkların tespit edildiği gün olarak belirlendi.

3.2.1. *In vitro* kadmiyum klorid (CdCl₂) ile indüklenmiş Sertoli hücresi kültürü

Kullanılan malzemeler ve solüsyonlar

- 6, 12 kuyucuklu kültür kapları
- Kadmiyum klorid (Katalog no: Sigma Aldrich 202908) 3 µg/mL olacak şekilde su ile çözüldükten sonra F12/DMEM içinde hazırlandı.

İzole edilen Sertoli hücreleri 12 kuyucuklu kültür kaplarına ekildikten sonra kültürün 4. gününde 0, 3, 6, 24 ve 48. saatler takip edilecek şekilde 3 µg/mL (~15 µM) CdCl₂ ile muamele edildi. Her bir saat için 3'er adet kuyucuk belirlenerek zaman bağımlı hücre eldesi sağlandı.

3.2.2. *İn vivo* kadmiyum klorid ile indüklenmiş sıçan testisi

Kullanılan malzemeler ve solüsyonlar

- Kadmiyum klorid
- İntratestiküler iğnesi
- F12/DMEM medium

CdCl₂ %0.1'lik solüsyon içinde 3 mg/kg vücut ağırlığı (v. a.) hazırlanarak her bir zaman noktası için n=5 sayısında sıçana intraperitonel (i. p) enjeksiyon gerçekleştirildi. Daha sonra farklı zaman noktaları için işaretlenen sıçanlar ötenazi ile öldürülerek testisleri skrotumdan alınarak sıvı nitrojen içinde dondurularak lizat hazırlığı yapıldı ve immünoflüoresan boyama deneyleri için -80°C de saklandı.

3.3. Germ hücre izolasyonu

Kullanılan malzemeler ve solüsyonlar

- F12/DMEM medium
- 40 nm pore çapında filtre
- 100 nm pore çapında filtre
- Steril kavisli pens
- Steril kavisli makas
- 50'lik polipropilen

Germ hücreleri erişkin sıçanlardan kollejenaz enzimatik sindirim, filtreleme ve yıkama basamaklarından oluşan prosedür ile gerçekleştirildi. Testisler dekapüle edilerek tunika albugineadan uzaklaştırıldıktan sonra taze serum içermeyen F12/DMEM medyumuna alındı. Sonra seminifer tübüller küçük parçalara ayrılarak farklı pore ölçeklerinde (40 nm/100nm) filtrelerden geçirildi. Son olarak pelet germ hücreleri 800 rpm de 10 dakika immünoblot ve PZR analizlerinde kullanılmak üzere lizat hazırlığı için santrifüj edildi.

3.4. *In vitro* kan-testis bariyeri oluşturma ve TER ölçümleri

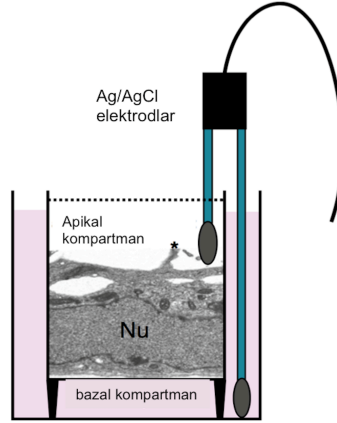
Kullanılan malzemeler ve cihazlar

- Millipore Millicell-ERS elektirik akımı ölçüm cihazı
- Anot-katot elektrodlar
- 24 kuyucuklu iki birimli plate (çift odacıklı birim) (**Şekil 3.4.**)

Sertoli hücreleri Matrijel ile kaplı çift odacıklı birimlerine 1.2×10^6 hücre/cm² yoğunlukta ekildiğinde, çift odacıklı birimler arası epitel oluşarak işlevsel KTB-geçirgenliği oluşturma yeteneği kazanır. Bu birimlerdeki hücreler ~20 mA lik elektriğe direnebilmektedirler. Elektrik akımı Millipore Millicell-ERS metre ile alt ve üst üniteye iki elektrod yerleştirilmesi ile verildi ve ölçüm gerçekleştirildi. (**Şekil 3.4.**) bariyer işlevi ohms (W) cinsinden ölçüldü. Bu ölçüm yüzey alanı ile çarpılarak hücre epitelinde geçen transepitelyal elektrik rezistansına ulaşıldı. Ölçümlerden 20 dakika önce çift odacıklı üniteler kültür kabin içine alınarak oda ısısına getirildi ve ölçüm ardından medyumları yenilenerek ertesi gün yeniden ölçülmek üzere inkübatöre alındı. Ölçümlere, kültürün başladığı günden (0. gün) 24 saat sonra her gün aynı saatte tekrar edilmek üzere başlandı ve rapor edildi. Ölçümler saat yönünde 4 farklı noktadan ölçüldü.

Her bir kuyucuktan önce boş (hücre içermeyen çift odacıklı birim) ölçüm yapıldı.
Kayıtlar aşağıda belirtilen formül ile desteklendi:

$$\text{TER: Rezistans}_{\text{bilinmeyen}} - \text{Rezistans}_{\text{boş}} = \text{Rezistans}_{\text{hesaplanan}} \times \text{Etkilene} \text{ n yüzey alanı} = W \text{ cm}^2$$



Şekil 3.4. Sertoli hücrelerinin çift odacıklı birim içinde yerleşiminin şematik çizimi. Uzun uçlu prob alt birimde yer alırken, kısa uçlu prob hücrelerin yer aldığı üst birimde yer almaktadır. Nu, Sertoli hücresi çekirdeği.

3.5. FAK/c-Src substratı olan ezrine özgü siRNA çiftleri kullanılarak, ezrin geninin RNAi tekniği ile Sertoli hücrelerinde *in vitro* baskılanması

Kullanılan malzemeler, solüsyonlar ve cihazlar

- Spektrofotometre
10 mg/ml insülin, 5 mg/ml insan 2.5 ng/ml EGF ve 5 mg/ml içeren F12/DMEM
- Ribojuice Transfeksiyon Ajanı (Katalog no: Novagen TB332)
- OPTI-MEM serumsuz media (Katalog no: Thermo Scientific 31985070)
- siRNA çiftleri: sense, 5 -GGACUUAACAUUUUAU- GAGAtt-3 , antisense, 5-UCUCAUAAAUGUUAAGUCCaa-3 (s132626); and sense, 5 - GGACAGUGCUAUGCUCGAAAtt-3, antisense, 5 - UUCGAGCAUAGCACUGUCctt-3 (s132627) (Ambion)
- Nükleaz içermeyen su
- Transfeksiyon belirteci siGLO (Katalog no: Dharmacon D-001630-01-XX)

Sertoli hücresi kültüründe KTB'yi *in vivo* taklit eden (Cheng ve Mruk 2012)(endo ref 3); SB, BEÖ, oluklu bağlantı ve desmozom ultra yapıları içeren yapısal işlevsel KTB'nin oluşumunun başladığı gün yaklaşık olarak 3. gün olarak belirlenmiştir (Siu ve ark. 2005). Hücreler yukarıda belirtilen ezrin-özü küçük interferaz RNA (siRNA) çiftleri ve hedef gen içermeyen kontrol siRNA çiftleri, Ribojuice transfeksiyon ajanı kullanılarak, 150nM transfekte edildikten sonra 24 saat kültüre edildi ve 24 saat sonunda ajanı uzaklaştırmak için yıkama gerçekleştirilerek taze F12/DMEM ile kültüre devam edildi. RNA interferaz etkisinin Sertoli hücreleri arası KTB işlevindeki değişikliklerin tespit edilmesi için 24 saat sonra RNA eldesi amacı ile, 48 saat sonra immüno blot ve immüno flüoresan deneyleri için hücreler toplandı. İmmüno flüoresan deneylerinde başarılı transfeksiyonun yapıldığını gösterebilmek (Su ve ark. 2012) amacı ile transfeksiyon solüsyonuna 1 nM siGLO kırmızı transfeksiyon belirteci kullanıldı.

3.6. İmmünohistokimyasal (İHK) analizler

Kullanılan malzemeler ve solüsyonlar

- Bouin's tespit solüsyonu
- Parafin
- Alkol serileri (% 50, % 70, %90, %100)
- Ksilol
- %30'luk hidrojen peroksit (H₂O₂) (Katalog no: 216763, Sigma-Aldrich)
- Lam/lamel
- Sitrat tamponu (10mM)
- PBS 10X STOK
- PBS 1X
- Normal keçi serumu
- Streptavidin- horseradish peroksidaz (HRP)
- DAB (3-amino-9-etilkarbazol)
- Olympus BX61 ışık mikroskobu

İmmünohistokimya analizleri, Bouin's tespit solüsyonu ile tespit edilen ve prafine gömülerek elde edilen kesitlerde, deparafinizasyon, rehidratasyon aşamalarından sonra gerçekleştirilmiştir. Antijen açığa çıkarma yöntemi olarak 10mM sitrat tamponu içinde (pH: 6.0) 10 dakika mikrodalgada inkübasyon uygulanmıştır. Kesitler %10 normal keçi serumu ile bloklandıktan sonra hedef antikolar ile (**Tablo 3.6.**) gece boyu +4 °C'de inkübe edilmiştir. Daha sonra kesitler, biyotinli keçi anti-tavşan IgG ve ardından streptavidin- horseradish peroksidaz ile muamele edilerek mikroskop altında görüntüleme için renk geliştirilmesi 3-amino-9-etilkarbazol kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.6. İmmüno blot, immüno presipitasyon, immüno flüoresan ve immüno histokimya deneylerinde kullanılan antikorlar.

Antikor	Kaynak türü	Firma	Katalog numarası	Çalışma dilüsyonları	
				İB/İP	İF/İHK
Aktin	Keçi	Santa Cruz Biotechnology	sc-1616	1:200/1:500	
Arp3	Fare	Sigma Aldrich	A5979	1:3000/1:500	
β1-integrin	Tavşan	Santa Cruz Biotechnology	sc-8978	1:300	1:100
Eps8	Fare	BD Biosciences	610143	1:5000	
Ezrin	Fare	Abcam	ab4069	1:300	1:50
Ezrin	Tavşan	Santa Cruz Biotechnology	sc-20773	1:1000	1:200
GAPDH	Fare	Abcam	ab8245	1:1000	1:200
JAM-A	Tavşan	Santa Cruz Biotechnology	sc-25629	-/1:300	1:100
Laminin γ3	Tavşan	Cheng Lab. (Yan&Cheng 2006)		1:100/1:100	
N-kaderin	Fare	Invitrogen	33-3900	1:200/1:200	1:100
Nektin-3	Tavşan	Santa Cruz Biotechnology	sc-28637	-/1:300	
Okludin	Tavşan	Invitrogen	71-1500	1:300/1:300	1:100
Palladin	Tavşan	Protein Tech Gropu	10853-1-AP	1:1000	1:100
p-Src-Tyr ⁴¹⁶	Fare	Millipore	05-677	1:1000	
p-FAK-Tyr ³⁹⁷	Tavşan	Abcam	ab4803	1:1000/1:300	
Src	Fare	Santa Cruz Biotechnology	sc-8056	1:200/1:500	
ZO-1	Tavşan	Invitrogen	617300	1:300/1:300	1:100
Keçi IgG-HRP	Sığır	Santa Cruz Biotechnology	sc-2350	1:3000	
Tavşan IgG-HRP	Sığır	Santa Cruz Biotechnology	sc-2370	1:3000	
Fare IgG-HRP	Sığır	Santa Cruz Biotechnology	sc-2371	1:3000	
Tavşan IgG-Alexa 555	Keçi	Invitrogen	A21429	1:200	
Tavşan IgG-Alexa 488	Keçi	Invitrogen	A11034	1:200	
Fare IgG-Alexa 555	Keçi	Invitrogen	A21424	1:200	
Fare IgG-Alexa 488	Keçi	Invitrogen	A11029	1:200	

3.7. Çift işaretli immunoflüoresan (İF) boyama analizleri

Kullanılan malzemeler, solüsyonlar ve cihazlar

- Kriyomatriks
- % 0.1'lik Triton-X
- Fosfat tamponlu tuz solüsyonu (PBS)
- Yuvarlak lamel (coverslip)
- Olympus BX61 flüoresan mikroskop

Çift işaretli immunoflüoresan boyama için, doku sıvı nitrojen içine alınarak kriyomatrikse ile yapıştırıldıktan sonra kriyotom aracılığı ile kesitler alındı. Sertoli hücrelerinin, ince lamelin çoklu kuyucuklu kültür kaplarının içine yerleştirilmesi ve o şekilde kültüre edilmesinin ardından hücreler fikse edilerek boyama işlemi gerçekleştirildi. F-aktin boyamaları FITC (yeşil) yada rodamin (kırmızı) konjuge phalloidin (**Tablo 3.6**) ile işaretlenirken, aynı hücre ya da dokuda ikinci hedef protein farklı bir renk ile işaretlendi. Hücre nükleusları DAPI ile işaretlenerek mavi renkte gösterildi. Flüoresan görüntüler Olympus BX61 flüoresan mikroskop ile görüntülenerek Image-J yazılım programı ile analiz edildi. Görüntülenen hücrelerde ki boyamalar Photoshop in Adobe Creative Suite (version 3.0) ile birleştirildi ve birlikte-lokalizasyonları gösterildi. Antikor dilüsyonları **Tablo 3.6'da** gösterilmiştir.

3.8. İmmüno blot (İB) analizleri

Kullanılan solüsyonlar ve cihazlar

- Güç kaynağı
- Jel dökme tankları (5L hacimli) + örnek yükleme için 20 kuyucuklu taraklar
- Lizat hazırlığı için SDS-örnek tamponu:
- Protein ölçümleri için BCA kiti (Katalog no: Sigma BCA-1)
- PBS-Tris 10x STOK
- Sodyum dodesil sülfat (SDS)
- Tris
- Glisin
- Metanol
- Yıkama solüsyonu: PBS-Tris 1X + %0.1 Tween20

- Elektroforez solüsyonu
- %5'lik süt tozu (Katalog no.): 100 mL yıkama solüsyonu içinde 5 g süt tozu çözdürülerek hazırlanmıştır.
- Alt tank transfer solüsyonu: 72 g Glisin + 15 g Tris/ 4 L distile su içinde çözdürüldükten sonra 1 L Metanol eklenir.
- Üst tank transfer solüsyonu: 600 mL alt tank transfer solüsyonu + 6 mL %10'luk SDS
- Üst SDS-jel malzemeleri: Akrilamid + TRIS ph: 8
- Alt SDS-jel malzemeleri
- Flüoresan ışımaya ajanı: 250 mM Luminol ($C_8H_7N_3O_2$, 5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione, (Katalog no: A8511, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) + 90 mM p-Coumaric acid (Katalog no: C9008, Sigma-Aldrich)/ dimetil sulfoksit- DMSO- (Katalog no: D5879, Sigma-Aldrich) içinde çözdürülerek – 20'de alikvatlar halinde kullanıma hazır hale getirildi.
- Kullanım sırasında; %30'luk H_2O_2 (Katalog no: 216763, Sigma-Aldrich) eklenerek ışımaya oda ısısında alındıktan sonra Fujifilm görüntüleme sisteminin karanlık bölmesinde sonuçlar bilgisayar aracılığı ile elde edildi.

Testis, Sertoli hücreleri ve germ hücrelerinden elde edilen lizatlar her deney için ependorflara toplanmış ve immünoblot analizleri için hazırlanmıştır. Testis için 20 ug, Sertoli hücreleri için 8ug, germ hücreleri 30 μ g protein SDS-PAGE sistemi üst jeline yüklemek üzere örnek tampon solüsyonu içinde hazırlanmış, yükleme, elektroforez ve transfer işlemlerinden sonra **Tablo 3.6'da** gösterilen hedef antikörlerin reseptivitesinin görüntülenmesi için PVDF membran üzerinde Flüoresan ışımaya ajanı aracılığı ile FUJI film görüntüleme sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.9. Ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR)

Kullanılan malzemeler ve solüsyonlar

RNA eldesi için:

- TRIzol (Katalog no: Thermo Scientific 15596026)
- Kloroform
- İzopropanol
- %75'lik Etanol
- Dietilprokarbonat (DEPC) su (Katalog no: Sigma D5758)

Ters transkriptaz reaksiyonu için malzemeler

(Katalog no: Ambion AM1710)

- DNAz I
- 10x DNAz I tampon
- 50 mM EDTA
- 50 mM Oligo DT
- Enzim karışımı: M-MLV RT tampon, 200 mM DTT, 10 mM dNTP, RNAz inhibitörü (40 U/μL), M-MLV Ters transkriptaz (200 U/μL)

Primerler ile reaksiyonun kurulması için:

- 5X yeşil GoTag tampon
- GoTagDNA polimeraz
- MgCl₂ (Katalog no:..)
- Primer çiftleri (**Tablo 3.9**)
- cDNA örneklerinin elektroforezi için DNA jeli: 24.9 ml %30 Akrilamid (Katalog no: Biorad 1610158), 7.5 ml 10X Tris/Borate/EDTA (TBE). 0.945 ml %10 Amonyum persülfat APS (Katalog no: Sigma A3678), 90 ul Tetramethylethylenediamine TEMED (Katalog no: Biorad 1610800) 114.5 ml steril su

Testis, Sertoli hücreleri ve germ hücrelerinin RNA elde etmek için dokular TRIzol ajanı ile muamele edilmiştir. Total RNA cDNA ya M-MLV geri transkriptaz ile geri transkribe edilmiştir. Seçilen hedef genlerin cDNAları, gerekli primerler S16 pozitif kontrol GoTagDNA polimeraz kullanılarak PZR ile amplifiye edilmiştir.

Tablo 3.9. RT-PZR deneylerinde kullanılan primer çiftleri

Gen	Primer sekans	Oryantasyon	Pozisyon	Uzunluk, bp	Isı, °C	Döngü No.	GenBank Accessio n No:
Ezrin	5'- TCGGAGAT TATAACAA GGAAATGC- 3'	Sense	883- 906	208	55	25	NM_019 357
	5'- GATCCCAT ACATTTCCA GGTCCTG-3'	Anti-sense	1068- 1091				
S16	5'- TCCGCTGC AGTCCGTTT AAGTCTT-3'	Sense	15-38	385	55	25	XM_341 815
	5'- GCCAAACT TCTTGGTTT CGCAGCG-3'	Anti-sense	376- 399				
OAS1	5'- GAGTGAAG TTTGAGGTC CAGA-3'	Sense	350-370	230	54.6	30	NM_138 913
	5'- CTCCGTGA AGCAGGTA GA-3'	Anti-sense	562- 579				
STAT1	5'- TCCGCTGC AGTCCGTTT AAGTCTT-3'	Sense	712- 729	218	54.9	30	NM_032 612
	5'- GCCAAACT TCTTGGTTT CGCAGCG-3'	Anti-sense	912- 929				

3.10. Birlikte-immünopresipitasyon (Ko-immünopresipitasyon)(Ko-İP)

Kullanılan solüsyonlar ve cihazlar

- Rotator
- A/G PLUS-Agaroz boncuklar (Katalog no: Sigma P1925)
- İmmünoblot deneylerinde kullanılan tüm solüsyonlar ve cihazlar

Birlikte immünopresipitasyon deneylerinde immünoblot için elde edilen proteinler yeniden hesaplanarak kullanılmıştır: Seminifer tübüller için 600 ug, Sertoli hücreleri için 300 ug protein kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Boncuklar ile muamele edilen lizatlar, santrifüj edilerek %40 dönüş hızında rotator yardımı ile **Tablo 3.6.**'da gösterilen hedef antikörlerin bağlanması sağlanmıştır. Elde edilen ürünler PVDF membran sisteminde görüntüleme alınmak üzere SDS-GEL'e yüklenmiştir.

3.11. Ezrine özgü siRNA çiftleri kullanılarak, ezrin geninin RNAi tekniği ile testiste *in vivo* baskılanması

Kullanılan malzemeler ve solüsyonlar

- *In vitro* gen baskılama deneylerinde kullanılan tüm solüsyonlar ve cihazlar
- Sıçan testis enjeksiyonu için: intratestiküler iğne

Ezrin geninin *in vivo* baskılanması için, 350 –375 g vücut ağırlığında sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanların sol testislerine Ribojuice transfeksiyon ajanı (EMD Millipore) ve kontrol siRNA çiftleri, sağ testisine ise Ribojuice transfeksiyon ajanı ve ezrin siRNA çiftleri, intratestiküler enjeksiyon ile verilmiştir. Her bir testis 1.6 g, 1.6 mL hacim ile hesaplanarak transfeksiyon ajanı karışımı 100 nM siRNA konsantrasyonu için 200ul olarak belirlenmiştir. Transfeksiyon; 0. gün ve 48 saat sonra olmak üzere toplam iki kez gerçekleştirilmiştir. 4. gün ve 6. gün için ayrı gruplarda yer alan sıçanlar diseke edilerek farklı deneylerde kullanılmak üzere testis dokuları alınmıştır.

3.12. Histolojik analizler

Kullanılan malzemeler ve solüsyonlar

- Hematoksilen-eozin boyama seti
- Kapatma solüsyonu

Histolojik analizler spermatogenezdeki defektleri tespit etmek amacı ile gerçekleştirilmiştir. Gruplar arası değişiklikler 80 adet rastgele seçilen evre VIII ve evre IX tübüllerde toplamda dörder sıçandan analiz edilmiştir. Hematoksilen-eozin boyanması ile kesitler incelenmiştir. Genel morfolojiye bakılarak değerlendirilen ve anlamlı olarak tespit edilen defektler ise şöyledir:

- 1- Spermatid taşınmasında defektler/spermiyasyon
- 2- Spermatid polaritesinde defektler
- 3- Fagositoz defektleri

3.13. *In vivo* kan-testis bariyeri bütünlüğü analizleri

Kullanılan malzemeler ve solüsyonlar

- İntratestiküler iğne
- FITC- konjuge inulin (Mr 4.6 kDa) (Katalog no: Sigma-Aldrich F3272)
- *In vitro* gen baskılama deneylerinde kullanılan solüsyonlar

İşlevsel bir test ile ezrin genel sessizleştirilen sıçan testislerinde KTB bütünlüğünün bozulduğunun gösterilmesi için kullanılmıştır (Li ve ark. 2006). Bu test, bozulmamış Sertoli hücresi bariyerinin flüoresan işareti, bloklama ve adlüminal kompartman içine geçirmeme yeteneğinin görüntülenmesi ile yapılmaktadır. Kontrol RNAi ve ezrin RNAi gruplarında gerçekleştirilmiştir. 0. gün *in vivo* RNAi transfeksiyonu gerçekleştirildikten 48 saat sonra ikinci transfeksiyon yapılmıştır. 4. Gün ise KTB bütünlüğünün ölçümü için KTB bütünlüğü testi uygulanmıştır.

3.14. Flüoresan yoğunluk analizleri

Kullanılan malzemeler ve solüsyonlar

- İmmünoflüoresan deneylerinde kullanılan solüsyonlar

Sertoli hücrelerinde gerçekleştirilen *in vitro* RNAi deneyleri 3 deney grubuna karşılık 3 kontrol grubunda en az 200 hücrenin sayılması ile analiz edilmiştir. Sertoli hücrelerinde ki ya da testis seminifer tübülündeki hedef proteinin flüoresan yoğunluğu ImageJ 1.45 programı (US National Institutes of Health, Bethesda, MD; <http://rsbweb.nih.gov/ij>) kullanılarak ölçülmüştür. Spermatid taşınmasında bozuk spermiyasyon, spermatid polarite kaybı ve fagozom taşınmasındaki defektlere bağlı olarak özellikle evre VIII ve evre IX tübüller en az 50 tane rastgele seminifer tübül seçilerek değerlendirilmiştir.

3.15. İstatistiksel analizler

Sertoli hücresi kültüründe her bir grup için en az 3 adet ince lamel üzerine hücre ekimi (İHK ve İF deneyleri), kuyucuk (İB için) ve çift odacıklı birimler (TER ölçümleri için) kullanılmıştır. Her bir veri noktası ya da sütun grafiği 3-5 deneyin ortalama ve standart sapma (SS) değeri kullanılarak oluşturulmuştur. Her bir deney için uygulama yapılan gruplar kontrole göre normalize edilmiş ve 1'e ayarlanmıştır. İstatistiksel analizler GB-STAT bilgisayar programı kullanılarak Dunnett's test devamında two-way ANOVA kullanılarak, seçilen grupların Student's t testi çiftli karşılaştırmaları ile gerçekleştirilmiştir.

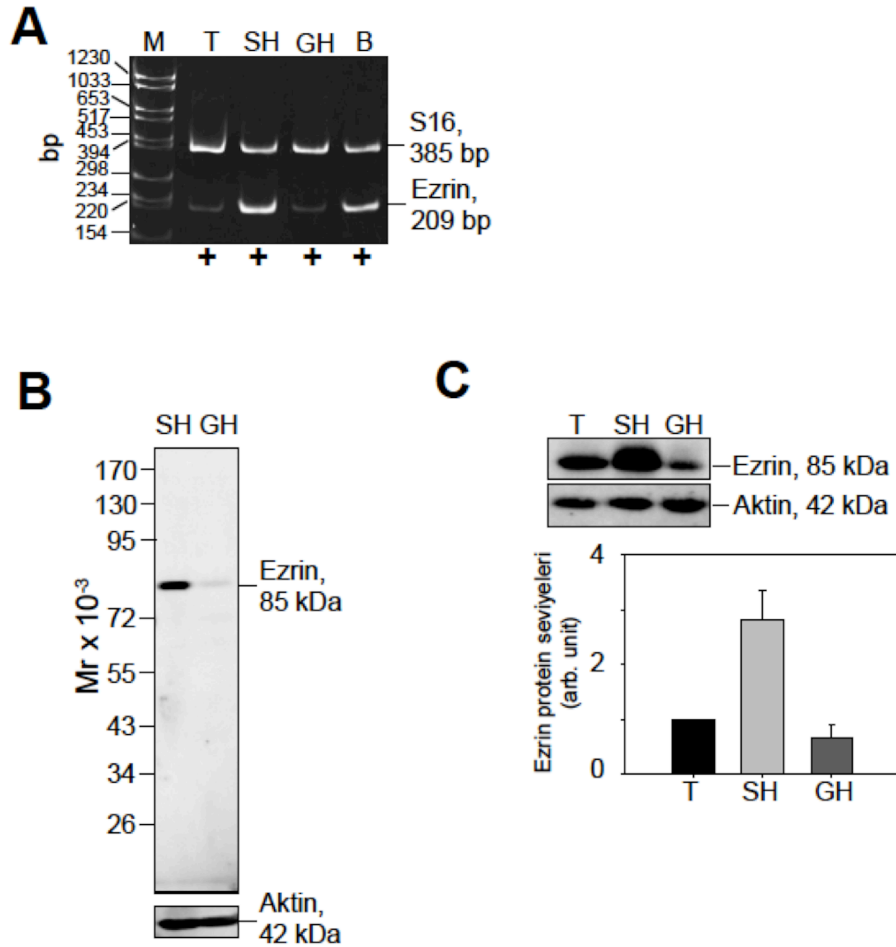
4. BULGULAR

4.1. Hipotezin temelini oluşturan bulgular

Hipotezimizde sunulan FAK/c-Src yolağının KTB'indeki çalışma mekanizmasının araştırılmasında, bu yolakta esas sitoplazmik aktin organizasyonundan sorumlu c-Src ile birlikte çalıştığı bilinen ezrin proteininin araştırılması ilk hedefimiz olarak belirlenmiştir. c-Src substratı olan ve hücre-hücre bağlantılarında, gerek *in vivo* gerekse *in vitro* kanser çalışmalarında bağlantı komplekslerinin düzenlenmesinden sorumlu olduğu bilinen ezrin geninin KTB'deki işlevsel mekanizmasının araştırılması için RNAi teknolojisi ile baskılanması hedef yolağın araştırılması amacıyla uygun görülmüştür. Ezrinin ilk olarak testiste, Sertoli hücrelerinde ve germ hücrelerindeki varlığı gösterilmiş ve evreye-özü yerleşimleri ortaya konmuştur. Kan-testis bariyerinin düzenlenmesinde önemli olan seminifer tübül evreleri detaylı olarak ön bulgularımızda incelenmiştir. Önemli bir bulgu olarak aktin-bağlayıcı protein olan ezrinin kan-testis bariyerindeki yerleşimi ile, FAK/c-Src yolağını kapsayan pek çok düzenleyici protein ile ilişkili çalıştığını gösterdik. Ayrıca kadmiyum klorid ile oluşturulan testis hasarı modelinde, ezrinin evreye-özü ekspresyonu ve kadmiyum uygulamasına karşı ezrin yerleşiminin azaldığını gösteren temel bulgularımızın paralelinde *in vitro* Sertoli hücresi kültüründe de kadmiyum modeli kullanılarak ezrin protein yerleşimi değerlendirilmiş ve bu protein baskılandığında KTB dinamiğindeki olası değişiklikler de ikinci temel hedef olarak bu tez ile araştırılmıştır.

4.1.1. Ezrin geninin testiste, Sertoli ve germ hücrelerindeki varlığının gösterilmesi

Aktin-bağlayıcı bir protein olan ezrin, 85kDa moleküler ağırlığa sahiptir. Sıçan testisinde; Sertoli hücrelerinde ve germ hücrelerinde sentezlendiği gerek ezrine özgü antikor kullanılarak immüno blot yöntemiyle gerekse ezrin için primer çiftleri kullanılarak RT-PZR yöntemi ile gösterilmiştir (Şekil 4.1.1.).

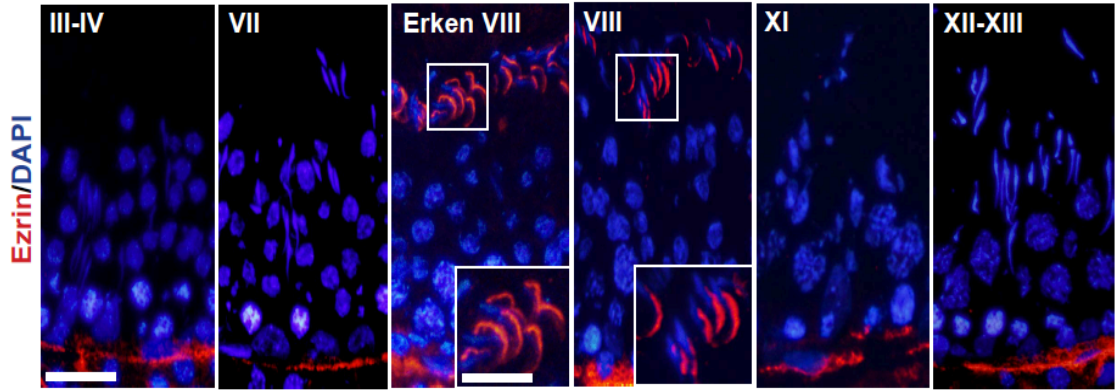


Şekil 4.1.1. Erişkin sıçan testisinde ezrin protein ve mRNA ekspresyon düzeyleri. A, ezrinin tüm testis (T), Sertoli hücreleri (SH) ve germ hücrelerindeki (GH) yerleşimi. Kontrol dokusu böbrek olarak kullanılmıştır. S16; RT-PZR internal kontrolü olarak kullanılmıştır. M; DNA baz çiftlerinin ölçüm aralığını göstermektedir. B, Sertoli hücresi ve germ hücresine özgü ezrin yerleşimi. C, Testis (T), Sertoli hücresi (SH) ve germ hücresi (GH) lizatları örnek başına yaklaşık 30 µg protein kullanılarak ezrin protein düzeyleri tespit edilmiştir. Aktin, pozitif kontrol olarak sunulmuştur. İmmüno blot verileri histogramda her bir sütun, 3 farklı örneğin ortalama ± SS değerlerini, aktin ile normalize edilerek özetlenmiştir. Ezrinin ilişkili protein düzeyi, testiste 1'e ayarlanmıştır.

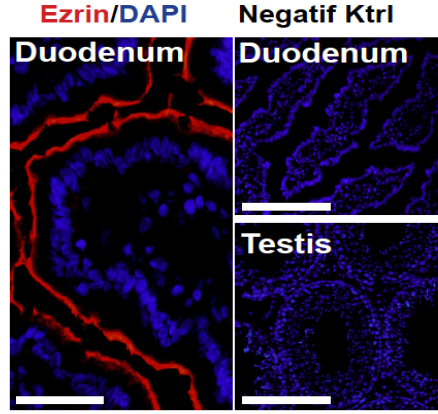
4.2. Ezrin proteininin testiste, seminifer epitel döngüsünde evreye-özü varlığının gösterilmesi

Ezrin proteininin yerleşimi, testiste evreye-özü olarak özellikle erken evre VIII ve evre VIII'de spermatid başı çevresinde yer alan dorsal (konveks) bölgesindeki apikal ektoplazma özelleşmelerinde immunoflüoresan yöntemi ile gösterildi (Şekil 4.2.1). Pozitif kontrol olarak varlığı ince bağırsakta bilinen epitel yüzeyinde lokalize olan ezrin yerleşimi gösterildi (Şekil 4.2.2.).

Ezrin, Şekil 4.2.1'de seminifer epitelin bazaline yakın ve KTB lokalizasyonu ile uyumlu şekilde görülmektedir. Seminifer epitel döngüsünün, evre VII hariç, bütün evrelerinde yerleşimi görülmektedir. Apikal ektoplazma özelleşmelerinde evrelere özü olarak varlığı tespit edilmiştir. Evre VII'de AES'de varlığı görülmezken evre VIII'da özellikle spermatid başının dorsalinde (konveksinde) net olarak sentezlendiği gözlenmektedir. Evre IX'da ezrin, F-aktinden bağımsız olarak Sertoli hücreleri tarafından fagosite olmak üzere olan atık sitoplazmalarda sentezlenmektedir. Bu bulgular, ezrinin bazal ve ektoplazma özelleşmeler için ve fagosite edilen atık sitoplazmalar ile ilişkili olarak spermatid ve fagozom taşınmasına dahil olduğunu göstermektedir.

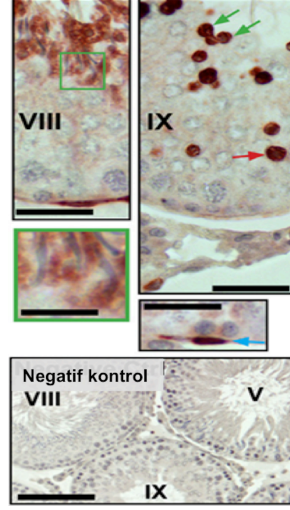


Şekil 4.2.1. Ezrinin (kırmızı) erişkin sıçan testisinde seminifer epiteldeki lokalizasyonu. Ezrin yerleşimi AEÖ'de evre VIII tübüller ile sınırlı olarak görülmektedir. Ancak evre IX'da ezrin sitoplazmik atıklarda da gözlenmiştir. KTB/BEÖ'de ezrin evre IX hariç tüm evrelerde sentezlenmektedir. Evre IX'da yerleşimi tamamen ortadan kaybolmaktadır. Skala bar: 50 µm. Küçük kutucuklar ezrinin sentezlendiği alanların büyük büyütme görüntüsüdür; skala bar: 25µm. Bulgular en az 3 deneyin ortalamaları sonucu elde edilmiştir.



Şekil 4.2.2. Ezrinin ince bağırsakta duodenum bölgesindeki lokalizasyonu. Pozitif kontrol olarak kullanılan duodenumda ezrin yerleşimi (kırmızı) epitel hücrelerinde apikal yüzey farklılaşmalarında gözlenmiştir. Fare IgG negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Sol panel skala bar: 120µm; sağ panel skala bar: 300µm.

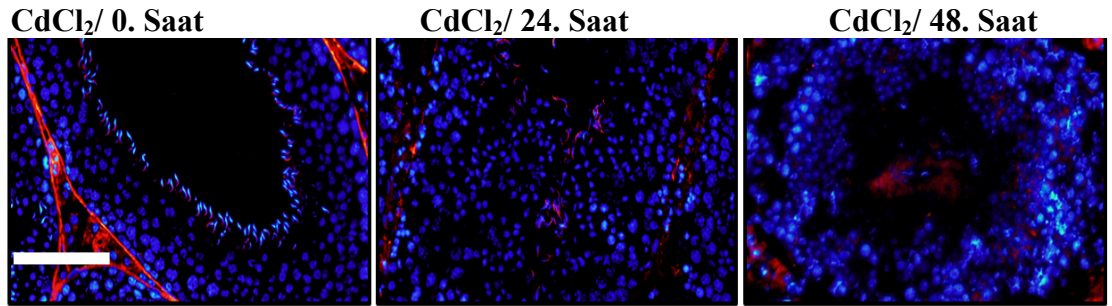
Parafin dokular kullanılarak immünohistokimya yöntemi ile evreye-ölgü seminifer tübüllerdeki yerleşimleri belirlenmiştir ve İF sonuçları ile belirgin şekilde benzer olduğu gösterilmiştir. Özellikle, evre VIII'da uzayan spermatid başlarının Sertoli hücresi apikal ektoplazma özelleşme alanlarında ezrin yerleşimi oldukça belirgindir. Evre IX'da ise spermiyasyon gerçekleştikten sonra rezidüel damlacıklarda da ezrin yerleşimi (yeşil oklar) gözlenmiştir. Ek olarak peritübüler miyoid hücrelerde de ezrin yerleşimi (mavi ok) kaydedilmiştir (**Şekil 4.2.3.**). Negatif kontrol olarak kullanılan dokuda ezrin yerleşimi gözlenmemiştir.



Şekil 4.2.3. Ezrinin sıçan testisindeki hüresel lokalizasyonu. Apikal ektoplazma özelleşmelerinde ezrin yerleşimi (kırmızı-kahverengi) gözlenmiştir. Ezrin daha çok evre VIII'de spermatid başının dorsal tarafında ve Sertoli hücresi apikal ektoplazma özelleşme bölgelerinde gözlenirken, evre IX'de ise atık sitoplazmalarda da sentezlenmektedir. Skala bar: 50 µm, yeşil çizgili kutu skala bar: 25 µm, negatif kontrol skala bar: 150 µm olarak düzenlenmiştir.

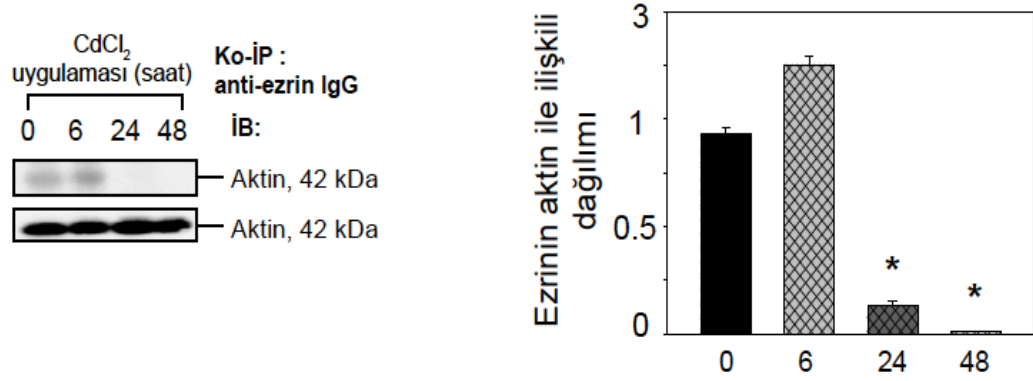
4.3. *In vivo* kadmiyum etkisi altında ezrin protein düzeyleri

Kadmiyumun intratestiküler enjeksiyonu ile zaman bağımlı ezrin üzerindeki etkisi immünoflüoresan (Şekil 4.3.1) ve immüno-presipitasyon (Şekil 4.3.2.) deneyleri ile gösterilmiştir. Ezrin yerleşiminin, kadmiyum etkisi altında azalmasına bağlı olarak, testis hasarı oluştuğunda hücre iskeletindeki ezrin aktin ilişkisinin azaldığı tespit edilmiştir.

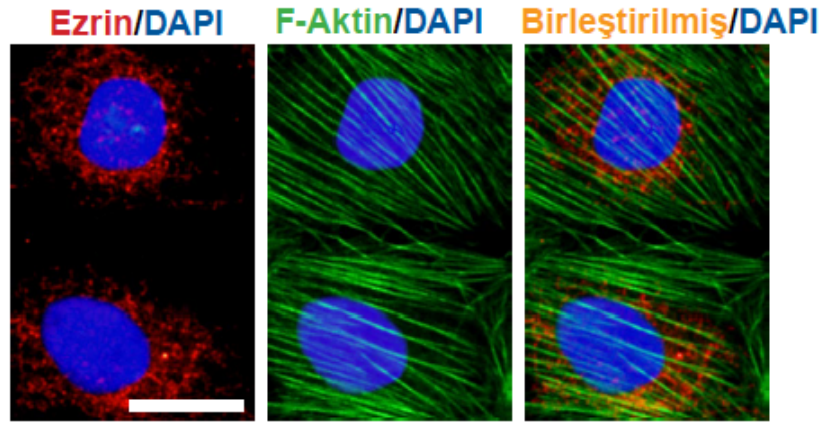


Şekil 4.3.1 Kadmiyum klorid ($CdCl_2$) ile indüklenmiş testis modelinde seminifer epitel evreye-özü ezrin yerleşiminin bozulduğunun immünoflüoresan ile gösterilmesi. Ezrin yerleşimi (kırmızı) kontrol testiste bazal membranda, interstisiyel alan hücrelerinde ve spermatid baş bölgelerinde evre VIII-özü olarak sentezlenmektedir. $CdCl_2$ uygulamasından 24 saat sonra tübüllerin, kadmiyum testis hasarı modeline göre, yapısının bozulduğu ve ezrin yerleşiminin da azaldığı izlenmiştir. $CdCl_2$ uygulamasından 48 saat sonra ezrin yerleşiminin dağınık şekilde tübül içinde yayıldığı gözlenmiştir. Hücre çekirdekleri için DAPI (mavi) kullanılmıştır. Skala bar: 50 µm

Daha sonra Sertoli hücrelerindeki ezrin ile filamantöz aktin (F-Aktin) yerleşimleri immünoflüoresan ile değerlendirildiğinde (Şekil 4.3.3.), hücre iskeletinin organizasyonu için gerekli kor proteini F-aktin yerleşiminin CdCl₂ uygulamasından sonra 24. ve 48. saatlerde ezrin yerleşimi ile birlikte azaldığı tespit edilmiştir.



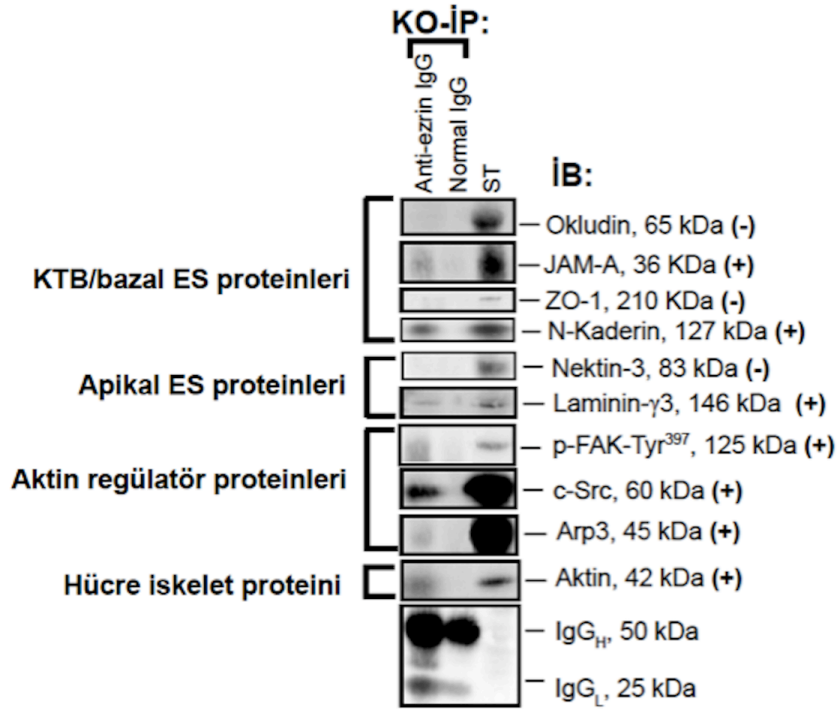
Şekil 4.3.2. Kadmiyum ile indüklenmiş testis modelinde ezrin-aktin etkileşiminin immünopresipitasyon yöntemi ile gösterilmesi. CdCl₂ uygulamasından 6, 24 ve 48 saat sonra ezrin aktin etkileşiminin azaldığı tespit edilmiştir. İmmünobot verileri histogramda her bir sütun, 3 farklı örneğin ortalama ± SS değerlerini, aktin ile oranlanarak özetlenmiştir.



Şekil 4.3.3. Sertoli hücrelerinde ezrinin F-aktin ile ko-lokalizasyonu. Ezrin (kırmızı) ve F-aktin (yeşil) yerleşimlerinin hücre iskeletinde iki boyutlu olarak kesiştiği gözlenmiştir. Hücre çekirdeklerini göstermek için DAPI (mavi) kullanılmıştır. Skala bar: 50 µm

4.4. Ezrin proteini ile bazal EÖ, apikal EÖ, aktin düzenleyici ve hücre iskelet proteinleri yapısal etkileşim bulguları

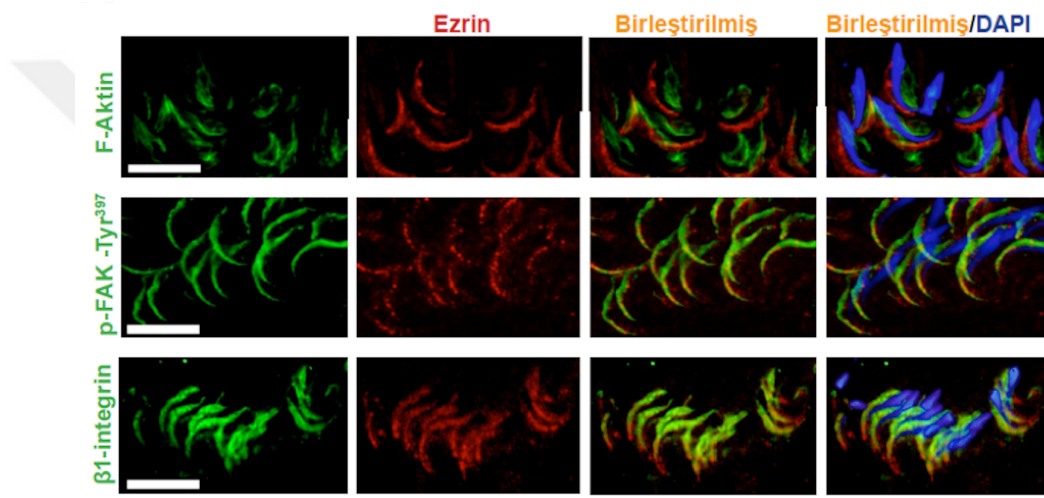
Birlikte-immünopresipitasyon yöntemi ile seminifer tübül lizatları kullanılarak ezrinin yapısal olarak SB proteinlerinden junctional adezyon molekülü-A (JAM-A), ve bazal EÖ proteini N-kaderin ile KTB'de etkileşimde olduğu gösterilmiştir. Ezrin, ayrıca AEÖ proteini olan laminin- γ ile etkileşim gösterirken nektin-3 ile etkileşim göstermemiştir. KTB dinamiğinde aktif olarak aktin düzenleyici görevi olan hücresel Src kinaz (c-Src) ve fokal adezyon kinaz (FAK) fosforile formu Tirozin 397 (p-FAK-Tyr³⁹⁷) ile de ezrinin etkileşimi olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda, aktin-ilişkili protein Arp3 ve ezrinin yapısal etkileşimde olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.2.). Özetle, ezrin bir ektoplazma özelleşme komponentidir ve yapısal olarak F-aktin ve diğer aktin bağlayıcı proteinler ile birlikte kan-testis bariyerinde etkileşim içindedir.



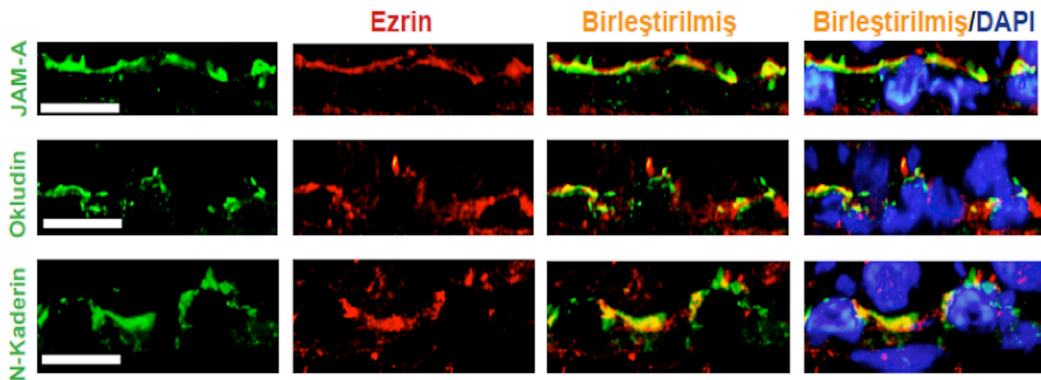
Şekil 4.4. Ezrin proteininin kan-testis bariyerindeki BEÖ, AEÖ, aktin düzenleyici ve hücre iskelet proteinleri ile yapısal etkileşiminin gösterilmesi. Seminifer tübül (ST) proteini (30 μ g) pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. (+), ezrin protein-protein etkileşimi pozitif, (-), ezrin protein-protein etkileşimi negatif.

4.5. Ezrinin ile F-aktin, p-FAK-Tyr³⁹⁷, β 1-integrin, JAM-A, okludin, N- kaderin ile birlikte lokalizasyonu

Şekil 4.5.1’de ezrinin AEÖ ve BEÖ’nin komponentleri ile birlikte çiftli boyama yapılarak IF yöntemi ile yerleşimi gösterilmiştir. Ezrinin (kırmızı), KTB dinamiğinde görev alan ve bazal kompartmanda yer alan SB proteini; okludin (yeşil işaretli), BEÖ proteini; N-kaderin (yeşil işaretli) ve JAM-A (yeşil işaretli), adlüminal kompartamnda yer alan, AEÖ proteini β -1-integrin (yeşil işaretli), aktin düzenleyici protein; p-FAK-Tyr³⁹⁷ (yeşil işaretli) ve son olarak F-aktin (yeşil işaretli) ile birlikte lokalize olması, KTB’de BEÖ ve AEÖ’lerin dinamiğinde rolü olduğunu desteklemektedir.



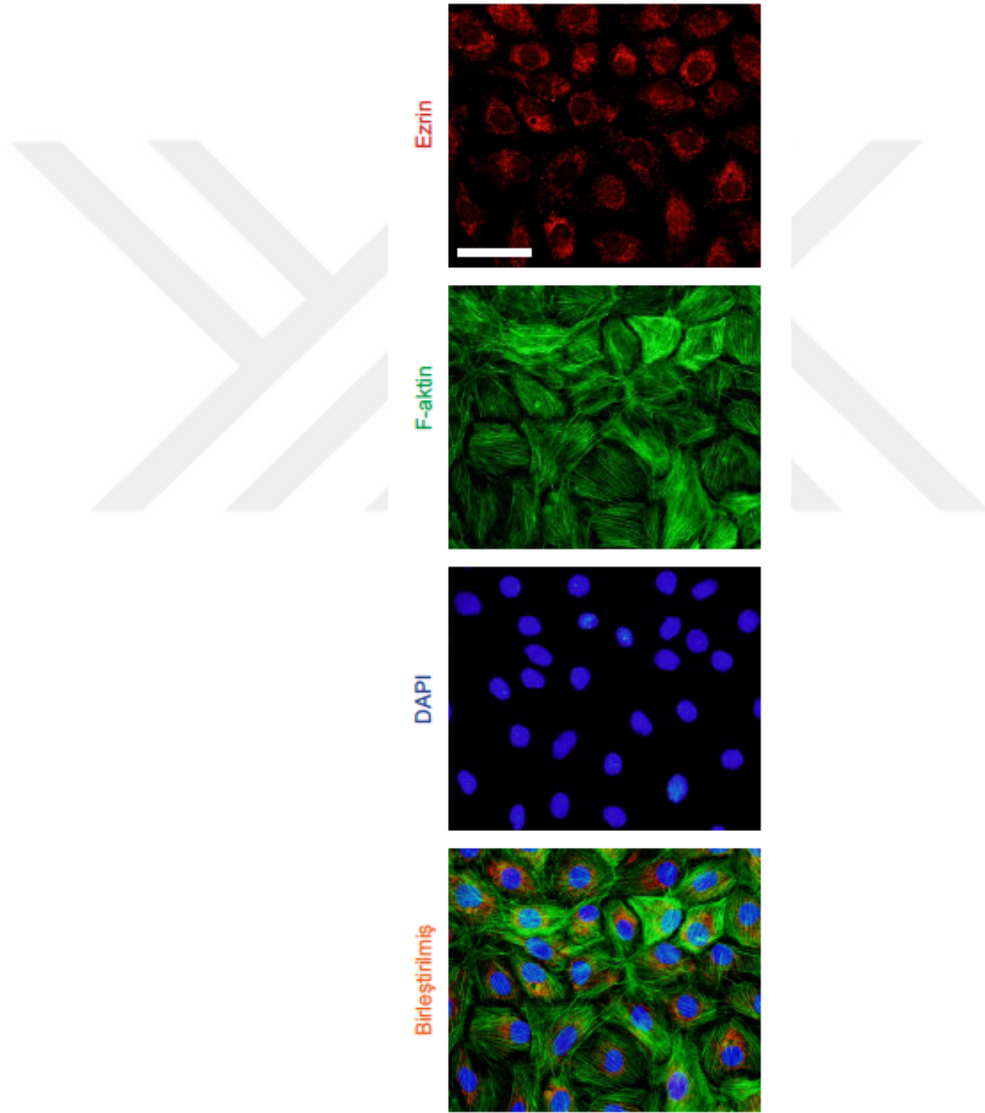
Şekil 4.5.1. Seminifer tübül evre VIII’de uzayan spermatidlerin konveks bölgelerinde ezrin yerleşimi. Ezrin (kırmızı) ve AEÖ proteinlerinden (yeşil); β -1 integrin, p-FAK-Tyr³⁹⁷ ve F-aktinin ko-lokalizasyonlarının (sarı) çiftli flüoresan boyama ile gösterilmesi. DAPI (mavi) çekirdek boyası olarak kullanılmıştır.



Şekil 4.5.2. Seminifer tübül evre VIII’de kan-testis bariyerinde ezrin yerleşimi. Ezrin (kırmızı), bazal EÖ proteinlerinden (yeşil); N-Kaderin, okludin ve JAM-A’nın ko-lokalizasyonlarının (sarı) çiftli flüoresan boyama ile gösterilmesi. DAPI (mavi) çekirdek boyası olarak kullanılmıştır.

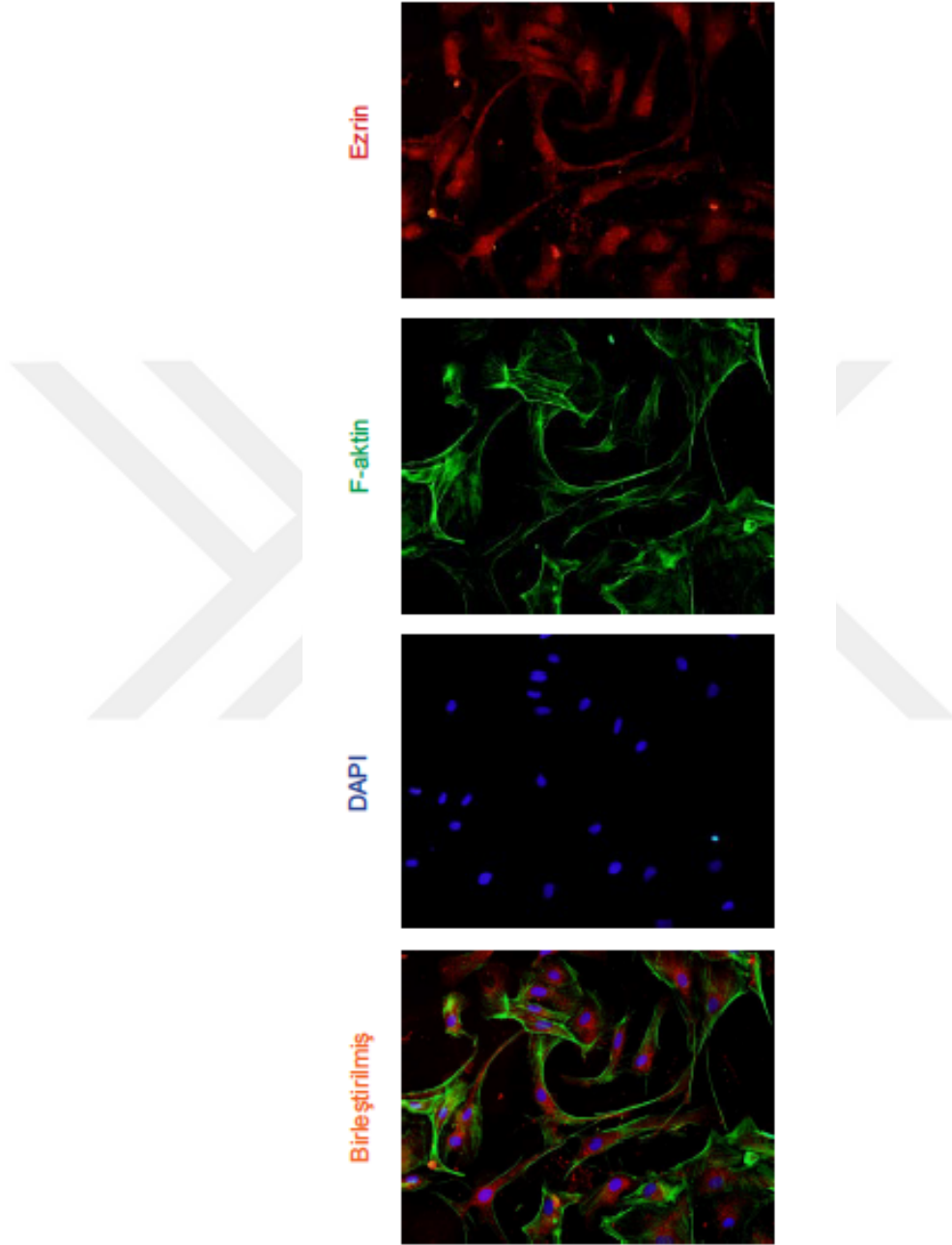
4.6. Farklı hücre yoğunluğu kullanılarak Sertoli hücresi kültüründe elde edilen ezrin ve F-aktin lokalizasyonlarının immünoflüoresan bulguları

Primer Sertoli hücresi izolasyonu ile elde edilen Sertoli hücresi popülasyonunun belirlenen yoğunlukta (0.5×10^6) kültüre edilmesinin ardından kan-testis bariyerinin oluştuğu 3.günde ezrin ve F-aktin yerleşimlerinin birlikte-lokale olduğu tespit edilmiştir. Sertoli hücresi kültüründe hücre iskeletine yayılmış olarak görülen F-aktin yerleşimine ek olarak ezrin yerleşiminin de çekirdek çevresinde yine hücre sitoplazmasında olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.6.1.)



Şekil 4.6.1. Sertoli hücresi kültüründe (0.5×10^6) çiftli immünoflüoresan boyama. Ezrin (kırmızı) ve F-aktin (yeşil) birlikte lokalizasyonları (sarı) gösterilmiştir. Çekirdek boyası olarak DAPI (mavi) kullanılmıştır.

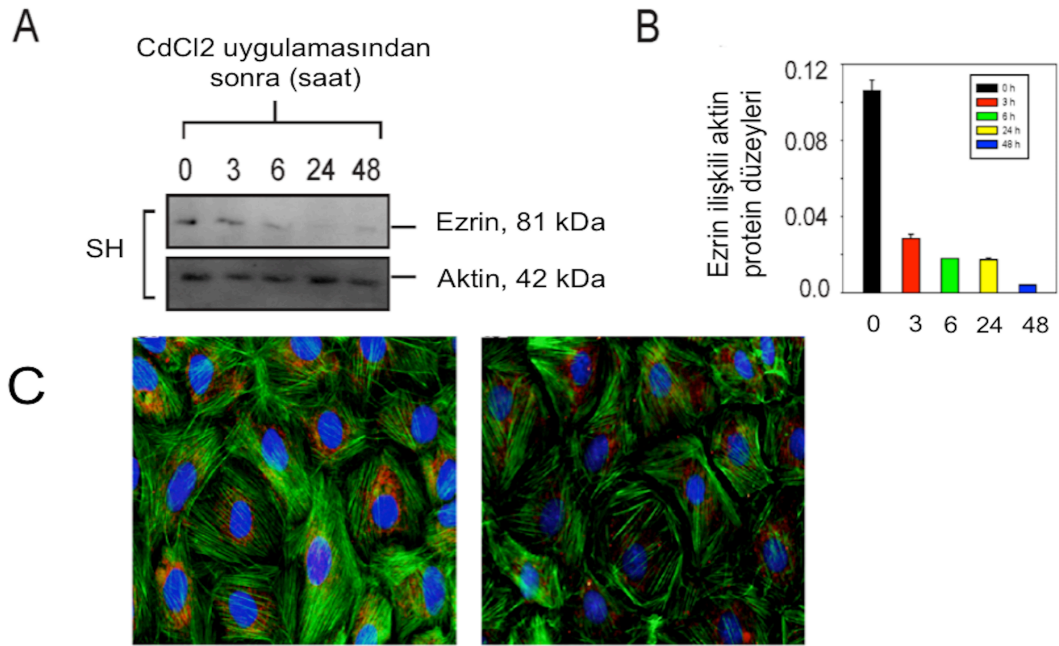
Sertoli hücrelerinin 0.05×10^6 yoğunlukta kültüre edilmesi ardından kan-testis bariyerinin oluştuğu 4.günde ezrin ve F-aktin yerleşimlerinin Sertoli hücreleri arası uzantılarda birlikte lokalizasyonları sitoplazmik olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.6.2.).



Şekil 4.6.2. Sertoli hücresi kültüründe (0.05×10^6) çiftli immünoflüoresan boyama. Ezrin (kırmızı) ve F-aktin (yeşil) birlikte lokalizasyonları (sarı) gösterilmiştir. Çekirdek boyası olarak DAPI (mavi) kullanılmıştır.

4.7. Sertoli hücresi kültüründe kadmiyum etkisi altında ezrin yerleşimi ve F-aktin ile birlikte dağılımı

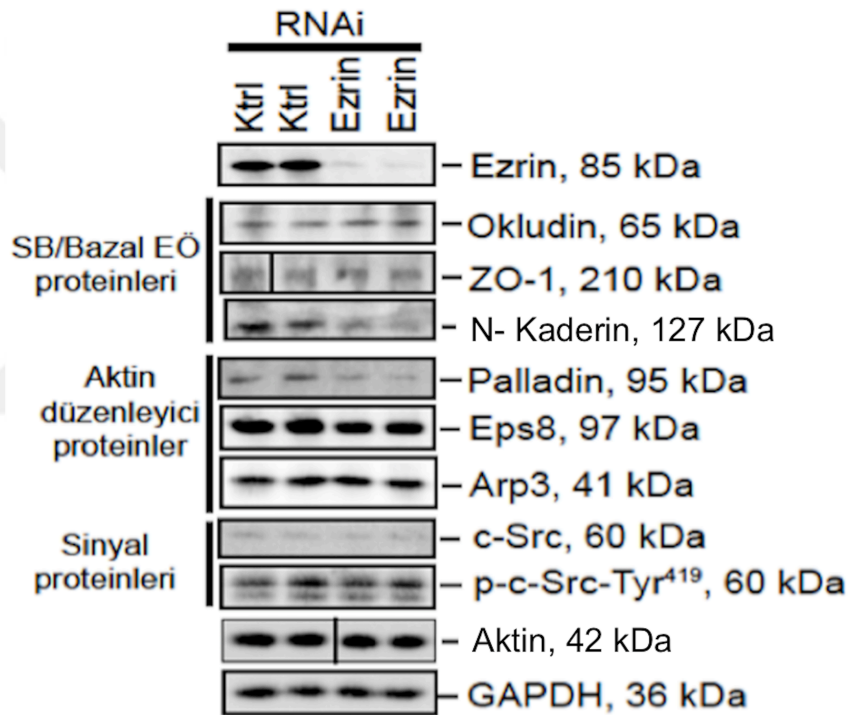
In vitro CdCl₂ uygulanan Sertoli hücresi modelinde ezrinin F-aktin organizasyonu ile ilişkili yerleşimi gösterilmiştir. Üç saatlik CdCl₂ uygulamasından sonra, ezrin protein seviyelerinin azaldığı immüno blot yöntemi ile gösterilmiştir. CdCl₂ uygulamasından 6 saat sonra kültüre edilen hücreler immüno flüoresan yöntemi ile boyandığında F-aktin (yeşil) organizasyonunda bozulmalar ile birlikte ezrin yerleşiminin de azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. Kadmiyum klorid uygulanan Sertoli hücrelerinde ezrin protein düzeyleri ve F-aktin ile birlikte lokalizasyonları. A, İmmüno blot ile CdCl₂ uygulamasının ardından 3., 6., 24. ve 48. saatlerde elde edilen Sertoli hücrelerinde ezrin seviyeleri. B, A'da yer alan immüno blot sonuçlarının grafiksel analizleri. C, Sertoli hücresi kültüründe (0.05 x 10⁶ hücre/cm²) çiftli boyama ile ezrin (kırmızı) ve F-aktin (yeşil) birlikte lokalizasyonlarının (sarı) gösterilmesi. Çekirdek boyası olarak DAPI kullanılmıştır.

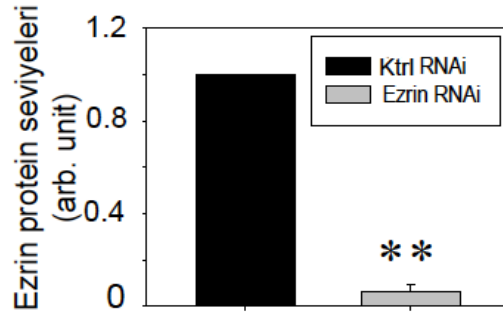
4.8. Ezrin geninin Sertoli hücrelerinde baskılanmasının immünoblot bulguları

Ezrin geninin Sertoli hücresindeki azalan gen ve protein düzeyi gösterilmekle birlikte, Sertoli hücresi KTB'inde sentezlenen SB/Bazal EÖ proteinleri (Okludin, ZO-1, N-Kaderin), aktin düzenleyici proteinler (Palladin, Eps8, Arp3), Sinyal proteinleri (c-Src, p-c-Src-Tyr⁴¹⁹) ezrin geni baskılanmasına bağımlı bir azalma göstermemiştir ve bu bulgu ezrine özgü değişim gösterecek eş proteinlerin varlığını tespit etmek için önemli bir veridir. Ezrin geninin baskılanması ile elde edilen diğer sonuçlar ise, bazal EÖ ve aktin bağlayıcı protein olan N-kaderin ve palladin gibi proteinlerin yerleşimlerinin azalmasıdır (Şekil 4.8.1.).



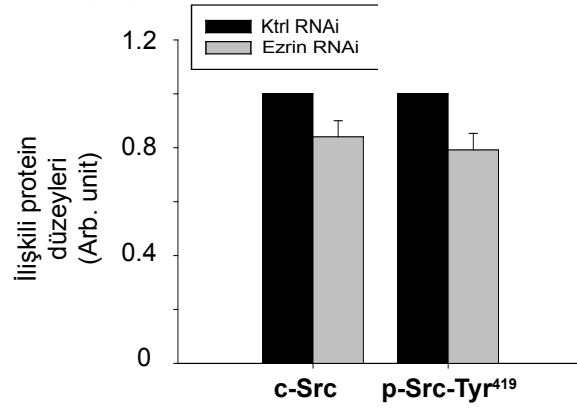
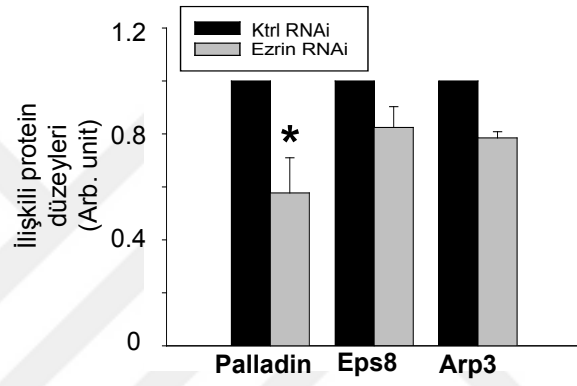
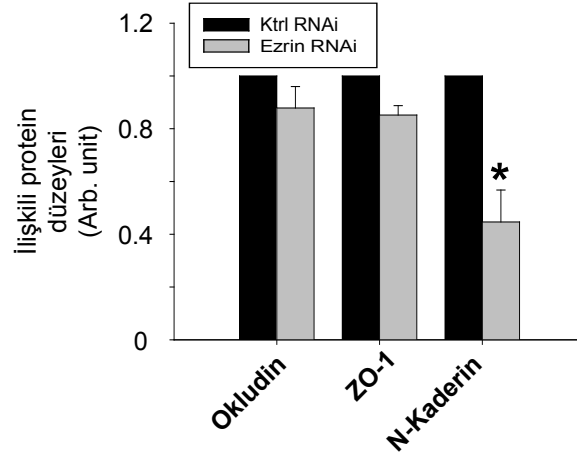
Şekil 4.8.1. Ezrine-özgü siRNA çiftleri ile gen sessizleştirilmesi ile Sertoli hücresi kan-testis bariyerindeki sıkı bağlantı/bazal EÖ, aktin bağlayıcı proteinler ve sinyal proteinlerinin immünoblot sonuçları. Aktin ve gliseraldehit-3 fosfatdehidrogenaz (GAPDH) pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

Sertoli hücresi kültüründe ezrin geninin RNAi teknolojisi ile sessizleştirildiği ve sonucun **Şekil 4.8.1.**'de gözleendiği üzere, ezrinin protein düzeyinde de etkinliğinin yaklaşık %90 oranında başarı ile azaldığını gösterdik (**Şekil 4.8.2.**).



Şekil 4.8.2. İmmüno blot sonuçlarına göre ezrin protein seviyelerinin gösterildiği histogram. Protein seviyeleri kontrolde 1'e ayarlanarak olarak düzenlenmiştir (** P < 0.05).

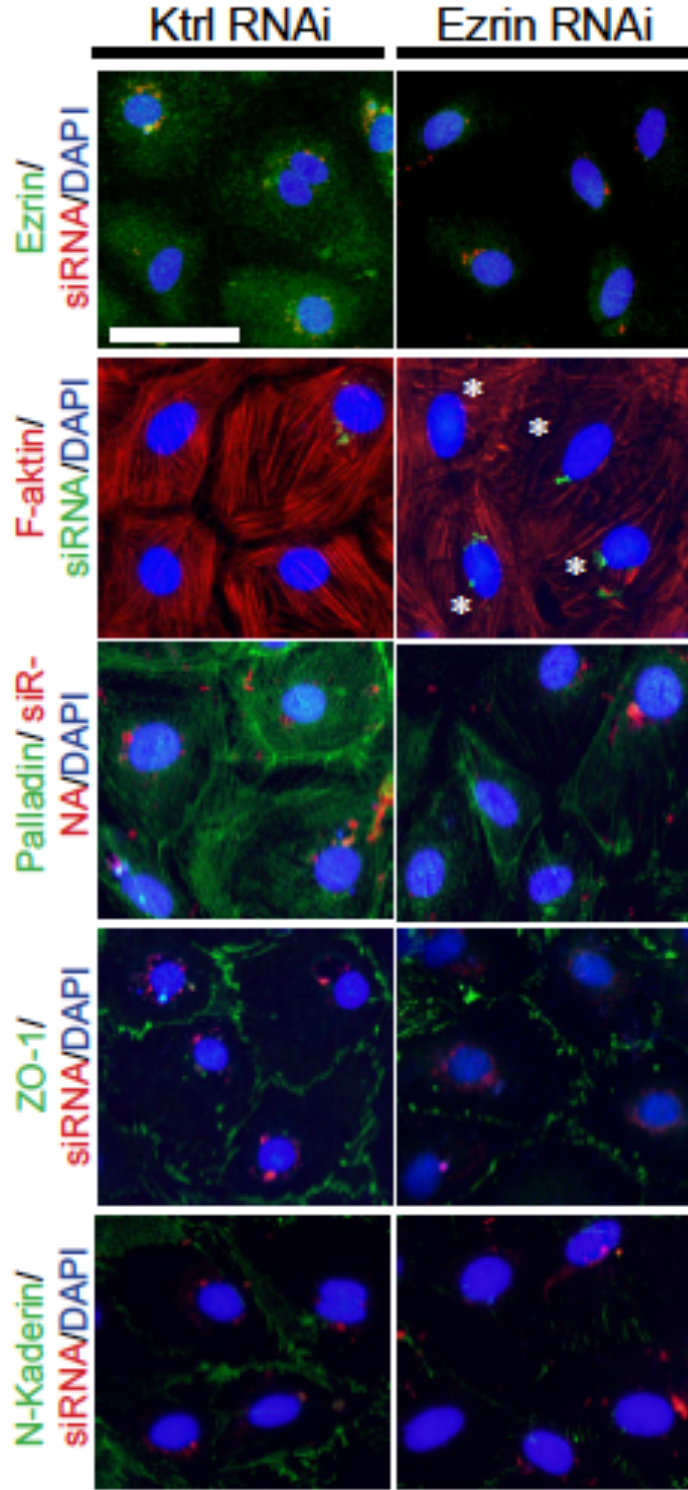
Yukarıda belirtilen bulgularımızda, ezrin gen baskılama deneylerinde Sertoli hücresi kültüründe oluşturulan kontrol RNAi (Ktrl RNAi) ve ezrin RNAi gruplarından elde edilen proteinlerden immüno blot sonuçlarımızın istatistiksel analizleri ve ölçümleri aşağıdaki histogramlar ile desteklenmiştir (**Şekil 4.8.3.**).



Şekil 4.8.3. Ezrine-özgü siRNA çiftleri ile gen sessizleştirilmesi ile Sertoli hücresi kan-testis bariyerindeki sıkı bağlantı/Bazal ektoplazma özelleşme, aktin bağlayıcı proteinler ve sinyal proteinlerinin immünoiblot sonuçları. Her bir veri, istatistiksel kontrol için 1'e ayarlanmıştır. Grafikteki her bir sütun 3 deneyin ortalama±SS olarak göstermektedir (*, $P < 0.05$).

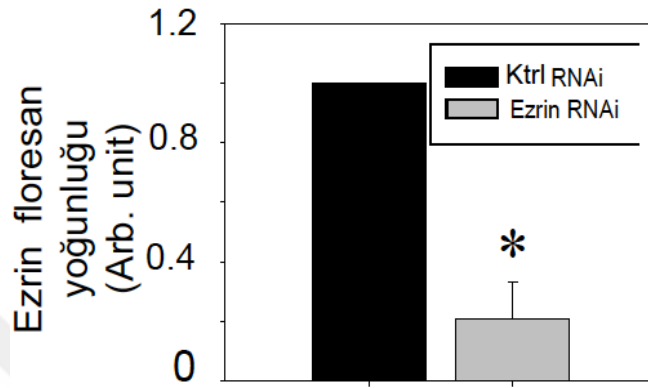
4.9. Ezrin geninin Sertoli hücrelerinde baskılanmasının immunoflüoresan bulguları ile gösterilmesi

Ezrin geni sessizleştirildikten sonra transfeksiyonun 4. gününde Sertoli hücreleri arasında oluşumunu tamamlayan kan-testis bariyeri ve bariyerin düzenlenmesinde görev alan proteinlerin (F-aktin, Palladin, ZO-1, N-Kaderin) immunoflüoresan ile işaretlenerek ekspresyon seviyelerinin Ktrl RNAi ve Ezrin RNAi grupları arasındaki değişiklikleri analiz edilmiştir. Ezrin geni sessizleştirildikten sonra, seçilen hedef protein düzeylerindeki azalma Sertoli hücresi sitoplazmalarında açıkça gösterilmiştir. Kan-testis bariyeri dinamiğinden sorumlu F- aktin ve palladin sentezleyen Sertoli hücresi sitoplazması alanlarında ezrin yerleşiminde azalma ve organizasyonlarının bozukluğu tespit edilmiştir. Ezrin geni sessizleştirildiğinde, kan-testis bariyeri sıkı bağlantılarında ZO-1 yerleşimi yok denecek kadar az etkilenirken, adherens bağlantısı olan N-kaderinin yerleşiminde belirgin bir azalma gözlenmiştir (**Şekil 4.9.1.**).



Şekil 4.9.1. Sertoli hücrelerinde ezrin geni baskılanması ile ezrinin yerleşimindeki, organizasyonundaki, ve/veya lokalizasyonundaki değişikliklerin immünoflüoresan bulguları. Ezrin RNAi hücre sitoplazmalarında F-aktin organizasyonunda kırılmalar (*) gösterilmektedir. Gen baskılama sırasında, transfeksiyon ajanının hücre çekirdeğine gittiğini gösteren işaretleyici 1 nM siGLO (kırmızı) siRNA çiftlerini takip etmek amacı ile kullanılmıştır. Skala bar: 50µm. Sertoli hücresi çekirdeği DAPI (mavi) ile işaretlenmiştir.

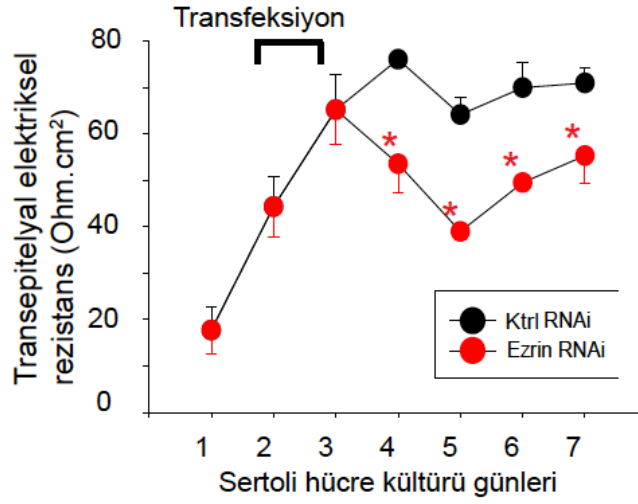
Ezrin geninin sessizleştirildiğinin gösterilmesi için; Sertoli hücresi kültüründe transfeksiyondan sonraki 4. günde flüoresan boya ile işaretlenerek protein düzeyinde ezrin seviyeleri ölçülmüş ve yaklaşık % 90 oranında ezrin yerleşiminin düştüğü tespit edilmiştir (Şekil 4.9.2.).



Şekil 4.9.2. Ezrin proteini flüoresan sinyal yoğunluğunun (Image-J) ile ölçümü. Her bir veri, istatistiksel kontrol için 1'e ayarlanmıştır. Her bir sütun 3 deneyin ortalama±SS olarak düzenlenmiştir (*, P < 0.05).

4.10. Ezrin geninin Sertoli hücrelerinde baskılanması ile edilen TER ölçüm bulguları

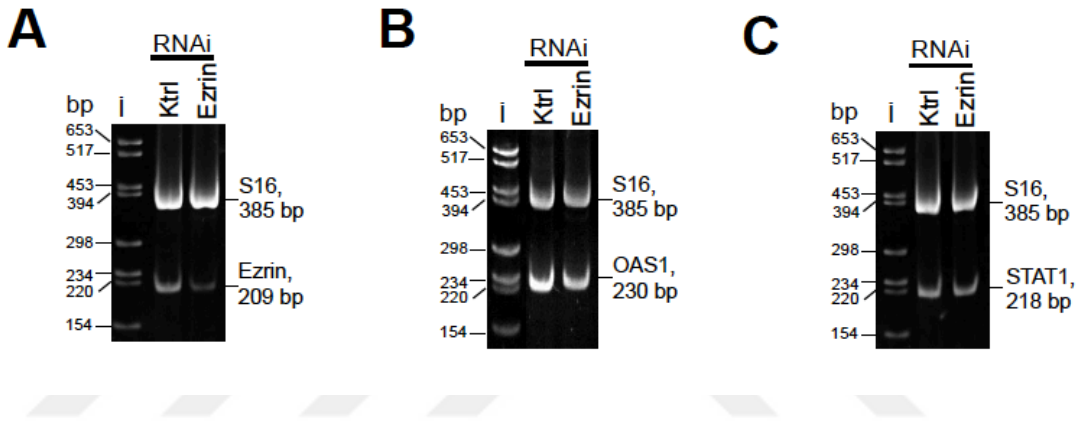
Transfeksiyondan sonra 4. günden itibaren Sertoli hücreleri arasında kurulan KTB'ndeki geçirgenlik değişiklikleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, hücreler arası KTB'nin, sıkı ve kompakt yapısının bozulduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.10.).



Şekil 4.10. Sertoli hücresi kültürü günlerine bağlı olarak KTB geçirgenliğindeki değişiklikler. Her bir veri noktası dört çift odacıklı birimde saat yönünde dört alandan ölçüm alınarak ve üç farklı sıçan kullanılarak elde edilmiştir. Her bir nokta üç deneyin ortalama±SS olarak düzenlenmiştir (*, P < 0.05).

4.11. Ezrin geninin Sertoli hücresi kültüründe baskılanması ve RT- PZR bulguları

Ezrin geninin baskılanmasının gerçekleştirilmesi, Ktrl RNAi ve Ezrin gruplarında mRNA düzeyinde gösterilmiştir. Bu genin baskılanması sırasında interferon-uyarıcı genler olan OAS1 ve STAT1 genleri, memeli hücrelerinin RNAi vektörleri ile transfeksiyonu sonucu özgün olmayan yukarı düzenlenme gösterebilmektedir ve bu hedef dışı etki olarak bilinmektedir. Bu etkinin olmadığı ve bu genlerin artış göstermediği, yani etkilenmediği de RT-PZR bulgularımızda gösterilmiştir (Şekil 4.11.).

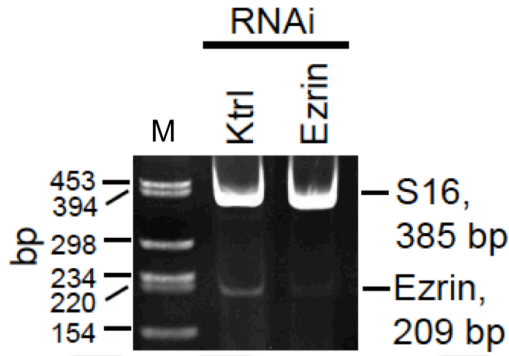


Şekil 4.11. RT-PZR deneyleri ile ezrin ekspresyonunun mRNA düzeyinde azaldığının gösterilmesi. A, Ezrin (209 bp) ve S16 (385 bp) kontrol primer dizisi ile birlikte çiftli zincir reaksiyonu. B, OAS1 (230 bp) ve S16 (385 bp) kontrol primer dizisi ile birlikte çiftli zincir reaksiyonu. C, STAT1 (218 bp) ve S16 (385 bp) kontrol primer dizisi ile birlikte çiftli zincir reaksiyonu. İ: DNA boyutu baz çiftleri (bp) cinsinden işaretleyicisi.

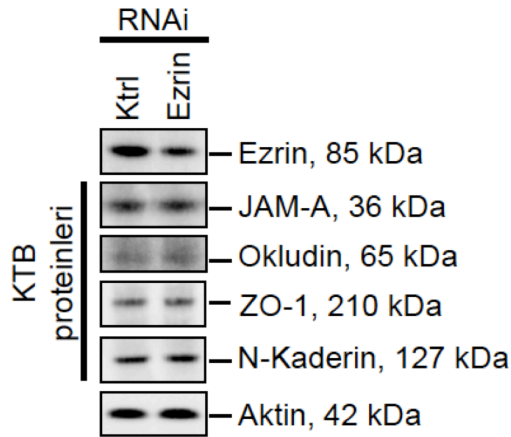
In vitro deneylerimizin sonucu olarak, elde ettiğimiz bulgular doğrultusunda, ezrin geninin Sertoli hücrelerinde baskılanmasının, aktin mikofilamanlarının organizasyonunun ve protein lokalizasyonunun değişmesine neden olduğu ve Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantı geçirgenliğini bozduğu ortaya konmuştur.

4.12. Ezrin geninin *in vivo* baskılanması ile apikal ektoplazma özelleşmelerinin işlevlerindeki bozulmaları gösteren bulgular

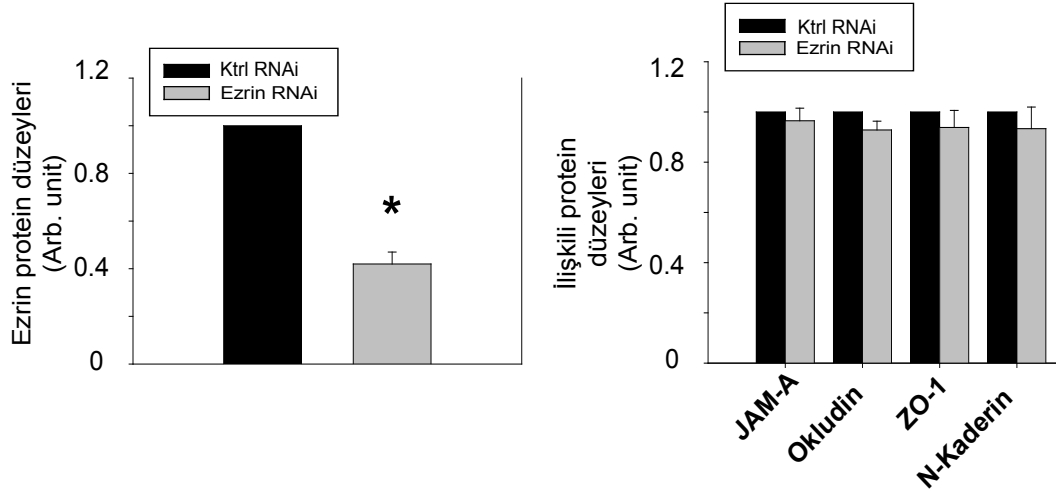
Ezrin geni baskılandığında testis fenotipinde değişiklikler olduğu gözlenmiştir. Gen baskılanmanın etkinliği öncelikle RT-PZR deneyleri ile doğrulanmış (Şekil 4.12.1.) daha sonrasında protein düzeyindeki ekspresyon seviyeleri ile testiste ezrinin *in vivo* olarak yaklaşık %60 oranında sessizleştirildiği tespit edilmiştir. Ektoplazma özelleşme proteinlerinde (JAM-A, Okludin, ZO-1, N-kaderin) ezrin yerleşimine bağlı bir değişiklik gözlenmemiştir (Şekil 4.12.2.). İmmünoiblot sonuçlarının istatistiksel analizleri yapılarak hedef proteinlerin ekspresyon düzeyleri Ktrl RNAi ve Ezrin RNAi grupları arasında değerlendirilmiştir (Şekil 4.12.3.).



Şekil 4.12.1. Ezrin geninin *in vivo* baskılanması ve ezrin etkinliğinin RT-PZR sonuçları. S16 pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. M: DNA işaretleyici, bp: baz çifti.



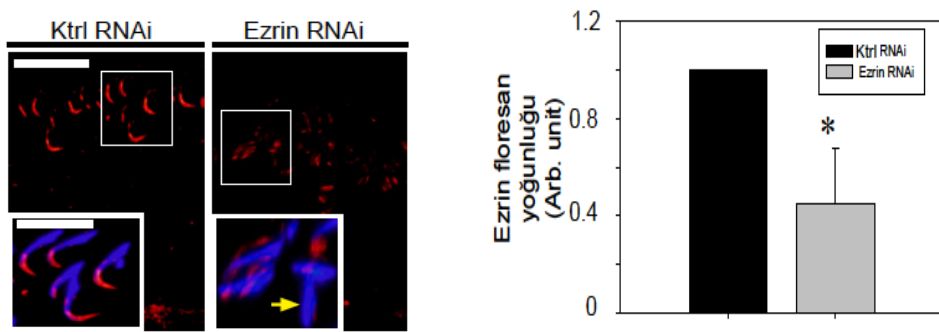
Şekil 4.12.2. Ezrin geninin *in vivo* baskılanması ve hedef KTB proteinlerinin immünoiblot sonuçları. Aktin, pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.



Şekil. 4.12.3. Ezrin geninin *in vivo* testiste baskılanması ile Sertoli hücresi KTB’nde ki ilişkili protein düzeylerinin gösterilmesi. Her bir veri, istatistiksel kontrol için 1’e ayarlanmıştır. Her bir sütun 3 deneyin ortalama± SS olarak düzenlenmiştir *, P < 0.01.

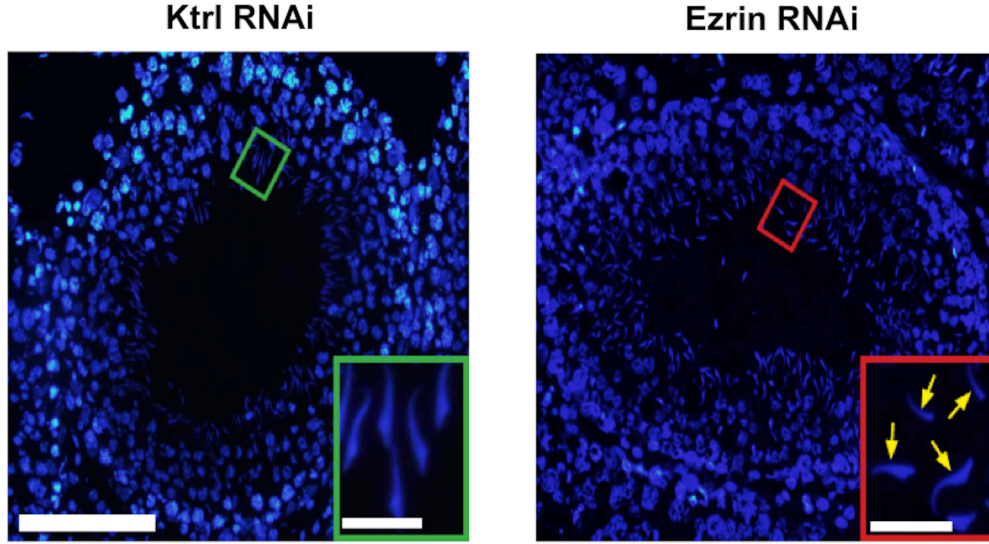
4.13. Ezrin geninin *in vivo* baskılanmasının apikal ektoplazma özelleşmelerindeki histolojik bulguları

Apikal ektoplazma özelleşmelerinin esas görevi spermatid taşınması, spermiyasyon ve spermatid polaritesi olduğundan değerlendirmelerimize histolojik analizler ile devam ettik. Ezrin geninin etkinliğini gösteren immünoflüoresan bulgularımızda ezrinin daha önceden rapor edilen spermatid konveks bölgesinde yani Sertoli hücresi apikal EÖ bölgesindeki yerleşiminin ortadan kalktığını ve lokalizasyonunun bozulduğunu tespit ettik (Şekil 4.13.1.).



Şekil 4.13.1. Ezrin geninin baskılanmasının etkinliğini gösteren immünoflüoresan bulguları. Sol panelde evre VIII’de ezrin (kırmızı) yerleşiminin yok olduğu ve büyük büyütmede ezrin yerleşiminin (sarı oklar) lokalizasyonunun değiştiği gösterilmiştir. DAPI çekirdek boyası olarak kullanılmıştır. Skala bar: 50 µm ve 25 µm dir. Sağ panelde, ezrin ekspresyon şiddetlerinin ölçümü gerçekleştirilerek histogram oluşturulmuştur. Ölçümler rastgele seçilen tübüllerdeki ezrin yerleşimleri değerlendirilerek oluşturulmuştur ve ortalama±SS olarak düzenlenmiştir *, P < 0.05.

Spermatid polaritesindeki defektleri göstermek amacı ile sadece çekirdek boyası olarak DAPI (mavi) kullanılarak spermatid baş bölgesi oryantasyonunu değerlendirdik ve bazal membrana doğru yönelmiş olması gereken spermatid başlarının tübül bazaline göre en az 90° lik bir açısal lokalizasyonda durduğunu ve yönünün bozulduğunu tespit ettik (Şekil 4.13.2.).



Şekil 4.13.2. Ezrin geni *in vivo* baskılandığında spermatid polaritesindeki bozulmanın immünflüoresan sonuçları. Evre VIII tübüllerde Ktrl RNAi (sol panel) ve Ezrin RNAi (sağ panel) gruplarının karşılaştırılması ve büyük büyütmelerinin sırasıyla yeşil ve kırmızı ile çevrili kutucuklarda spermatid oryantasyonu değerlendirilmiştir. Skala bar: 120 µm, 25 µm.

4.14. Ezrin geninin *in vivo* baskılanması ile elde edilen seminifer tübül evresine özgün histolojik bulgular

Seminifer tübüllerindeki genel incelemelerimiz sonucu ezrin geni baskılandığında evre VIII ve evre IX tübüller hariç tekrar eden defektli bir görünümü olmadığını tespit ettikten sonra hematoksil-eozin ile boyama yaptığımız histolojik kesitlerimizde, evre VIII tübüllere ve spermatid taşınması sonrası bilinen özelliğinden dolayı evre IX'a odaklanarak ezrin yerleşimlerinin apikal ektoplazma özelleşmelerindeki değişikliklerini değerlendirdik. Kontrol RNAi grupları ile Ezrin RNAi grupları karşılaştırıldığında evre VIII'de tübül genelinde daha eozinofilik boyanmalar olduğunu gözlemledik (**Şekil 4.14./a-b**). Ayrıca, ezrin RNAi tübüllerin fenotiplerinde epitel kalınlığı azalmış seminifer tübül epiteli gözlemledik ancak belirgin sayıdaki tübülde aynı fenotip tekrarı gözlemediğimizden ötürü anlamlı bir defekt olarak değerlendirmeye almadık (**Tablo 4.14.**)

Tablo 4.14. Ezrin geninin *in vivo* baskılanmasının seminifer tübül histolojik yapısına yansımaları

Özgün siRNA çiftleri kullanılarak ezrin baskılanması devamında sıçan testisinin seminifer epitelinde ki fenotipik değişiklikler - kontrol ile karşılaştırılmalı olarak*

Spermatid taşınmasında defektler/spermiyasyon (Evre VIII-IX tübüllerde >5 tübül bazalinde sıkışan uzamış spermatidler)	%16.5±8.0
Spermatid polaritesinde defektler (Evre VII-VIII tübüllerde >5 polaritesini kaybeden** uzamış spermatidler)	%8.2±1.58
Fagositoz defektleri geç evre IX tübüllerin adlüminal kompartmanındaki >3 fagozomlar	%7.5±2.77

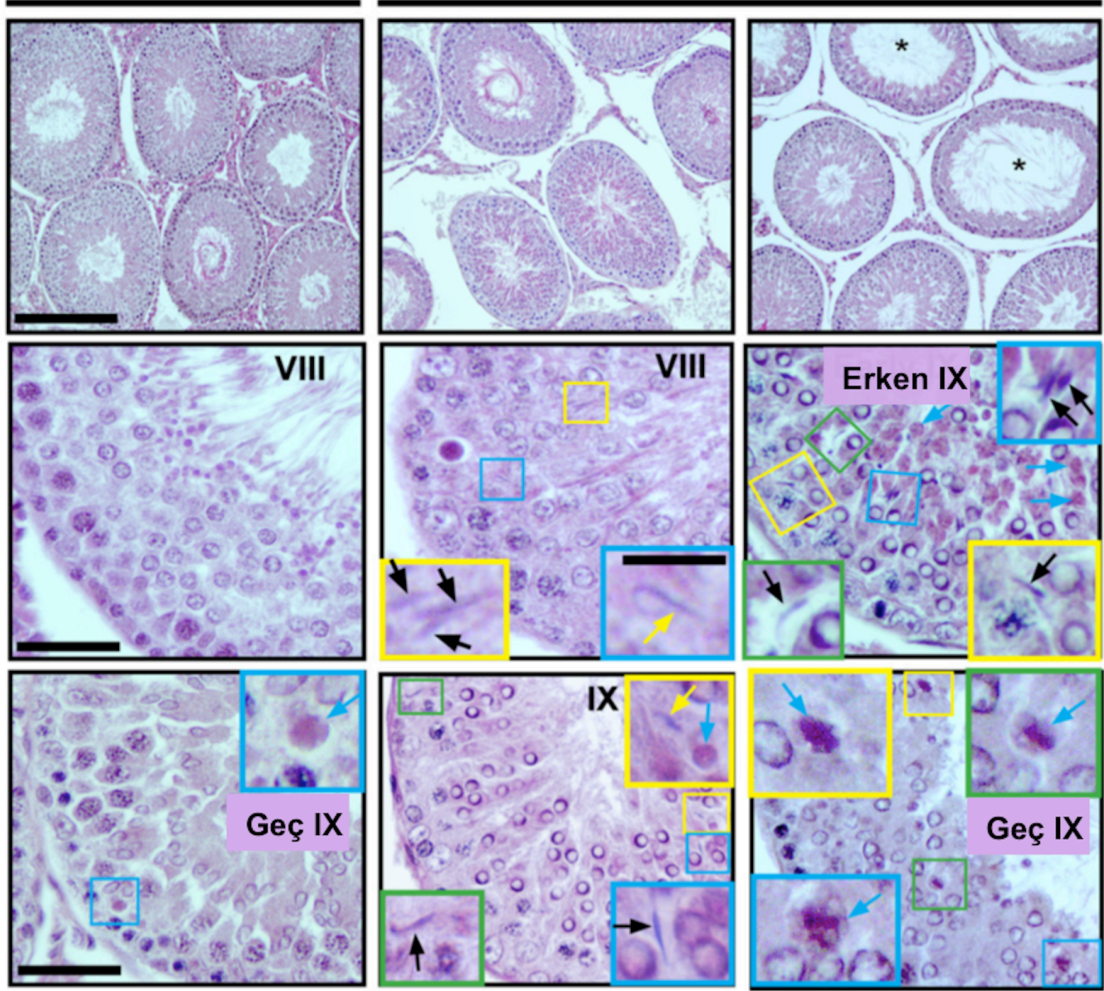
* Her bir veri noktası ezrin RNAi (n=3) grubu, uygulama yapılmamış kontrol siRNA çiftleri ile karşılaştırılmıştır (ortalama±SS).

** Uzamış spermatid baş bölümünün olması gereken oryantasyondan en az 90° dönmüş olması.

Spermatid taşınması ile ilgili defektleri: 1- Önemli bir bulgu olarak evre VIII ve evre IX tübüllerde, tübüllerin lümeninin kenarında salınmak üzere bulunması beklenen basamak 19 spermatidlerin epitelin derinliklerinde sıkışıp kaldığını gözlemleyerek (**Şekil 4.14/e-f**); 2- tübül içi atık sitoplazma içeren fagozom yapılarını (mavi oklar) izleyerek değerlendirdik. Evre IX'da degrade olması için evre VIII'de bazal kompartmana transferin gerçekleşmesi gereken atık sitoplazmaların adeta Sertoli hücreleri tarafından yutulmuş olduğunu ve evre IX'da adlüminal kompartmanda lokalize olduğunu tespit ettik (**Şekil 4.14/h-i**).

Ktrl RNAi

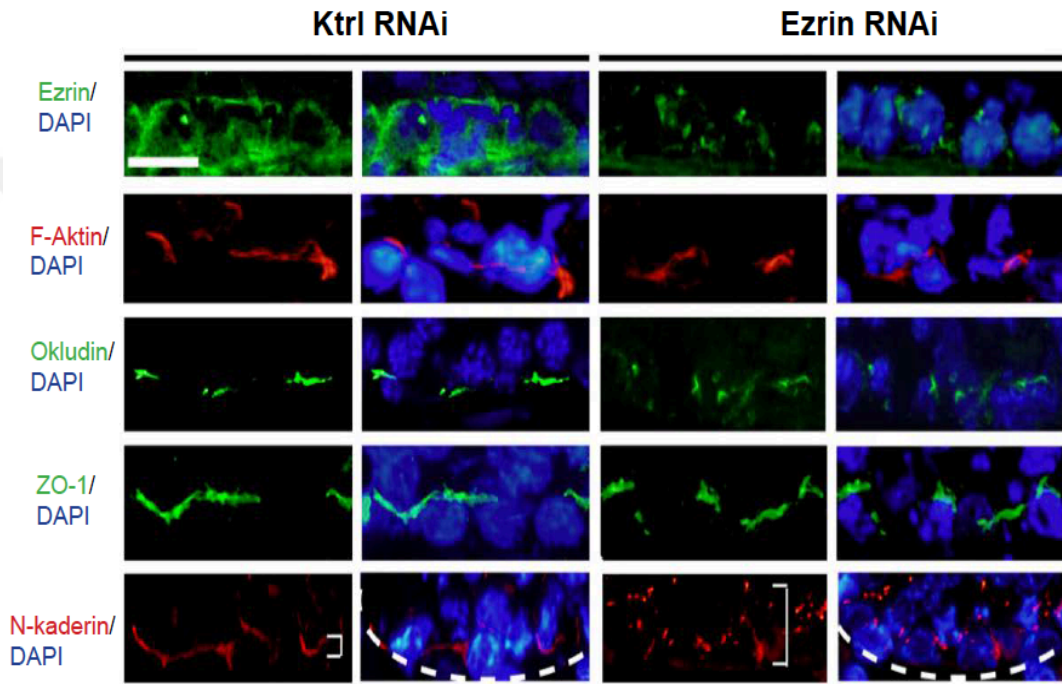
Ezrin RNAi



Şekil 4.14. Testis parafin kesitlerinde hematoksilen-eozin boyanması. Evre VIII ve IX tübüllerde farklı renkte kutu çizgileri kullanılarak ve büyütmeleri de yine aynı renkte işaretlenerek ezrin *in vivo* gen sessizleştirilen gruplardaki defektler gösterilmiştir. Skala bar (a-c): 320 µm, (d-i): 80µm, (renkli çerçeveli kutucuklar: 30 µm.

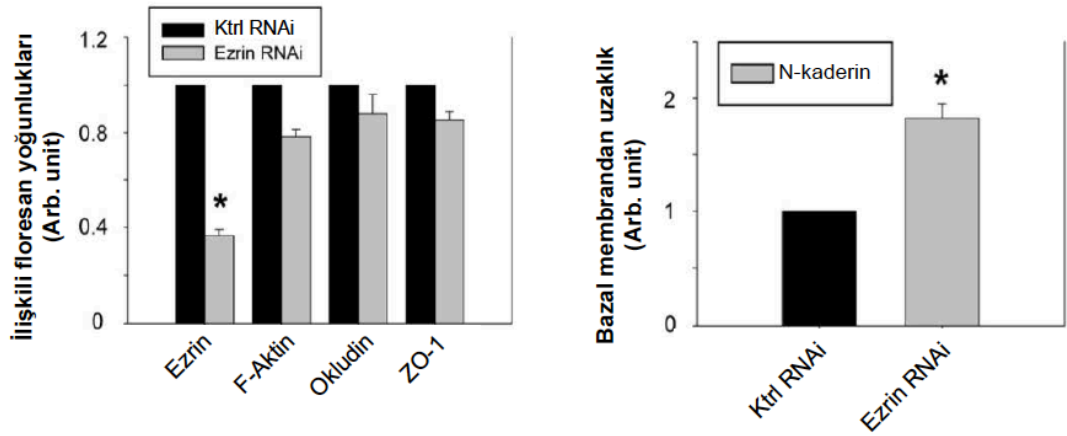
4.15. Ezrin geninin *in vivo* baskılanmasının bazal ektoplazma özelleşmelerindeki histolojik bulguları

Kan-testis bariyeri dinamiğini düzenleyen proteinlerin ekspresyon düzeyleri ve lokalizasyonları *in vivo* olarak ezrin geninin baskılanmasının ardından incelendiğinde, F-aktin, okludin ve ZO-1'in ve bazal ektoplazma özelleşme proteini N-kaderin proteinlerinin flüoresan sinyallerinin değişmediği ancak N-kaderin lokalizasyonunun bozulduğunu tespit ettik (Şekil. 4.15.1).



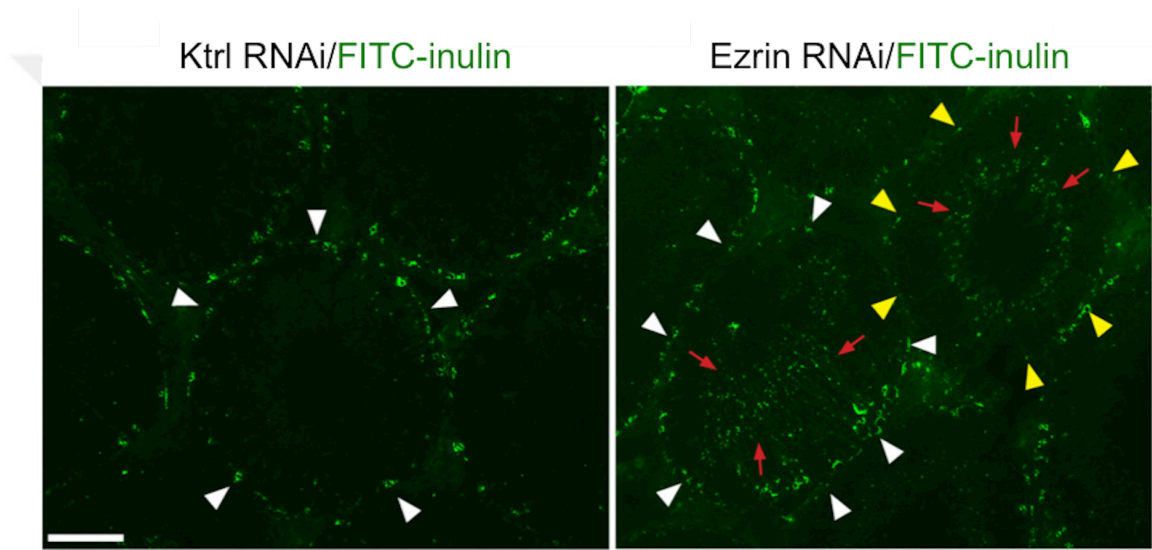
Şekil 4.15.1. Kan-testis bariyeri bazal EÖ'lerdeki protein yerleşimleri. F-aktin (kırmızı), Okludin (yeşil), ZO-1 (yeşil) ve N-kaderin (kırmızı) proteinlerinin flüoresan sinyalleri gösterilmiştir. N-kaderin yerleşiminin gösterildiği en alt paneldeki kesikli çizgiler bazal membranı göstermektedir. Uzun ve kısa braket ise N-kaderin yerleşiminin difüzyonunu işaret etmektedir. DAPI (mavi) çekirdek boyası olarak kullanılmıştır.

Flüoresan sinyallerin yoğunluğu Image-J analizleri ile grafik şeklinde düzenlendiğinde protein yerleşimlerinde anlamlı bir değişiklik olmadığı doğrulanmıştır (**Şekil 4.15.2./a**). N-kaderin yerleşimi Ktrl RNAi grubunda bazal EÖ alanda görülmesine rağmen, ezrin RNAi grubunda bazal membran yanında ve bazal EÖ bölgesinde yerleşmediği gözlenmiştir ve bu değişikliklerin KTB bütünlüğünün N-kaderin proteininin yerleşiminin bazal membrandan uzaklığı ölçülmüş mesafenin KTB bütünlüğü mevcut olan kontrole göre anlamlı olarak dağınık olduğu gösterilmiştir. (**Şekil 4.15.2./b**). Özetle, ezrin geninin testiste *in vivo* baskılanmasının bazal ektoplazma özelleşme proteinlerinin ve kan-testis bariyerinin bütünlüğünün bozulmasına neden olduğu ve ezrinin bu süreçte N-kaderin ile eş protein olarak birlikte çalıştığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.15.2. Şekil 4.15.1’de yer alan flüoresan sinyallerin yoğunluğunun grafiksel analizleri. Her bir veri, istatistiksel kontrol için 1’e ayarlanmıştır. Her bir sütun 3 deneyin ortalama±SS olarak düzenlenmiştir *, P < 0.01.

Bu bulgular ile birlikte KTB bütünlüğünün değerlendirilmesi, ezrin geni sessizleştirilen testislerde FITC-inulinin interstisiyel alandan apikal kompartmana geçmesinin engellenip engellenmediğine bağlı olarak kontrol ile karşılaştırmalı şekilde gerçekleştirilmiştir (**Şekil 4.15.3.**). Kontrol testislerde beyaz ok başları ile belirtilen KTB'nin bütünlüğünün bozulmadığı tübüllerde, FITC-inulin'in olması gerektiği yerde, yani interstisiyel alanda kalması sonucu doğrulamaktadır. Bununla birlikte Ezrin RNAi grubunda %30' a yakın tübülde FITC-inulin'in adlüminal kompartmana geçtiği kırmızı oklar ile gösterilmektedir. Bu veriler her bir grup için üç farklı sıçan kullanılarak elde edilmiştir.

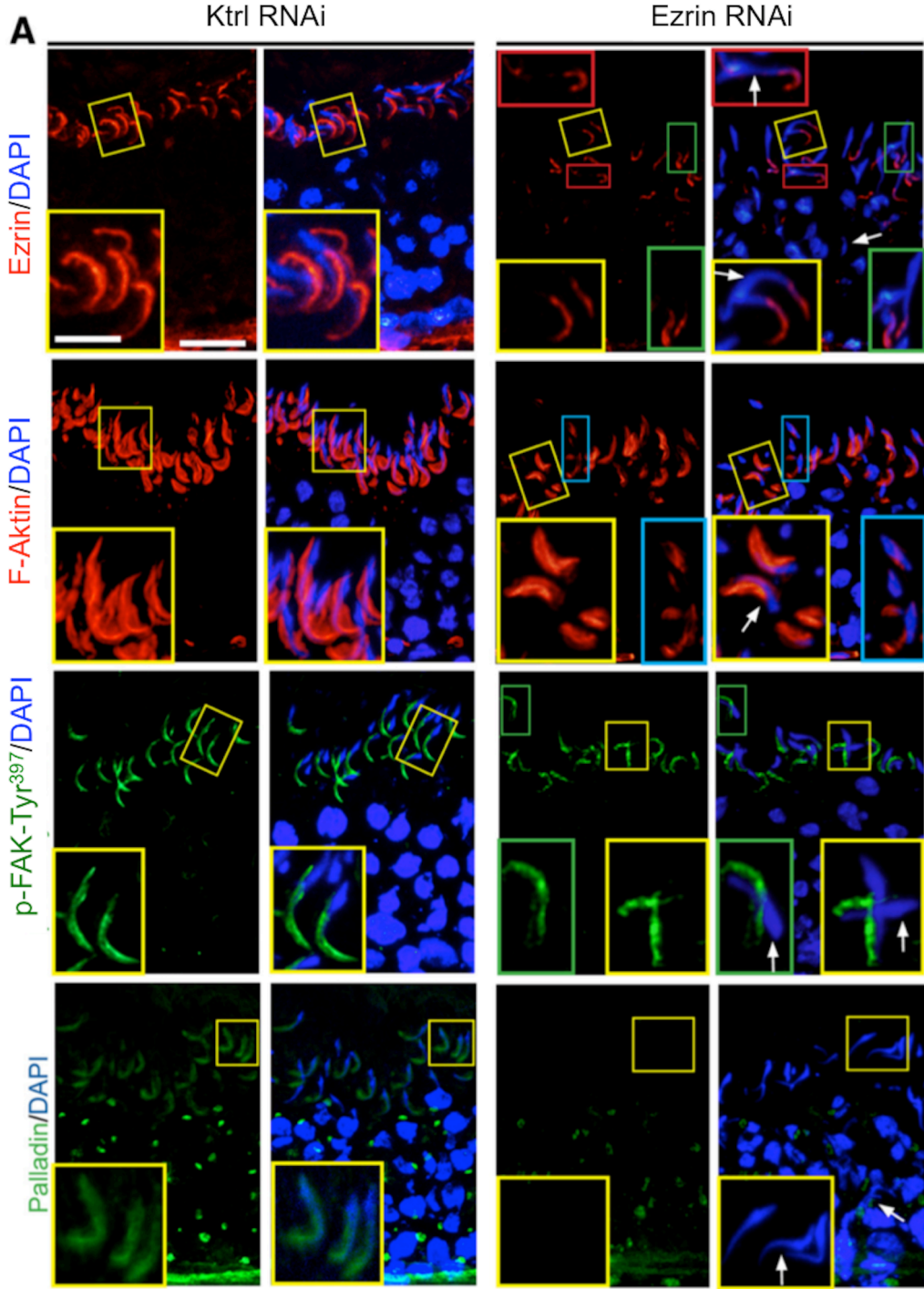


Şekil 4.15.3. İnterstisiyel aralığa FITC- inulin verilerek adlüminal kompartmandaki flüoresan işaretlerin dağılımı incelenerek kan-testis bariyeri bütünlüğünün değerlendirilmesi.

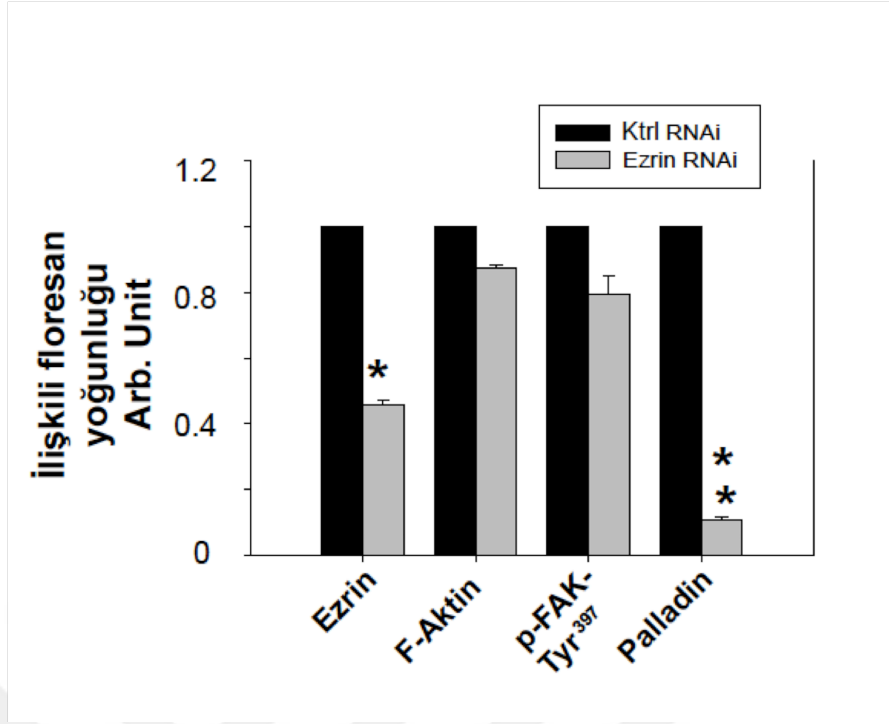
4.16. Ezrin geninin baskılanması ile apikal ektoplazma özelleşmelerindeki aktin bağlayıcı ve düzenleyici proteinlerin flüoresan bulguları

Ezrin geni testiste *in vivo* olarak baskılandığında evre VIII tübüllerde apikal EÖ'lerde ezrin yerleşiminin %60 oranında azaldığı gösterilmiştir (**Şekil 4.16.1**). Apikal EÖ'deki F-aktinin flüoresan yoğunluğu kontrolden farklı olarak tespit edilmemiştir. Dikkat çekici bir fark olarak apikal EÖ dağılımında yer alan düzenleyici proteinlerden FAK-Tyr³⁹⁷ ve aktin bağlayıcı protein olan palladin olmuştur. p-FAK-Tyr³⁹⁷ yerleşimi ezrin geni baskılandığında tamamen yok olmamıştır (**Şekil 4.16.2**) ancak lokalizasyonunda bozulmalar belirgin olarak tespit edilmiştir. Kontrol testislerde uzamış spermatidlerin konveks bölgesinde yer alan p-FAK-Tyr³⁹⁷ yerleşimi bu bölgeden uzaklaşmıştır. Bu spermatidlerin bazılarının polaritelerinin de kaybolduğu gözlemlenmiştir..

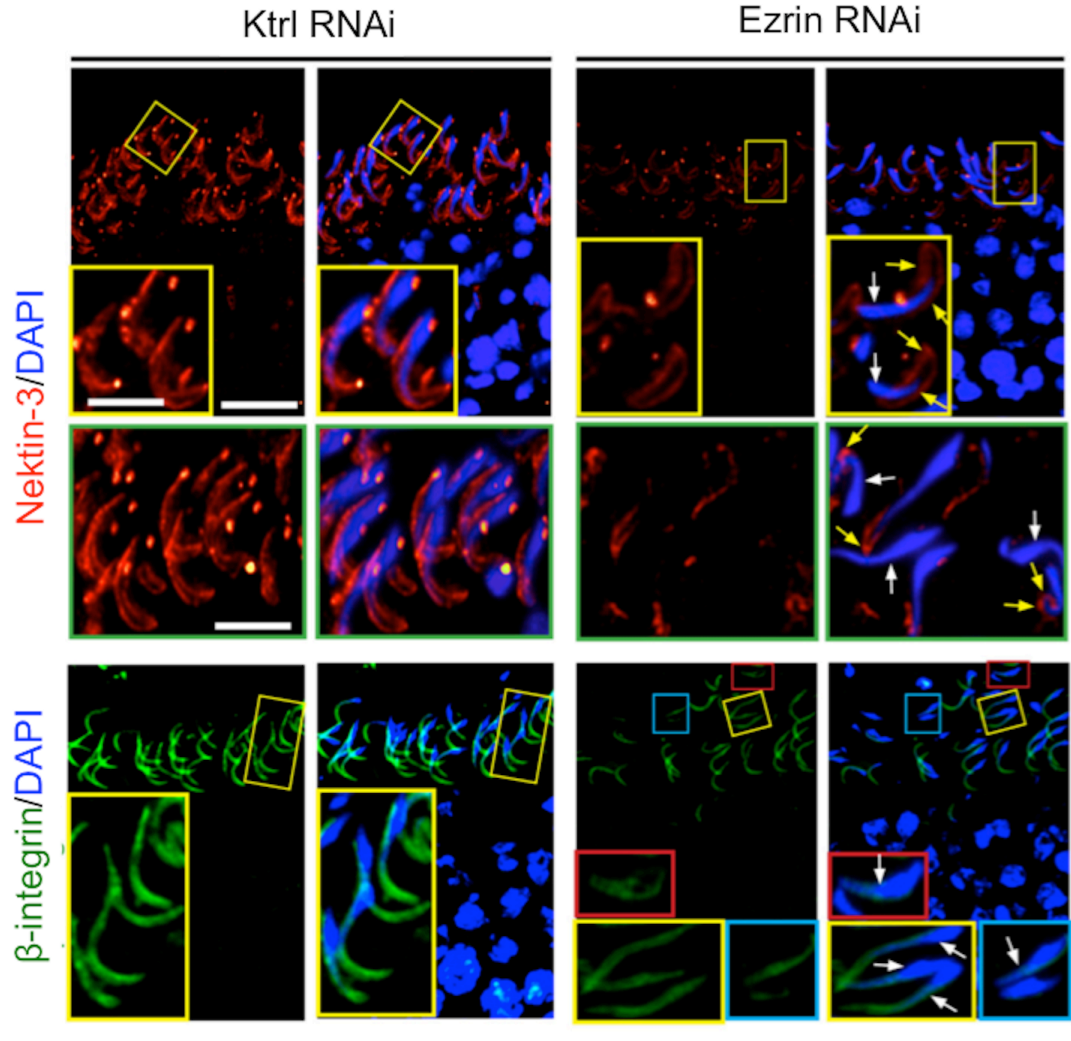
Aktin bağlayıcı protein olan palladin ve apikal adezyon proteinleri nektin-3 ve β 1 integrinin de yerleşimlerinde düşüş olduğu tespit edilmiştir (**Şekil 4.16.3**). Nektin-3'ün, apikal EÖ'de konveks bölgede yer almadığı ancak anormal polariteli spermatid başı çevresinde noktalar şeklinde sentezlendiği gözlemlenmiştir. Beta-1-integrin ise basamak 19 spermatidlerde, defektli polariteyle paralel olarak lokalizasyonunda bozulma olduğu gözlemlenmiştir.



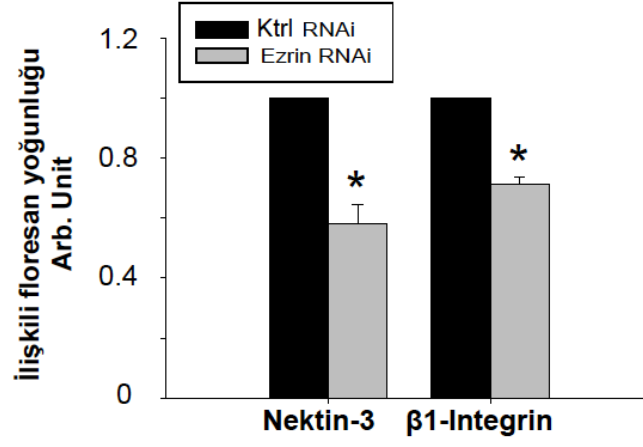
Şekil 4.16.1. Ezrin geninin baskılanması ile AEÖ'deki aktin bağlayıcı ve düzenleyici proteinlerin yerleşimlerindeki değişiklikler. Ezrin (kırmızı), F-Aktin (yeşil), p-FAK-Tyr397 (yeşil), Palladin (yeşil). DAPI (mavi) çekirdek boyası olarak kullanılmıştır. Skala bar: 50 μ m, büyütme alanları skala bar: 20 μ m. Ezrin RNAi gruba ait tübüllerde evre VIII'de spermatid polaritesinde bozulmalar (beyaz oklar) gösterilmiştir.



Şekil 4.16.2. Şekil 4.16.1’de ekspresyon paterni gösterilen proteinlerin flüoresan yoğunluğu ölçümleri. Her bir veri istatistiksel kontrol için 1’e ayarlanmıştır (Arb. Unit). Her bir sütun 3 deneyin ortalama±SS olarak düzenlenmiştir , * P < 0.01



Şekil 4.16.3. Ezrin geninin baskılanması ile AEÖ'deki apikal adezyon molekülleri proteinlerin yerleşimlerdeki değişiklikler. Nektin-3 (kırmızı), β 1-integrin (yeşil). DAPI (mavi) çekirdek boyası olarak kullanılmıştır. Skala bar: 50 μ m. Ezrin RNAi tübüllerde her iki proteinin de yerleşiminde azalma olduğu gösterilmiştir ve evre VIII'de özgü lümene yakın duruşun bozulduğu yani spermatid polaritesinde meydana gelen bozulmalar belirgin olarak kaydedilmiştir (beyaz oklar).



Şekil 4.16.4. Şekil 4.16.3’de ekspresyon paterni gösterilen proteinlerin flüoresan yoğunluğu ölçümleri. Her bir veri istatistiksel kontrol için 1’e ayarlanmıştır. Her bir sütun 3 deneyin ortalama±SS olarak düzenlenmiştir, * P < 0.01.

5. TARTIŞMA

5.1. Ezrin proteininin kan-testis bariyerindeki rolü

Ezrin, SB ve AB'daki hücre bağlayıcı kompleksler ile memeli epiteli apikal membranın mikrovilluslarında sentezlendiği bilinen, hücre korteksindeki mikrofilamanların organizasyon yapısını destekleyen bir aktin-bağlayıcı proteindir (Fehon ve ark. 2010, Neisch ve Fehon 2011, Adada ve ark. 2014, Viswanatha ve ark. 2014). Özellikle bağırsak epitelindeki yerleşimi özgün olan ezrin geni silinmiş fareler doğumda normal olmalarına rağmen, bağırsak çıkıntısındaki morfogenez ile ilgili bozukluklardan dolayı ve ince bağırsaktaki apikal membran proteinlerinin yapısal organizasyonlarındaki bozukluklardan dolayı doğumdan yaklaşık 21 gün sonra ölmektedirler (Saotome ve ark. 2004). Ezrinin bağlantı kompleksleri ile ilgili öneminin yanı sıra spermatogenezdeki rolü ilk defa bu doktora tezi ile ortaya konmuştur.

Testiste, ektoplazma özelleşmeler, F-aktin açısından zengin, testise-özgü AB'lardır. Ektoplazma özelleşme bütünlüğü, Sertoli hücresi plazma membranı ile endoplazmik retikulumun arasında yer alan aktin filaman gruplarına bağlıdır. Bu filamanlar; ise preleptoten spermatosit ve spermatid geçişini kolaylaştırmak için dallanmış veya dallanmamış şekilde aralıklı olarak yeniden organize olurlar ve ayrıca bu süreçte seminifer epitel döngüsünün VIII. evresindeki spermiyasyon sırasında da sperm salınması için AEÖ'ler de lokalizedirler (Cheng ve Mruk 2010, Cheng ve Mruk 2012). Bu nedenle, VIII. evre tübüllerinde AEÖ ve BEÖ'de görülen ezrin yerleşimi oldukça yoğundur. Ezrin baskılandığında, evre VIII tübüllerdeki basamak 19 spermatidlerin çoğu polaritelerini kaybetmişlerdir çünkü aktin filaman grupları, AEÖ'de uygun yapılarını daha fazla koruyamamışlardır.

Bu değişiklikler de EÖ'deki mikrofilamaların organizasyonu ile ilgili lokalizasyonu ve/veya oluşumu engellemiştir. Bu durum ise *in vitro* olarak ezrinin yokluğunun Sertoli hücrelerindeki aktin filaman yapısındaki değişiklikler yolu ile sıkı bağlantıları ve adherens bağlantıları bozmuş olduğuna dair bulgularla desteklenmiştir. Dahası *in vivo* olarak ezrinin olmayışı, Sertoli hücreleri arasında kurulan KTB'nin bütünlüğünü de bozmuştur ve *in vitro* gözlemlenen verilerin doğruluğunu desteklemiştir. Ayrıca ezrinin *in vivo* olarak baskılanması döngünün VIII. evresindeki spermatid geçişini de bozmuştur ve bu durum spermiyasyonda bozulmalara neden olmuştur. Bununla birlikte basamak 19 spermatidlerin evre VIII-IX tübüllerin epitelinin aralarında adeta hapis kaldığı gösterilmiştir. Ezrin baskılanması ile F-aktinin bozulması, döngünün evre IX aşamasında fagozomlara dönüşen kalan kısımlarının geçişini de engellemiştir çünkü fagositoz ile fagozomların geçişi aktin-bağımlı hücresele olaylardır (Clermont ve ark. 1987).

Ezrin yerleşimi bazal ektoplazma özelleşmeler ve kan-testis bariyerinde gözlenmiştir ve seminifer epitel döngünün tüm evrelerinde de sentezlenmektedir. Sadece evre IX'daki yerleşimi oldukça azalmıştır. Ezrin, AEÖ'de Sertoli hücreleri ile basamak 19 spermatidleri arasında evre VII'de kısıtlı şekilde varlığını gösterir fakat diğer aşamalarda durum böyle değildir. Bu bulgular da göstermektedir ki bu aşamadaki spermiyasyon diğer aşamalardan farklı olsa da ezrin spermatid geçişi ve spermiyasyonun son aşaması ile yakından ilgilidir. *İn vivo* ezrin geni sessizleştirme modeli ile elde ettiğimiz bulgular da bu durumu desteklemektedir.

Öncelikle basamak 19 spermatid geçişi ve spermatid polarizasyonu ile ilgili olarak testiste ezrinin baskılanması sonucu varılan nokta; spermatidlerin epitelin derinlerinde kaldığı ve polarizasyonda bozulmaların olduğu dolayısıyla AEÖ işlevinin bozulduğunu göstermektedir. İkinci olarak, kutuplaşmış aktin filamanlarına gereksinim duyan fagozom olarak bilinen fagosite olmuş sitoplazmik protein geçişi de bozulmuştur.

Örneğin bu organeller evre IX tübüllerin bazal bölümüne yakın bir yerde bulunması gerekirken (Morales *ve ark.* 1986, Clermont *ve ark.* 1987) ezrin geni sessizleştirildiğinde tübül lümenin yanında bulunmuşlardır ve bu da F-aktin mikrofilamanlarının yapısının bozulduğunu göstermektedir. AEÖ'deki F-aktin filaman demetlerinin bozulduğu, aktin bağlayıcı protein palladinin az sentezlendiği ile ilgili bulgularla da desteklenmiştir. Ayrıca, BEÖ'de aktin filaman demetlerinin bozulmasının ezrin baskılanan testiste de gözlenmesi, BEÖ proteini N-kaderinin KTB'ye sıkıca yerleşmesinin mümkün olamaması ile ilişkilidir. Bulgularımız ezrinin evre IX'da ve evre VIII'de AEÖ'de fare testisinde atık sitoplazmalar ve fagozomlar üzerinde yerleştiğini gösteren önceki bir rapor ile de tutarlılık göstermektedir (Wakayama *ve ark.* 2009). Buna göre, ezrin Sertoli hücrelerindeki aktin bazlı hücre iskelet işlevinde kritik bir rol üstlenmektedir ve ayrıca BEÖ ve AEÖ'nin ortak yapısal özellikleri bulunmaktadır. Bunların işlevleri ezrin tarafından farklı şekilde düzenlenmektedir. Evre VIII tübüllerdeki AEÖ'de bulunan ezrinin artması ve zamansal-mekansal ifade edilmesi, adlüminal bölümdeki spermatid geçişinin fagozom geçişi ile de ilişkili olduğunu göstermektedir. Bu bulgu beklenmedik birşey değildir çünkü yabancı maddelerin fagositozları ki, buna bakteriler, hücresel debris, makrofajların kalan kısımları dahildir, Sertoli hücrelerindeki aktin temelli hücre iskelet bağımlı aktivitelerdir (Clermont *ve ark.* 1987, Rougerie *ve ark.* 2013). Tunika propriyadaki peritübüler miyoid hücrelerin ezrin sentezlemeleri de ayrıca ilginçtir. Mayoz bölünme aşamasındaki hücre tabakasının kemirgenlerde seminifer epitel bariyer işlevini sağladığı bilinmektedir (Dym ve Fawcett 1970, Fawcett *ve ark.* 1970). Dolayısıyla, ezrin baskılanmasından sonraki Sertoli hücresi bariyer işlevi üzerinde bulunan etkiler mayoz hücre işlevindeki kayıptan kaynaklanıyor olabilir. Bu olasılığın daha sonraki çalışmalarda dikkatlice değerlendirilmesi gerekmektedir. Özet olarak, ezrin KTB'deki BEÖ gibi, EÖ'deki aktin mikrofilamanlarının organizasyonu ile de ilişkilidir. Diğer taraftan AEÖ'deki işlevi seminifer epitel döngünün VIII. evresi ile sınırlıdır ve spermatid geçişi, kutuplaşma, spermiyasyon ve de kalan kısımların/fagozomların geçişi ile sıkı biçimde ilişkilidir.

Ezrin yerleşimi ilk olarak flüoresan mikroskopi yöntemiyle fare testislerinde

gösterilmiştir (Wakayama *ve ark.* 2009). Sertoli hücrelerinin olgunlaşması ile bağlantılı olarak aktin mikrofilamanlarının Sertoli ve germ hücreleri arasındaki yerleşimi ile spermiyogenez ve sperm salınımı gerçekleşmektedir (Mruk ve Cheng 2011). Seminifer tübül epitel döngü sırasında fare testisinde Sertoli hücrelerinin basamak 16 spermatidlerde yerleşimi oldukça yoğundur ve ezrin epitelyal döngünün evre VIII'de kalan kısımların yapılarında da ortaya çıkmaktadır (Wakayama *ve ark.* 2009). İnsanlarda, ezrinin spermatozoa kapasitasyonu ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir ve ezrin büyük ihtimalle bunu aktin bazlı hücre iskeleti ve gerekli proteinlerin oluşmasındaki rolü ile sağlamaktadır (Wang *ve ark.* 2010). Çalışmamızda, ezrinin sıçan testisinde bir aktin bağlayıcı protein olduğunu gösterdik ve bu da ezrinin fare testislerinde mikrofilamalara bağlandığını gösteren önceki bir immunopresipitasyon deneyleri ile tutarlılık göstermektedir (Wakayama *ve ark.* 2009).

Sertoli hücrelerinde aktin ile etkileşime girmesinden ayrı olarak ezrin, Arp3'e de bağlanır ve bu da Arp2 ile birlikte Arp2/3 kompleksini oluşturur ve nöronal Wiskott–Aldrich Sendrom proteini (N-WASP) ile aktive olduğunda, Arp2/3/NWASP kompleksinin çekirdekleşmeye neden olduğu bilinmektedir ve bu şekilde dallanmış aktin polimerizasyonuna neden olmaktadır (Cheng ve Mruk 2009, Rotty *ve ark.* 2013). Böylece aktin mikrofilamanlarını “kümelenmiş” yapıdan “kümelenmiş/dallanmış” yapıya dönüştürür. Bu bulgular önemlidir çünkü ezrinin aktin bağlayıcı protein olmasının yanında, epitelyal döngü sırasında aktin mikrofilaman yapısıyla ilişkili olabileceğini göstermektedir ve bunu da testislerde EÖ'ye plastisite sağlamak, epitelyal döngünün evre VIII aşamasında KTB üzerinden preleptoten spermatositlerinin geçişini kolaylaştırmak için ve de epitelyal döngü sırasında seminifer epitelinin adlüminal kompartmanı üzerinden uzamış spermatidlerin geçişini de kolaylaştırmak için sağlamaktadır. Bu sayede basamak 19 spermatidler döngünün evre VIII aşamasında spermiyasyona hazırlanmak için tübül lümeninin yakınında dizilebileceklerdir (**Şekil 5.1**). Tüm bu bilgiler doğrultusunda çalışmamız, ezrinin evre VIII'de spermiyasyon için gerekli bir KTB bileşeni olduğunu kanıtlamıştır.

Ezrinin %90 düzeyinde baskılanması ile Sertoli hücrelerindeki F-aktin yapısının

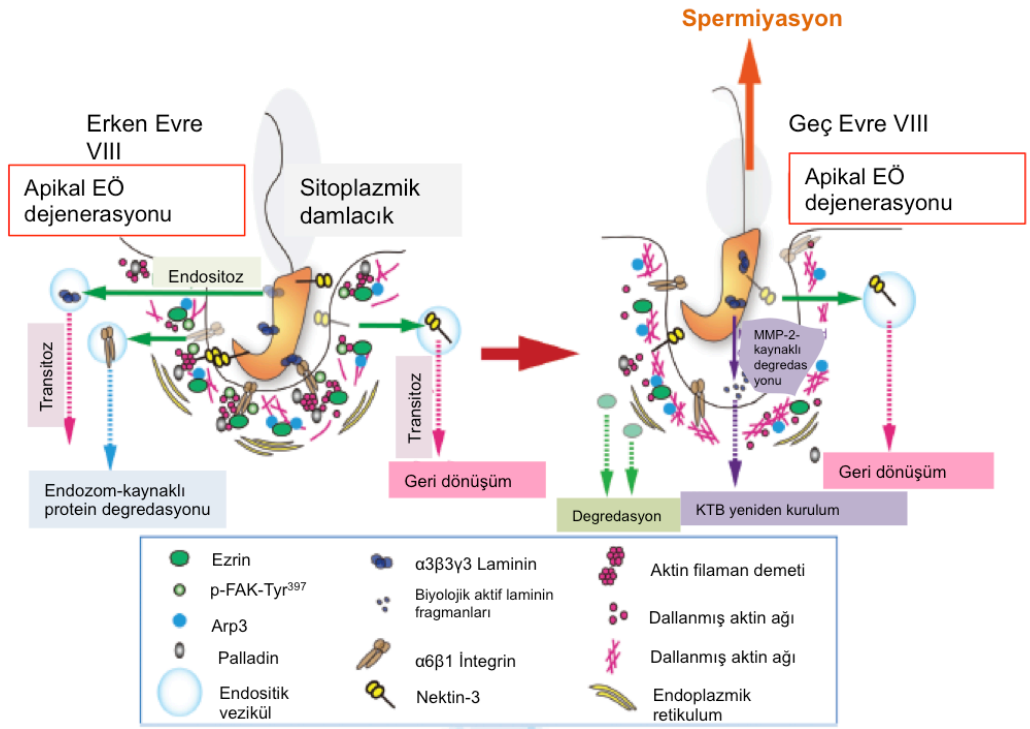
bozulduğunu gösterdik. Sertoli hücrelerindeki aktin mikrofilamalarının düzensiz dağılım gösterdiğini ve şekilde bozulmalar olduğunu gözlemledik ki bunun palladinin yanlış yerleşimi ve yerleşiminin azalması ile ilgili olduğunu ispatladık. Sertoli hücresi arayüzündeki bağlantı proteinleri KTB bütünlüğündeki yerleşimlerini kaybettiklerinden Sertoli hücresi bariyer işlevinin bozulduğunu gösterdik.

Yukarıda özetlenen ve Sertoli hücresi *in vitro* KTB modeli kullanılarak ortaya konulan değişiklikleri ezrinin baskılandığı *in vivo* deneylerle de gösterdiğimizde testiste ezrinin baskılanmasının epitelyal döngünün seminifer epitelinde spermatidlerin ve fagozom içeren yapıların geçişinin bozulduğunu ortaya koyduk. Basamak 19 spermatidleri, evre VIII ve IX tübüllerde epitelin bazal membranı yakınında gördük. Hatta fagozomlarda evre IX tübüllerde tübül lümeninin adlüminal kenarında izledik. Oysa ki, lizozomal indirgenme yolu ile epitelin altına geçmiş olmaları gerekmektedir. Bu oluşumlar testisteki ezrinin baskılanması sonrası hücre iskeletinin bozulmasına yol açmışlardır. Ayrıca ezrinin baskılanmasının ve yıkıma uğramasının KTB'nin bütünlüğünün de bozduğunu gösterdik ve bu da ezrinin sadece ektoplazma özelleşmelerin yapısal bir bileşeni olmaktan ibaret olmadığını, hatta aktin dinamiklerinin de önemli bir düzenleyicisi olduğunu gösterdik. Eğer ezrin sadece KTB'de bağlayıcı olma özelliği sergileyecek olsa, beta-katenin, ZO gibi diğer bağlantı proteinleri ezrinin yokluğundan doğacak kayıpları telafi edebileceklerdi. Bu noktada, bulgularımız ışığında, ezrinin aktin zengini ektoplazma özelleşmelerinde gerekli sinyalleşme işlevlerinin yerine getirilmesi için diğer uyarlayıcı/sinyal sağlayıcı proteinlerle birlikte hareket ettiğini düşünmekteyiz. Bunlara iyi bir örnek olan FAK ile aktive olmuş olan izoformlarıdır (Lie ve ark. 2012, Wan ve ark. 2014).

Bu çalışma ile ezrinin spermatogenez sırasında ektoplazma özelleşmede aktin dinamiklerini hangi moleküler mekanizmalar ile düzenlediği konusu açıklığa kavuşturulmuştur. Ezrinin dallanmış aktin polimerizasyon proteini Arp2/3 ile aktin bağlayıcı protein palladin ile ve AEÖ düzenleyici protein p-FAK-Tyr ile EÖ'deki aktin mikrofilamanlarının organizasyonunu oluşturmak için birlikte hareket ettiği gösterilmiştir. Özellikle de “kümelenmiş” olanlardan “kümelenmemiş/dallanmış” olanlara dönüşüm ile ilgili olarak Sertoli spermatid arayüzündeki AEÖ bunlar içinde önemlidir (Beardsley ve O'Donnell 2003, Siu ve ark. 2003).

Bulgularımızın ışığında yukarıda bahsedilen hipotezimiz ve bulgularımız sonucunda

elde ettiğimiz bilgileri özetleyen şematize şekil **Şekil 5.1**'de gösterilmiştir. Apikal ektoplazma özelleşmedeki aktin mikrofilamanlarının organizasyon yapısındaki değişiklikler ayrıca endositotik vezikül aracılı protein aktivitelerinin kolaylaştırılmasını sağlar. Bunlara örnek olarak; endositoz, transitoz, spermatidlerin, organellerin (fagozomlar) ve epitel döngü sırasında biyolojik maddelerin (laminin zincirlerinin biyolojik olarak aktif filamanları) geçişini kolaylaştıracak döngüler verilebilir (**Şekil 5.1**). Örneğin evre VIII'de başlarında AEÖ'nin dejenerasyonundan elde edilen "eski" AEÖ proteinleri, basamak 8 spermatidleri epitelyal döngüde görüldüğünde "yeni" AEÖ oluşturmak için kullanılabilir. Zaman içerisinde daha fazla veri elde edildikçe bu model gözden geçirilerek yeniden düzenlenebilecektir.



Şekil 5.1. Ezrinin, sıçan kan-testis bariyerini oluşturan apikal ektoplazma özelleşmelerindeki rolünün şematik çizimi

Kanser araştırmalarında hücre iskeletinde aktin kaynaklı hücre hareketliliğini, hücre

göçünü, tümör büyümesini ve invazyonunda görev alan ezrin proteininin (Ohtani *ve ark.* 1999, Martin *ve ark.* 2003, Li *ve ark.* 2008) KTB gibi açılıp kapanma mekanizmasına sahip ve geri dönüşümlü bağlantı komplekslerini içeren hücreler arası etkileşimindeki rollerinin araştırılması ve eş proteinlerinin saptanması ile, literatürdeki sitoplazmik sinyal moleküllerinin anlaşılmasına katkı sağlamaktadır. Ayrıca, puberte ile başlayan spermatogenez sürecinin normal devam etmesi ve Sertoli hücrelerinin seminifer epitel döngüsündeki sinyal mekanizmalarının bu süreçte KTB dinamiğine uygun şekilde gerçekleşmesi için ezrin proteininin seminifer epitel döngü boyunca lokalizasyonun, birlikte çalıştığı proteinlerin ve işlevin anlaşılması bu tez ile aydınlatılmıştır.



SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu tez ile RNAi teknolojisi kullanılarak gerek *in vitro* gerekse *in vivo* değerlendirmeler yapılarak ezrinin mekanik işlevi hakkında yeni bilgiler ilk kez ortaya konmuştur. Diğer yandan, ezrinin rolünün anlaşılabilmesi için ve özellikle spermatogenez sırasında kan-testis bariyerinde ektoplazma özelleşmelerinde aktin mikofilamanlarını düzenlendiğini anlayabilmek için, diğer aktin düzenleyici proteinlerle ne şekilde etkileşime girdiği hususunda daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Aşağıdaki sorular özellikle bu tezdeki bulguların devamında sorulabilir:

- 1- Ezrin, p-FAK-Tyr için bir yapı taşı oluşturup ezrin p-FAK^{Tyr397}'nin AEÖ dinamiklerini düzenlemek için önemli bir sinyalleşme işlevi oluşturmasında rol oynamakta mıdır?
- 2- Ezrinin, c-Src ile bağlantısı bilindiğinden, ezrin EÖ dinamiklerini düzenlemek için ikili sinyal yapısı oluşturacak şekilde c-Src'nin p-FAKTyr³⁹⁷ ile etkileşime girmesinde bir merkez koordinatör role sahip midir?
- 3- Ayrıca, ezrinin testislerde Arp3 ile de ilişkili olduğu bu çalışma gösterildiğinden pFAKTyr ve/veya cSrc Arp2/3NWASP kompleksi ya da palladinin aktivitesini düzenlemede rol alıyorlar olabilir mi?
- 4- Kan-testis bariyerinin bozulduğu, germ hücre kaybının bulunduğu ve infertilitenin meydana geldiği olgularda, ezrin yerleşiminin arttırılması ile kan-testis bariyerinin bütünlüğü aktin filamanları üzerindeki düzenleyici etkisi ile yeniden kazanılabilir ve spermatogenez süreci yeniden düzenlenebilir mi?
- 5- Günümüzde, araştırmacılar tarafından oldukça yoğun çalışılan bir konu olan erkek kontrasepsiyonunda, spermatogenezin geri dönüşümlü olarak kontrol edilebilir hala gelmesi gerekliliğine esasen, ezrin proteininin ve birlikte çalıştığı eş proteinlerin baskılanması ile ilişkili ezrinin bir rolü olabilir mi?

Yukarıda belirttiğimiz ezrin geninin kan-testis bariyerinin düzenlenmesindeki etkilerinin esas öneminin yanı sıra, diğer kan-doku bariyerlerinin de düzenlenmesinin anlaşılması için yeni araştırma konularına ışık tutacak ve bu bariyerlerde kullanılabilir ilaç taşıyıcılarının geliştirilmesi için tasarlanacak gelecek çalışmalara kaynak oluşturmaktadır.



KAYNAKLAR

- Abou-Donia, M. B., L. B. Goldstein, A. Dechovskaia, S. Bullman, K. H. Jones, E. A. Herrick, A. A. Abdel-Rahman and W. A. Khan** (2001). "Effects of daily dermal application of DEET and epermethrin, alone and in combination, on sensorimotor performance, blood-brain barrier, and blood-testis barrier in rats." *J Toxicol Environ Health A* **62**(7): 523-541.
- Adada, M., D. Canals, Y. A. Hannun and L. M. Obeid** (2014). "Sphingolipid regulation of ezrin, radixin, and moesin proteins family: implications for cell dynamics." *Biochim Biophys Acta* **1841**(5): 727-737.
- Alderliesten, M., M. de Graauw, J. Oldenampsen, Y. Qin, C. Pont, L. van Buren and B. van de Water** (2007). "Extracellular signal-regulated kinase activation during renal ischemialreperfusion mediates focal adhesion dissolution and renal injury." *Am J Pathol* **171**(2): 452-462.
- Amann, R. P.** (2008). "The cycle of the seminiferous epithelium in humans: a need to revisit?" *J Androl* **29**(5): 469-487.
- Amlani, S. and A. W. Vogl** (1988). "Changes in the distribution of microtubules and intermediate filaments in mammalian Sertoli cells during spermatogenesis." *Anat Rec* **220**(2): 143-160.
- Ammoun, S., L. Provenzano, L. Zhou, M. Barczyk, K. Evans, D. A. Hilton, S. Hafizi and C. O. Hanemann** (2014). "Axl/Gas6/NFkappaB signalling in schwannoma pathological proliferation, adhesion and survival." *Oncogene* **33**(3): 336-346.
- Andre, E. and M. Becker-Andre** (1993). "Expression of an N-terminally truncated form of human focal adhesion kinase in brain." *Biochem Biophys Res Commun* **190**(1): 140-147.
- Arpin, M., D. Chirivino, A. Naba and I. Zwaenepoel** (2011). "Emerging role for ERM proteins in cell adhesion and migration." *Cell Adh Migr* **5**(2): 199-206.
- Basuroy, S., M. Dunagan, P. Sheth, A. Seth and R. K. Rao** (2010). "Hydrogen peroxide activates focal adhesion kinase and c-Src by a phosphatidylinositol 3 kinase-dependent mechanism and promotes cell migration in Caco-2 cell monolayers." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **299**(1): G186-195.
- Beardsley, A. and L. O'Donnell** (2003). "Characterization of normal spermiation and spermiation failure induced by hormone suppression in adult rats." *Biol Reprod* **68**(4): 1299-1307.
- Bergmann, M.** (1987). "Photoperiod and testicular function in *Phodopus sungorus*." *Adv Anat Embryol Cell Biol* **105**: 1-76.
- Bergmann, M. and R. Dierichs** (1983). "Postnatal formation of the blood-testis barrier in the rat with special reference to the initiation of meiosis." *Anat Embryol (Berl)* **168**(2): 269-275.
- Berryman, M., Z. Franck and A. Bretscher** (1993). "Ezrin is concentrated in the apical microvilli of a wide variety of epithelial cells whereas moesin is found primarily in endothelial cells." *J Cell Sci* **105 (Pt 4)**: 1025-1043.
- Bolos, V., J. M. Gasent, S. Lopez-Tarruella and E. Grande** (2010). "The dual kinase complex FAK-Src as a promising therapeutic target in cancer." *Onco Targets Ther* **3**: 83-97.
- Bos, J. L.** (2005). "Linking Rap to cell adhesion." *Curr Opin Cell Biol* **17**(2): 123-128.

- Bretscher, A., D. Chambers, R. Nguyen and D. Reczek** (2000). "*ERM-Merlin and EBP50 protein families in plasma membrane organization and function.*" *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**: 113-143.
- Bretscher, A., K. Edwards and R. G. Fehon** (2002). "*ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex.*" *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(8): 586-599.
- Chapman, N. M., S. F. Connolly, E. L. Reinl and J. C. Houtman** (2013). "*Focal adhesion kinase negatively regulates Lck function downstream of the T cell antigen receptor.*" *J Immunol* **191**(12): 6208-6221.
- Cheng, C. Y.** (2008). *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis.*
- Cheng, C. Y. and D. D. Mruk** (2009). "*Regulation of blood-testis barrier dynamics by focal adhesion kinase (FAK): an unexpected turn of events.*" *Cell Cycle* **8**(21): 3493-3499.
- Cheng, C. Y. and D. D. Mruk** (2010). "*A local autocrine axis in the testes that regulates spermatogenesis.*" *Nat Rev Endocrinol* **6**(7): 380-395.
- Cheng, C. Y. and D. D. Mruk** (2011). "*Actin binding proteins and spermiogenesis: Some unexpected findings.*" *Spermatogenesis* **1**(2): 99-104.
- Cheng, C. Y. and D. D. Mruk** (2011). "*Regulation of spermiogenesis, spermiation and blood-testis barrier dynamics: novel insights from studies on Eps8 and Arp3.*" *Biochem J* **435**(3): 553-562.
- Cheng, C. Y. and D. D. Mruk** (2012). "*The blood-testis barrier and its implications for male contraception.*" *Pharmacol Rev* **64**(1): 16-64.
- Chiquoine, D.** (1964). "*Observations on the early events of cadmium necrosis of the testis.*" *Anat Rec* **149**: 23-36.
- Christensen, A. K. and D. W. Fawcett** (1966). "*The fine structure of testicular interstitial cells in mice.*" *Am J Anat* **118**(2): 551-571.
- Chung, N. P. and C. Y. Cheng** (2001). "*Is cadmium chloride-induced inter-sertoli tight junction permeability barrier disruption a suitable in vitro model to study the events of junction disassembly during spermatogenesis in the rat testis?*" *Endocrinology* **142**(5): 1878-1888.
- Claesson-Welsh, L. and M. Welsh** (2013). "*VEGFA and tumour angiogenesis.*" *J Intern Med* **273**(2): 114-127.
- Clermont, Y. and S. C. Harvey** (1965). "*Duration of the Cycle of the Seminiferous Epithelium of Normal, Hypophysectomized and Hypophysectomized-Hormone Treated Albino Rats.*" *Endocrinology* **76**: 80-89.
- Clermont, Y., C. Morales and L. Hermo** (1987). "*Endocytic activities of Sertoli cells in the rat.*" *Ann N Y Acad Sci* **513**: 1-15.
- Coulombe, P. A. and P. Wong** (2004). "*Cytoplasmic intermediate filaments revealed as dynamic and multipurpose scaffolds.*" *Nat Cell Biol* **6**(8): 699-706.
- DeMali, K. A. and K. Burridge** (2003). "*Coupling membrane protrusion and cell adhesion.*" *J Cell Sci* **116**(Pt 12): 2389-2397.
- Dym, M. and D. W. Fawcett** (1970). "*The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium.*" *Biol Reprod* **3**(3): 308-326.
- Elliott, B. E., H. Qiao, D. Louvard and M. Arpin** (2004). "*Co-operative effect of c-Src and ezrin in deregulation of cell-cell contacts and scattering of mammary carcinoma cells.*" *J Cell Biochem* **92**(1): 16-28.
- Eng, F., J. P. Wiebe and L. H. Alima** (1994). "*Long-term alterations in the permeability of the blood-testis barrier following a single intratesticular injection of dilute aqueous glycerol.*" *J Androl* **15**(4): 311-317.

- Fawcett, D. M.** (1975). "*Ultrastructure and function of Sertoli cells.*" American Physiological Society **5**: 21-55.
- Fawcett, D. W., L. V. Leak and P. M. Heidger, Jr.** (1970). "*Electron microscopic observations on the structural components of the blood-testis barrier.*" J Reprod Fertil Suppl **10**: 105-122.
- Fehon, R. G., A. I. McClatchey and A. Bretscher** (2010). "*Organizing the cell cortex: the role of ERM proteins.*" Nat Rev Mol Cell Biol **11**(4): 276-287.
- Fiedorek, F. T., Jr. and E. S. Kay** (1995). "*Mapping of the focal adhesion kinase (Fadk) gene to mouse chromosome 15 and human chromosome 8.*" Mamm Genome **6**(2): 123-126.
- Franke, W. W., E. Schmid, M. Osborn and K. Weber** (1979). "*Intermediate-sized filaments of human endothelial cells.*" J Cell Biol **81**(3): 570-580.
- Fuchs, E. and D. W. Cleveland** (1998). "*A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease.*" Science **279**(5350): 514-519.
- Fudge, D. S., K. H. Gardner, V. T. Forsyth, C. Riekkel and J. M. Gosline** (2003). "*The mechanical properties of hydrated intermediate filaments: insights from hagfish slime threads.*" Biophys J **85**(3): 2015-2027.
- Gilula, N. B., D. W. Fawcett and A. Aoki** (1976). "*The Sertoli cell occluding junctions and gap junctions in mature and developing mammalian testis.*" Dev Biol **50**(1): 142-168.
- Gliki, G., K. Ebnet, M. Aurrand-Lions, B. A. Imhof and R. H. Adams** (2004). "*Spermatid differentiation requires the assembly of a cell polarity complex downstream of junctional adhesion molecule-C.*" Nature **431**(7006): 320-324.
- Gungor-Ordueri, N. E., C. Celik-Ozenci and C. Y. Cheng** (2015). "*Ezrin: a regulator of actin microfilaments in cell junctions of the rat testis.*" Asian J Androl **17**(4): 653-658.
- Gungor-Ordueri, N. E., D. D. Mruk, H. T. Wan, E. W. Wong, C. Celik-Ozenci, P. P. Lie and C. Y. Cheng** (2014). "*New insights into FAK function and regulation during spermatogenesis.*" Histol Histopathol **29**(8): 977-989.
- Guttman, J. A., D. J. Mulholland and A. W. Vogl** (1999). "*Plectin is concentrated at intercellular junctions and at the nuclear surface in morphologically differentiated rat Sertoli cells.*" Anat Rec **254**(3): 418-428.
- Hall, E. S., J. Eveleth and K. Boekelheide** (1991). "*2,5-Hexanedione exposure alters the rat Sertoli cell cytoskeleton. II. Intermediate filaments and actin.*" Toxicol Appl Pharmacol **111**(3): 443-453.
- Hall, J. E., W. Fu and M. D. Schaller** (2011). "*Focal adhesion kinase: exploring Fak structure to gain insight into function.*" Int Rev Cell Mol Biol **288**: 185-225.
- Hess, R. A. and L. Renato de Franca** (2008). "*Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium.*" Adv Exp Med Biol **636**: 1-15.
- Hew, K. W., G. L. Heath, A. H. Jiwa and M. J. Welsh** (1993). "*Cadmium in vivo causes disruption of tight junction-associated microfilaments in rat Sertoli cells.*" Biol Reprod **49**(4): 840-849.
- Hinton, B. T., R. W. White and B. P. Setchell** (1980). "*Concentrations of myo-inositol in the luminal fluid of the mammalian testis and epididymis.*" J Reprod Fertil **58**(2): 395-399.
- Janecki, A., A. Jakubowiak and A. Steinberger** (1991). "*Effects of cyclic AMP and phorbol ester on transepithelial electrical resistance of Sertoli cell monolayers in two-compartment culture.*" Mol Cell Endocrinol **82**(1): 61-69.

- Janecki, A., A. Jakubowiak and A. Steinberger** (1991). "Regulation of transepithelial electrical resistance in two-compartment Sertoli cell cultures: in vitro model of the blood-testis barrier." *Endocrinology* **129**(3): 1489-1496.
- Johnson, L., C. S. Petty and W. B. Neaves** (1980). "A comparative study of daily sperm production and testicular composition in humans and rats." *Biol Reprod* **22**(5): 1233-1243.
- Johnson, M. H.** (1969). "The effect of cadmium chloride on the blood-testis barrier of the guinea-pig." *J Reprod Fertil* **19**(3): 551-553.
- Jones, K. H., A. M. Dechkovskaia, E. A. Herrick, A. A. Abdel-Rahman, W. A. Khan and M. B. Abou-Donia** (2000). "Subchronic effects following a single sarin exposure on blood-brain and blood-testes barrier permeability, acetylcholinesterase, and acetylcholine receptors in the central nervous system of rat: a dose-response study." *J Toxicol Environ Health A* **61**(8): 695-707.
- Junqueira LC, C. J.** (2006). *Temel Histoloji*. İstanbul Nobel Tıp Kitabevi.
- Kemphues, K. J., J. R. Priess, D. G. Morton and N. S. Cheng** (1988). "Identification of genes required for cytoplasmic localization in early *C. elegans* embryos." *Cell* **52**(3): 311-320.
- King, L. M., W. A. Banks and W. J. George** (1999). "Differences in cadmium transport to the testis, epididymis, and brain in cadmium-sensitive and -resistant murine strains 129/J and A/J." *J Pharmacol Exp Ther* **289**(2): 825-830.
- Korman, M.** (1967). "Dye permeability and alkaline phosphatase activity of testicular capillaries in the postnatal rat." *Histochemie* **9**(4): 327-338.
- Kovar, D. R.** (2006). "Molecular details of formin-mediated actin assembly." *Curr Opin Cell Biol* **18**(1): 11-17.
- Le, T. L., S. R. Joseph, A. S. Yap and J. L. Stow** (2002). "Protein kinase C regulates endocytosis and recycling of E-cadherin." *Am J Physiol Cell Physiol* **283**(2): C489-499.
- Leblond, C. P. and Y. Clermont** (1952). "Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat." *Ann N Y Acad Sci* **55**(4): 548-573.
- Lechertier, T. and K. Hodivala-Dilke** (2012). "Focal adhesion kinase and tumour angiogenesis." *J Pathol* **226**(2): 404-412.
- Lee, I. P. and R. L. Dixon** (1973). "Effects of cadmium on spermatogenesis studied by velocity sedimentation cell separation and serial mating." *J Pharmacol Exp Ther* **187**(3): 641-652.
- Lee, N. P. and C. Y. Cheng** (2004). "Ectoplasmic specialization, a testis-specific cell-cell actin-based adherens junction type: is this a potential target for male contraceptive development?" *Hum Reprod Update* **10**(4): 349-369.
- Lee, N. P. and C. Y. Cheng** (2005). "Protein kinases and adherens junction dynamics in the seminiferous epithelium of the rat testis." *J Cell Physiol* **202**(2): 344-360.
- Lee, N. P., D. Mruk, W. M. Lee and C. Y. Cheng** (2003). "Is the cadherin/catenin complex a functional unit of cell-cell actin-based adherens junctions in the rat testis?" *Biol Reprod* **68**(2): 489-508.
- Li, M. W., W. Xia, D. D. Mruk, C. Q. Wang, H. H. Yan, M. K. Siu, W. Y. Lui, W. M. Lee and C. Y. Cheng** (2006). "Tumor necrosis factor {alpha} reversibly disrupts the blood-testis barrier and impairs Sertoli-germ cell adhesion in the seminiferous epithelium of adult rat testes." *J Endocrinol* **190**(2): 313-329.
- Li, Q., M. Wu, H. Wang, G. Xu, T. Zhu, Y. Zhang, P. Liu, A. Song, C. Gang, Z. Han, J. Zhou, L. Meng, Y. Lu, S. Wang and D. Ma** (2008). "Ezrin silencing by

small hairpin RNA reverses metastatic behaviors of human breast cancer cells." *Cancer Lett* **261**(1): 55-63.

Lie, P. P., C. Y. Cheng and D. D. Mruk (2010). "*Crosstalk between desmoglein-2/desmocollin-2/Src kinase and coxsackie and adenovirus receptor/ZO-1 protein complexes, regulates blood-testis barrier dynamics.*" *Int J Biochem Cell Biol* **42**(6): 975-986.

Lie, P. P., D. D. Mruk, K. W. Mok, L. Su, W. M. Lee and C. Y. Cheng (2012). "*Focal adhesion kinase-Tyr407 and -Tyr397 exhibit antagonistic effects on blood-testis barrier dynamics in the rat.*" *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(31): 12562-12567.

Lim, S. T., N. L. Miller, X. L. Chen, I. Tancioni, C. T. Walsh, C. Lawson, S. Uryu, S. M. Weis, D. A. Cheresch and D. D. Schlaepfer (2012). "*Nuclear-localized focal adhesion kinase regulates inflammatory VCAM-1 expression.*" *J Cell Biol* **197**(7): 907-919.

Lui, W. Y. and W. M. Lee (2005). "*cAMP perturbs inter-Sertoli tight junction permeability barrier in vitro via its effect on proteasome-sensitive ubiquitination of occludin.*" *J Cell Physiol* **203**(3): 564-572.

Martin, T. A., G. Harrison, R. E. Mansel and W. G. Jiang (2003). "*The role of the CD44/ezrin complex in cancer metastasis.*" *Crit Rev Oncol Hematol* **46**(2): 165-186.

McClatchey, A. I. (2003). "*Merlin and ERM proteins: unappreciated roles in cancer development?*" *Nat Rev Cancer* **3**(11): 877-883.

Mitra, S. K. and D. D. Schlaepfer (2006). "*Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells.*" *Curr Opin Cell Biol* **18**(5): 516-523.

Moleirinho, S., A. Tilston-Lunel, L. Angus, F. Gunn-Moore and P. A. Reynolds (2013). "*The expanding family of FERM proteins.*" *Biochem J* **452**(2): 183-193.

Mooseker, M. S. and R. E. Cheney (1995). "*Unconventional myosins.*" *Annu Rev Cell Dev Biol* **11**: 633-675.

Morales, C., Y. Clermont and N. J. Nadler (1986). "*Cyclic endocytic activity and kinetics of lysosomes in Sertoli cells of the rat: a morphometric analysis.*" *Biol Reprod* **34**(1): 207-218.

Morrow, K. A. and L. A. Shevde (2012). "*Merlin: the wizard requires protein stability to function as a tumor suppressor.*" *Biochim Biophys Acta* **1826**(2): 400-406.

Mruk, D. D. and C. Y. Cheng (2004). "*Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis.*" *Endocr Rev* **25**(5): 747-806.

Mruk, D. D. and C. Y. Cheng (2011). "*An in vitro system to study Sertoli cell blood-testis barrier dynamics.*" *Methods Mol Biol* **763**: 237-252.

Mruk, D. D. and C. Y. Cheng (2011). "*The myotubularin family of lipid phosphatases in disease and in spermatogenesis.*" *Biochem J* **433**(2): 253-262.

Mruk, D. D., B. Silvestrini and C. Y. Cheng (2008). "*Anchoring junctions as drug targets: role in contraceptive development.*" *Pharmacol Rev* **60**(2): 146-180.

Nagano, T. and F. Suzuki (1976). "*The postnatal development of the junctional complexes of the mouse Sertoli cells as revealed by freeze-fracture.*" *Anat Rec* **185**(4): 403-417.

Neisch, A. L. and R. G. Fehon (2011). "*Ezrin, Radixin and Moesin: key regulators of membrane-cortex interactions and signaling.*" *Curr Opin Cell Biol* **23**(4): 377-382.

Ng, T., Shima, D., Squir, A. (1999). "*PKC- α regulates beta 1-integrin dependent cell motility through association and control of integrin traffic.*" *EMBO J* **18**: 3909-3923.

- O'Donnell, L., P. K. Nicholls, M. K. O'Bryan, R. I. McLachlan and P. G. Stanton** (2011). "*Spermiation: The process of sperm release.*" *Spermatogenesis* **1**(1): 14-35.
- Ohtani, K., H. Sakamoto, T. Rutherford, Z. Chen, K. Satoh and F. Naftolin** (1999). "*Ezrin, a membrane-cytoskeletal linking protein, is involved in the process of invasion of endometrial cancer cells.*" *Cancer Lett* **147**(1-2): 31-38.
- Ozaki-Kuroda, K., H. Nakanishi, H. Ohta, H. Tanaka, H. Kurihara, S. Mueller, K. Irie, W. Ikeda, T. Sakai, E. Wimmer, Y. Nishimune and Y. Takai** (2002). "*Nectin couples cell-cell adhesion and the actin scaffold at heterotypic testicular junctions.*" *Curr Biol* **12**(13): 1145-1150.
- Palombi, F., M. Salanova, G. Tarone, D. Farini and M. Stefanini** (1992). "*Distribution of beta 1 integrin subunit in rat seminiferous epithelium.*" *Biol Reprod* **47**(6): 1173-1182.
- Pelletier, R. M.** (1988). "*Cyclic modulation of Sertoli cell junctional complexes in a seasonal breeder: the mink (*Mustela vison*).*" *Am J Anat* **183**(1): 68-102.
- Pelletier, R. M. and D. S. Friend** (1983). "*The Sertoli cell junctional complex: structure and permeability to filipin in the neonatal and adult guinea pig.*" *Am J Anat* **168**(2): 213-228.
- Pentassuglia, L. and D. B. Sawyer** (2013). "*ErbB/integrin signaling interactions in regulation of myocardial cell-cell and cell-matrix interactions.*" *Biochim Biophys Acta* **1833**(4): 909-916.
- Pereira, M. L.** (1995). "*Studies on the permeability of the blood-testis barrier in stainless steel-administered mice.*" *Cell Biol Int* **19**(7): 619-624.
- Ploen, L. and B. P. Setchell** (1992). "*Blood-testis barriers revisited. A homage to Lennart Nicander.*" *Int J Androl* **15**(1): 1-4.
- Pogach, L. M., Y. Lee, S. Gould, W. Giglio, M. Meyenhofer and H. F. Huang** (1989). "*Characterization of cis-platinum-induced Sertoli cell dysfunction in rodents.*" *Toxicol Appl Pharmacol* **98**(2): 350-361.
- Pollard, T. D. (1999). *Introduction actin and actin binding proteins*, University Press.
- Pollard, T. D. and G. G. Borisy** (2003). "*Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments.*" *Cell* **112**(4): 453-465.
- Romrell, L. J. and M. H. Ross** (1979). "*Characterization of Sertoli cell-germ cell junctional specializations in dissociated testicular cells.*" *Anat Rec* **193**(1): 23-41.
- Rotty, J. D., C. Wu and J. E. Bear** (2013). "*New insights into the regulation and cellular functions of the ARP2/3 complex.*" *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**(1): 7-12.
- Rougerie, P., V. Miskolci and D. Cox** (2013). "*Generation of membrane structures during phagocytosis and chemotaxis of macrophages: role and regulation of the actin cytoskeleton.*" *Immunol Rev* **256**(1): 222-239.
- Rubin, L. L. and J. M. Staddon** (1999). "*The cell biology of the blood-brain barrier.*" *Annu Rev Neurosci* **22**: 11-28.
- Russell, L.** (1977). "*Observations on rat Sertoli ectoplasmic ('junctional') specializations in their association with germ cells of the rat testis.*" *Tissue Cell* **9**(3): 475-498.
- Russell, L. and Y. Clermont** (1976). "*Anchoring device between Sertoli cells and late spermatids in rat seminiferous tubules.*" *Anat Rec* **185**(3): 259-278.
- Russell, L. D.** (1979). "*Further observations on tubulobulbar complexes formed by late spermatids and Sertoli cells in the rat testis.*" *Anat Rec* **194**(2): 213-232.
- Russell, L. D.** (1979). "*Spermatid-Sertoli tubulobulbar complexes as devices for elimination of cytoplasm from the head region late spermatids of the rat.*" *Anat Rec* **194**(2): 233-246.

- Russell, L. D., A. Bartke and J. C. Goh** (1989). "Postnatal development of the Sertoli cell barrier, tubular lumen, and cytoskeleton of Sertoli and myoid cells in the rat, and their relationship to tubular fluid secretion and flow." *Am J Anat* **184**(3): 179-189.
- Russell, L. D., J. C. Goh, R. M. Rashed and A. W. Vogl** (1988). "The consequences of actin disruption at Sertoli ectoplasmic specialization sites facing spermatids after in vivo exposure of rat testis to cytochalasin D." *Biol Reprod* **39**(1): 105-118.
- Russell, L. D. and R. N. Peterson** (1985). "Sertoli cell junctions: morphological and functional correlates." *Int Rev Cytol* **94**: 177-211.
- Russell, L. D., N. K. Saxena and T. T. Turner** (1989). "Cytoskeletal involvement in spermiation and sperm transport." *Tissue Cell* **21**(3): 361-379.
- Salanova, M., M. Stefanini, I. De Curtis and F. Palombi** (1995). "Integrin receptor alpha 6 beta 1 is localized at specific sites of cell-to-cell contact in rat seminiferous epithelium." *Biol Reprod* **52**(1): 79-87.
- Saotome, I., M. Curto and A. I. McClatchey** (2004). "Ezrin is essential for epithelial organization and villus morphogenesis in the developing intestine." *Dev Cell* **6**(6): 855-864.
- Schaller, M. D., C. A. Borgman, B. S. Cobb, R. R. Vines, A. B. Reynolds and J. T. Parsons** (1992). "pp125FAK a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(11): 5192-5196.
- Setchell, B. P.** (1970). "The secretion of fluid by the testes of rats, rams and goats with some observations on the effect of age, cryptorchidism and hypophysectomy." *J Reprod Fertil* **23**(1): 79-85.
- Setchell, B. P., R. M. Dawson and R. W. White** (1968). "The high concentration of free myo-inositol in rete testis fluid from rams." *J Reprod Fertil* **17**(1): 219-220.
- Setchell, B. P., P. Pollanen and J. L. Zupp** (1988). "Development of the blood-testis barrier and changes in vascular permeability at puberty in rats." *Int J Androl* **11**(3): 225-233.
- Setchell, B. P., T. W. Scott, J. K. Voglmayr and G. M. Waites** (1969). "Characteristics of testicular spermatozoa and the fluid which transports them into the epididymis." *Biol Reprod* **1**: Suppl 1:40-66.
- Setchell, B. P., L. Tao and J. L. Zupp** (1996). "The penetration of chromium-EDTA from blood plasma into various compartments of rat testes as an indicator of function of the blood-testis barrier after exposure of the testes to heat." *J Reprod Fertil* **106**(1): 125-133.
- Setchell, B. P., J. K. Voglmayr and G. M. Waites** (1969). "A blood-testis barrier restricting passage from blood into rete testis fluid but not into lymph." *J Physiol* **200**(1): 73-85.
- Setchell, B. P. and G. M. Waites** (1970). "Changes in the permeability of the testicular capillaries and of the 'blood-testis barrier' after injection of cadmium chloride in the rat." *J Endocrinol* **47**(1): 81-86.
- Setchell, B. P. and A. L. Wallace** (1972). "The penetration of iodine-labelled follicle-stimulating hormone and albumin into the seminiferous tubules of sheep and rats." *J Endocrinol* **54**(1): 67-77.
- Siu, M. K., D. D. Mruk, W. M. Lee and C. Y. Cheng** (2003). "Adhering junction dynamics in the testis are regulated by an interplay of beta 1-integrin and focal adhesion complex-associated proteins." *Endocrinology* **144**(5): 2141-2163.

- Siu, M. K., C. H. Wong, W. M. Lee and C. Y. Cheng** (2005). "Sertoli-germ cell anchoring junction dynamics in the testis are regulated by an interplay of lipid and protein kinases." *J Biol Chem* **280**(26): 25029-25047.
- Srivastava, J., B. E. Elliott, D. Louvard and M. Arpin** (2005). "Src-dependent ezrin phosphorylation in adhesion-mediated signaling." *Mol Biol Cell* **16**(3): 1481-1490.
- Stamenkovic, I. and Q. Yu** (2010). "Merlin, a "magic" linker between extracellular cues and intracellular signaling pathways that regulate cell motility, proliferation, and survival." *Curr Protein Pept Sci* **11**(6): 471-484.
- Su, W., E. W. Wong, D. D. Mruk and C. Y. Cheng** (2012). "The Scribble/Lgl/Dlg polarity protein complex is a regulator of blood-testis barrier dynamics and spermatid polarity during spermatogenesis." *Endocrinology* **153**(12): 6041-6053.
- Tang, E. I., D. D. Mruk and C. Y. Cheng** (2013). "MAP/microtubule affinity-regulating kinases, microtubule dynamics, and spermatogenesis." *J Endocrinol* **217**(2): R13-23.
- Tegtmeyer, N. and S. Backert** (2011). "Role of Abl and Src family kinases in actin-cytoskeletal rearrangements induced by the *Helicobacter pylori* CagA protein." *Eur J Cell Biol* **90**(11): 880-890.
- Toyama, Y., I. Hosoi, S. Ichikawa, M. Maruoka, E. Yashiro, H. Ito and S. Yuasa** (2001). "beta-estradiol 3-benzoate affects spermatogenesis in the adult mouse." *Mol Cell Endocrinol* **178**(1-2): 161-168.
- Toyama, Y., F. Suzuki-Toyota, M. Maekawa, C. Ito and K. Toshimori** (2004). "Adverse effects of bisphenol A to spermiogenesis in mice and rats." *Arch Histol Cytol* **67**(4): 373-381.
- Tuck, R. R., B. P. Setchell, G. M. Waites and J. A. Young** (1970). "The composition of fluid collected by micropuncture and catheterization from the seminiferous tubules and rete testis of rats." *Pflugers Arch* **318**(3): 225-243.
- Ucar, D. A. and S. N. Hochwald** (2010). "FAK and interacting proteins as therapeutic targets in pancreatic cancer." *Anticancer Agents Med Chem* **10**(10): 742-746.
- Ünlükal, N. (2011). PROFENOFOS VE MCPA'NIN TESTİSE ETKİLERİNİN ULTRASTRÜKTÜREL DÜZEYDE İNCELENMESİ. *Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı*, Başkent Üniversitesi.
- Viswanatha, R., A. Bretscher and D. Garbett** (2014). "Dynamics of ezrin and EBP50 in regulating microvilli on the apical aspect of epithelial cells." *Biochem Soc Trans* **42**(1): 189-194.
- Vitale, R., D. W. Fawcett and M. Dym** (1973). "The normal development of the blood-testis barrier and the effects of clomiphene and estrogen treatment." *Anat Rec* **176**(3): 331-344.
- Vogl, A. W.** (1989). "Distribution and function of organized concentrations of actin filaments in mammalian spermatogenic cells and Sertoli cells." *Int Rev Cytol* **119**: 1-56.
- Vogl, A. W., D. C. Pfeiffer, D. Mulholland, G. Kimel and J. Guttman** (2000). "Unique and multifunctional adhesion junctions in the testis: ectoplasmic specializations." *Arch Histol Cytol* **63**(1): 1-15.
- Vogl, A. W., K. S. Vaid and J. A. Guttman** (2008). "The Sertoli cell cytoskeleton." *Adv Exp Med Biol* **636**: 186-211.
- Voglmayr, J. K., T. W. Scott, B. P. Setchell and G. M. Waites** (1967). "Metabolism of testicular spermatozoa and characteristics of testicular fluid collected from conscious rams." *J Reprod Fertil* **14**(1): 87-99.

Voglmayr, J. K., G. M. Waites and B. P. Setchell (1966). "Studies on spermatozoa and fluid collected directly from the testis of the conscious ram." *Nature* **210**(5038): 861-863.

Waites, G. M., A. R. Jones, S. J. Main and T. G. Cooper (1973). "The entry of antifertility and other compounds into the testis." *Adv Biosci* **10**: 101-116.

Waites, G. M. and B. P. Setchell (1966). "Changes in blood flow and vascular permeability of the testis, epididymis and accessory reproductive organs of the rat after the administration of cadmium chloride." *J Endocrinol* **34**(3): 329-342.

Wakayama, T., H. Nakata, M. Kurobo, Y. Sai and S. Iseki (2009). "Expression, localization, and binding activity of the ezrin/radixin/moesin proteins in the mouse testis." *J Histochem Cytochem* **57**(4): 351-362.

Wan, H. T., D. D. Mruk, E. I. Tang, X. Xiao, Y. H. Cheng, E. W. Wong, C. K. Wong and C. Y. Cheng (2014). "Role of non-receptor protein tyrosine kinases in spermatid transport during spermatogenesis." *Semin Cell Dev Biol* **30**: 65-74.

Wang, J., J. Zu, G. Xu, W. Zhao and Y. Jinglong (2014). "Inhibition of focal adhesion kinase induces apoptosis in human osteosarcoma SAOS-2 cells." *Tumour Biol* **35**(2): 1551-1556.

Wang, L., W. Chen, C. Zhao, R. Huo, X. J. Guo, M. Lin, X. Y. Huang, Y. D. Mao, Z. M. Zhou and J. H. Sha (2010). "The role of ezrin-associated protein network in human sperm capacitation." *Asian J Androl* **12**(5): 667-676.

Weber, J. E., T. T. Turner, K. S. Tung and L. D. Russell (1988). "Effects of cytochalasin D on the integrity of the Sertoli cell (blood-testis) barrier." *Am J Anat* **182**(2): 130-147.

Wehrle-Haller, B. (2012). "Assembly and disassembly of cell matrix adhesions." *Curr Opin Cell Biol* **24**(5): 569-581.

Wiebe, J. P., A. Kowalik, R. L. Gallardi, O. Egeler and B. H. Clubb (2000). "Glycerol disrupts tight junction-associated actin microfilaments, occludin, and microtubules in Sertoli cells." *J Androl* **21**(5): 625-635.

Winder, S. J. and K. R. Ayscough (2005). "Actin-binding proteins." *J Cell Sci* **118**(Pt 4): 651-654.

Wong, C. H., D. D. Mruk, W. Y. Lui and C. Y. Cheng (2004). "Regulation of blood-testis barrier dynamics: an in vivo study." *J Cell Sci* **117**(Pt 5): 783-798.

Wong, C. H., D. D. Mruk, M. K. Siu and C. Y. Cheng (2005). "Blood-testis barrier dynamics are regulated by α 2-macroglobulin via the c-Jun N-terminal protein kinase pathway." *Endocrinology* **146**(4): 1893-1908.

Wong, E. W. and C. Y. Cheng (2009). "Polarity proteins and cell-cell interactions in the testis." *Int Rev Cell Mol Biol* **278**: 309-353.

Wong, E. W. and C. Y. Cheng (2011). "Impacts of environmental toxicants on male reproductive dysfunction." *Trends Pharmacol Sci* **32**(5): 290-299.

Worman, H. J. and J. C. Courvalin (2005). "Nuclear envelope, nuclear lamina, and inherited disease." *Int Rev Cytol* **246**: 231-279.

Xia, W. and C. Y. Cheng (2005). "TGF-beta3 regulates anchoring junction dynamics in the seminiferous epithelium of the rat testis via the Ras/ERK signaling pathway: An in vivo study." *Dev Biol* **280**(2): 321-343.

Xiao, X., D. D. Mruk, C. K. Wong and C. Y. Cheng (2014). "Germ cell transport across the seminiferous epithelium during spermatogenesis." *Physiology (Bethesda)* **29**(4): 286-298.

Yan, H. H. and C. Y. Cheng (2005). "Blood-testis barrier dynamics are regulated by an engagement/disengagement mechanism between tight and adherens junctions via peripheral adaptors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(33): 11722-11727.

Yan, H. H. and C. Y. Cheng (2006). "*Laminin alpha 3 forms a complex with beta3 and gamma3 chains that serves as the ligand for alpha 6beta1-integrin at the apical ectoplasmic specialization in adult rat testes.*" *J Biol Chem* **281**(25): 17286-17303.

Zachary, I. and E. Rozengurt (1992). "*Focal adhesion kinase (p125FAK): a point of convergence in the action of neuropeptides, integrins, and oncogenes.*" *Cell* **71**(6): 891-894.

Zhang, J., C. H. Wong, W. Xia, D. D. Mruk, N. P. Lee, W. M. Lee and C. Y. Cheng (2005). "*Regulation of Sertoli-germ cell adherens junction dynamics via changes in protein-protein interactions of the N-cadherin-beta-catenin protein complex which are possibly mediated by c-Src and myotubularin-related protein 2: an in vivo study using an androgen suppression model.*" *Endocrinology* **146**(3): 1268-1284.

Zigmond, S. (2004). "*Formin' adherens junctions.*" *Nat Cell Biol* **6**(1): 12-14.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Nazlı Ece	Uyruğu	T. C.
Soyadı	Ordueri	Tel no	0533 668 68 72
Doğum tarihi	05.08.1984	e-posta	ece_gungor@hotmail.com

Eğitim Bilgileri

	Mezun olduğu kurum	Mezuniyet yılı
Lise	Kadıköy Anadolu Lisesi	2003
Lisans	İstanbul Üniversitesi	2007
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi	2010
Doktora	Akdeniz Üniversitesi	2016

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
Araştırma Görevlisi	Akdeniz Üniversitesi	2009- 2016

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	ÜDS	67,5
İngilizce	TOEFL İBT	65

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Testiküler işlev ve fertilité üzerine abamectin pestisitinin potansiyel toksik etkisinin değerlendirilmesi	TÜBİTAK	01.10.2008- 01.10.2010
Doksorubisin kemoterapisinin neden olduğu testiküler germ hücre apoptozu ve infertilitede poli (ADP-riboz) polimeraz yolağının rolünün değerlendirilmesi	TÜBİTAK	03.10.2011-01.10.2013

Kan-testis bariyerinin düzenlenmesinde rol alan sinyal yollarının araştırılması	BAP	03.01.2011- 03.01.2016
Varikosel ile indüklenen testiküler hasarın oluşumunda Poli ADP Riboz polimeraz (PARP) yolunun rolü	BAP	01.11.2010-01.11.2012
Doksorubisin ile indüklenen seminifer tübül hasarının spektrofotometrik ve görsel sistemler ile araştırılması	BAP	01.09.2014-01.09.2015
Fare preimplantif embriyo gelişim sürecinde foxo1, Foxo3 ve Foxo4 yerleşimlerinin değerlendirilmesi	TÜBİTAK	01.11.2012- 01.11.2016

Burslar-Ödüller:

1. Prof. Dr. Alpay Kelami Ödülü, Ulusal Androloji Derneği, 2016 12. Histoloji ve Embriyoloji Kongresi en iyi sözlü sunu ödülü, Türk Histoloji ve Embriyoloji Derneği, 2016
2. 2214- A/International Doctoral Research Fellowship Programme, TÜBİTAK, 2013
3. Prof. Dr. A. Lutfu Tat Sempozyumu poster üçüncülük ödülü, Prof. Dr. A. Lutfu Tat Sempozyumu, 2013
4. 11. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji kongresi en iyi sözlü sunu ödülü, Türk Histoloji ve Embriyoloji Derneği, 2012

Yayınlar:

- 1- Tasatargil A, Tekcan M, Celik-Ozenci C, Ece Gungor N, Dalkiran B. Aldosterone-induced endothelial dysfunction of rat aorta: role of poly(ADP-ribose) activation. JRAAS, 2009, 10: 127-137

- 2- Dalaklioglu S, Tekcan M, **Gungor NE**, Celik-Ozenci C, Aksoy NH, Baykal A, Tasatargil A. Role of the poly(adp-ribose)polymerase activity in vancomycin-induced renal injury. *Toxicol Lett.* 192;91-96, 2010
- 3- Bicakci AA, Kocoglu-Altan B, Celik-Ozenci C, Tekcan M, Babacan H, **Gungor E**. Histopathological evaluation of pulpal tissue response to various adhesive cleanup techniques. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.*2010 Jul;138(1):12.1-7
- 4- C. Celik-Ozenci, M. Tekcan, L. Sati, **N. E. Gungor**, M. Isbir, A. Tasatargil. Abamectin pesticide exposure and male infertility: human exposure studies supported by animal studies point out a considerable relationship. *Fertil Steril.* 2009 Jan; 92(3).
- 5- Ercan S, Ozturk N, Celik-Ozenci C, **Gungor NE**, Yargicoglu P. Sodium metabisulfite induces lipid peroxidation and apoptosis in rat gastric tissue. *Toxicol Ind Health.* 2010 Aug;26(7):425-31.
- 6- Ciler Celik-Ozenci, Arda Tasatargil, Merih Tekcan, Leyla Sati, **Ece Gungor**, Mehmet Isbir, Ramazan Demir. Effects of abamectin exposure on male fertility in rats: Potential role of oxidative stress- mediated poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) activation. *Regul Toxicol and Pharmacol*, 2011 Dec;61(3):310-7.
- 7- Merih Tekcan, Ismail Turker Koksall, Arda Tasatargil, Omer Kutlu, **Ece Gungor**, Ciler Celik-Ozenci. Potential role of poly(ADP-ribose) polymerase activation in the pathogenesis of experimental left varicocele. *J Androl.*, 2012 Jan-Feb;33(1):122-32
- 8- Ciler Celik-Ozenci, Arda Tasatargil, Merih Tekcan, Leyla Sati, **Ece Gungor**, Mehmet Isbir, Ramazan Demir. Effect of abamectin exposure on semen parameters indicative of reduced sperm maturity: a study on farmworkers in Antalya (Turkey). *Andrologia.* 2012 Dec;44(6):388-95.

- 9- Dalaklioglu S., Sahin P., **Ordueri EG.**, Celik-Ozenci C., Tasatargil A. Potential role of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) activation in methotrexate-induced nephrotoxicity and tubular apoptosis. *Int J Toxicol.* 2012 Sep-Oct;31(5):430-40
- 10- Ercan S1, Basaranlar G, **Gungor NE**, Kencebay C, Sahin P, Celik-Ozenci C, Derin N. Ghrelin inhibits sodium metabisulfite induced oxidative stress and apoptosis in rat gastric mucosa. *Food Chem Toxicol.* 2013 Jun;56:154-61
- 11- **Gungor-Ordueri NE.**, Mruk, DD., Wan, HT., Wong EW., Celik-Ozenci C., Lie PP., Cheng CY. New insights into FAK function and regulation during spermatogenesis. *Histol Histopathol.* 2014 Aug; 29(8):977-89.
- 12- **Gungor-Ordueri NE.**, Sahin Z., Sahin P., Celik-Ozenci, C., The expression pattern of PARP-1 and PARP-2 in the developing and adult mouse testis. *Acta Histochemica.* 2014 Jun;116(5):958-64.
- 13- **Gungor-Ordueri NE**, Tang EI, Celik-Ozenci C, Yan Cheng C., Ezrin is an actin binding protein that regulates Sertoli cell and spermatid adhesion during spermatogenesis. *Endocrinology.* 2014 Oct;155(10):3981-95
- 14- Yilmaz B, Sahin P, **Ordueri E**, Celik-Ozenci C, Tasatargil A. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition improves endothelin-1-induced endothelial dysfunction in rat thoracic aorta. *Ups J Med Sci.* 2014 Aug;119(3):215-22.
- 15- **Gungor-Ordueri NE**, Celik-Ozenci C, Yan Cheng C. Fascin 1 is an actin filament bundling protein that regulates ectoplasmic specialization dynamics in the rat testis. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2014 Nov 1;307(9):E738-53
- 16- Sahin P, Sahin Z, **Gungor-Ordueri NE**, Donmez BO, Celik-Ozenci C. Inhibition of mammalian target of rapamycin signaling pathway decreases retinoic acid stimulated gene 8 expression in adult mouse testis. *Fertil Steril.* 2014 Nov;102(5):1482-1490

- 17- **Gungor-Ordueri NE.**, Celik-Ozenci C., Yan Cheng C. Ezrin – a regulator of actin microfilaments in cell junctions of the rat testis. *Asian J Androl.* 2015 Jul-Aug;17(4):653-8.
- 18- **Gungor-Ordueri NE**, Yan Cheng C. Fascin – an actin binding and bundling protein in the testis and its role in ectoplasmic specialization dynamics. *Spermatogenesis.* 2015 Feb 23;5(1):e1002733.
- 19- Yaba A, **Ordueri NE**, Tanriover G, Sahin P, Demir N, Celik-Ozenci C. Expression of CCM2 and CCM3 during mouse gonadogenesis. *J Assist Reprod Genet.* 2015 Oct;32(10):1497-507
- 20- **Nazli Ece Gungor-Ordueri**, Nilay Kuscu, Arda Tasatargil, Durmus Burgucu, Ciler Celik-Ozenci. Pharmacological inhibition of Doxorubicin induced PARP over activity may prevent testicular damage in mice. *Reproduction*, (under review).
- 21- **Ece Ordueri**, Ciler Celik-Ozenci. Sperm nukleusu ve nuklear matriks: Paternal genomu taşıyan kargodan daha fazlası. *Erkek Ureme Sağlığı/Androloji Bulteni*, Haziran 2013.

Uluslararası Bildiriler

- 1- Tasatargil A, Tekcan M, Celik-Ozenci C, **Gungor NE**, Dalkiran B. Aldosterone-induced endothelial dysfunction of rat aorta: Role of the Poly (ADP-Ribose) Polymerase Activation. *Works and Views In Endothelium-Dependent Vasodilatation*, Iasi, Romania, 2009.
- 2- Celik-Ozenci C, Tekcan M, Sati L, **Gungor NE**, Isbir M, Tasatargil A. Abamectin pesticide exposure and male infertility: human exposure studies supported by animal studies point out a considerable relationship. *American Society for Reproductive Medicine Annual Meeting*, October 17-21, Atlanta, GA, 2009.

- 3- **Ordueri E**, Gorczynski RM, Erin N, Celik-Ozenci C. Expression of CD200 and CD200 receptor in mouse testis and ovary. The 1st Biomarker Meeting in Reproductive Medicine: Emergence of a new field, 29-30 April 2012, Valencia, Spain 2012.
- 4- Kaya H., Oktay C., Celik-Ozenci C., **Gungor NE.**, O. Ozkan. Comparison of n-butyl 2-cyanoacrylate and super glue for the closure of incisional wounds. International Conference of Emergency Medicine, ICEM, 27-30 June, Dublin, Ireland, 2012.
- 5- Celik-Ozenci C., Tasatargil A., **Gungor Ordueri E.**, Kuscu N., Sahin P. Role of the poly(ADP-ribose) polymerase activity in doxorubicin-induced testicular damage. 28th Annual Meeting of European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE), 01-04 2012, Istanbul, Turkey.
- 6- B. Yilmaz, P. Sahin, **E. Ordueri**, C. Celik-Ozenci, A. Tasatargil. The role of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) pathway on endothelin-1 (ET-1)-induced endothelial dysfunction in rat thoracic aorta. 11th European Association for Clinical Pharmacology and Therapeutics (EACPT) Congress. 28-31 August 2013. Geneva, Switzerland.
- 7- Pınar Sahin, Zeliha Sahin, **N. Ece Gungor-Ordueri**, Ciler Celik-Ozenci. Inhibition of mtor signalling pathway decreases stra8 expression in adult mouse testis. ASA- 39th Annual Meeting April 5-8, 2014, Atlanta, Georgia.

Ulusal Bildiriler

1. Tekcan, M., Sati, L., Sacan, M., Tasatargil, A., **Gungor, N.E.**, Celik-Ozenci, C. Abamectin (pestisit) toksisitesine bağlı olarak gelişen testiküler hasarda Poli ADP-Riboz Polimeraz (parp) aktivitesinin rolü. *Uluslararası Katılımlı 9. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi*, Adana, P-181, 20-23 Mayıs 2008.
2. Celik-Ozenci, C., Sati, L., Tekcan, M., **Gungor, N.E.**, İsbir, M., Demir, R., Tasatargil, A. Testiküler işlev ve fertilitte üzerine abamectin pestisitinin potansiyel toksik etkisinin değerlendirilmesi. *Uluslararası Katılımlı 9. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi*, Adana, O-5, 20-23 Mayıs 2008.
3. Celik-Ozenci C, **Gungor NE**, Tekcan M, Isbir M, Sati L, Usta Mf, Akar Me, Demir R, Tasatargil A. Çiftçilerde Abamectin (Pestisit) Kullanımının Spermin Morfogenetik Özelliklerine Ve İnfertiliteye Etkisinin Araştırılması. 8. Ulusal Androloji Kongresi, S-24, İzmir, 20-23 Mayıs 2009.
4. Tekcan M, **Gungor NE**, Tasatargil A, Kutlu O, Koksall, Celik-Ozenci C. Varikosel İle İndüklenen Testiküler Hasarın Oluşumunda Poli Adp-Riboz Polimeraz (Parp) Yolağının Rolü. 8. Ulusal Androloji Kongresi, S-25, İzmir, 20-23 Mayıs 2009.
5. **Gungor NE**, Tekcan M, Tasatargil A, Celik-Ozenci C. Abamectin (Pestisit) Uygulanan Sıçan Testisinde Toksik Etkinin Tem İle Değerlendirilmesi: Spermatogenik Seri Hücrelerinde Lipid Damlacıklarının Artışı. 19. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi, 144, Trabzon, 22-25 Haziran 2009.
6. Tasatargil A, Tekcan M, Celik-Ozenci C, **Gungor NE**, Dalkıran B. Sıçan aortunda aldosteron ile indüklenen endotel dişişlevinde poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP) aktivasyonunun rolü. 20.Ulusal Farmakoloji Kongresi, 88, Antalya, 4-7 Kasım 2009.

7. Dalaklioglu S, Tekcan M, **Gungor NE**, Celik-Ozenci C, Aksoy NH, Baykal A, Tasatargil A. Vankomisin ile indüklenen böbrek hasarında poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP) yolağının rolü. 20.Ulusal Farmakoloji Kongresi, 47 Antalya, 4-7 Kasım 2009.
8. Şahin P, Tanrıöver G, **Güngör E**, Demir N, Çelik-Özenci Ç. Fare embriyonik ve postnatal testis gelişim sürecinde CCM2 ve CCM3 protein yerleşimlerinin değerlendirilmesi. Uluslararası Katılımlı 10. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, Çeşme, T-88, 17-20 Mayıs 2010.
9. **Güngör E**, Şahin Z, Şahin P, Çelik-Özenci Ç. Fare testis gelişim sürecinde PARP-1, PARP-2 ve PAR yerleşimlerinin araştırılması. Uluslararası Katılımlı 10. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, Çeşme, S-8, 17-20 Mayıs 2010.
10. Çelik-Özenci Ç, Şahin P, **Güngör E**, Şahin Z. Hücre büyümesi ve çoğalmasını düzenleyen mtor sinyal yolağı proteinleri erken spermatogenik hücrelerde ekspre olurlar. Uluslararası Katılımlı 10. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, Çeşme, S-7, 17-20 Mayıs 2010.
11. Ozenci-Celik C., Tasatargil A., Sahin P., **Gungor E.**, Yesiltepe M. Doksorubisin kemoterapisi sonucu gelişen testiküler hasarda poli (adp-riboz) polimeraz (parp) aktivasyonunun değerlendirilmesi. 4. Ulusal üreme endokrinolojisi ve infertilite kongresi, Antalya, 7-10 Ekim 2010.
12. **Ordueri E**, Sahin P, Kuscu N, Tasatargil A, durmus H, Celik-Ozenci C. The expression patterns of poly (ADP-ribose) polymerization in time dependent doxorubicin treated mice. Clinic Embryology Society II. Congress, September 23-25, Mugla, 2011.
13. Sahin P, Sahin Z, **Ordueri E**, Kuscu N, Celik-Ozenci C. The effect of rapamisin in germ cell proliferation in vitro culture of seminiferous tubul. Clinic Embryology Society II. Congress, September 23-25, Mugla, 2011.

14. Kuscü N, Sahin P, **Ordueri E**, Tasatargil A, durmus H, Celik-Ozenci C. The effect of poly (ADP-ribose) polymerization inhibitor to the germ cell apoptosis induced with varicocele. Clinic Embryology Society II. Congress, September 23-25, Mugla, 2011.
15. Ordueri E, Sahin P, Kuscü N, Celik-Ozenci C. Ultrastructural analysis of testicular cord formation in fetal and postnatal mouse testis 20. National Electron Microscopy Congress, October 25-28, Antalya, 2011
16. Sahin P, **Ordueri E**, Kuscü N, Celik-Ozenci C. Ultrastructural analysis of seminiferous tubule and germ cell proliferation on testicular damage induced with doxorubicin. 20. National Electron Microscopy Congress, October 25-28, Antalya, 2011
17. Kuscü N, Sahin P, **Ordueri E**, Celik-Ozenci C. The expression patterns of mtor signal pathways in the testicular development. 20. National Electron Microscopy Congress, October 25-28, Antalya, 2011
18. Dalaklıoğlu S, Şahin P, Celik-Ozenci C., Taşatargil A. Metotreksatin neden olduğu nefrotoksisitede poli adp riboz polimeraz yolağının rolünün değerlendirilmesi 21. ULUSAL FARMAKOLOJİ KONGRESİ, 19-22 EKİM 2011.
19. Sahin P., Sahin Z., **Ordueri E**. Kuscü N., Celik-Ozenci C. Representing the effect of rapamycin administration to spermatogenic cells utilizing seminiferous tubule culture. XI. National Histology and Embryology Congress, May 16-19, Denizli, 2012
20. Kuscü N., Sahin P., Ordueri E. Tasatargil. T. Celik-Ozenci C. Doksorubisin ile indüklenen testiküler hasarda SIRT1, p53 ve p21 yerleşimlerinin değerlendirilmesi. XI. National Histology and Embryology Congress, May 16-19, Denizli, 2012

21. **Ordueri E.**, Sahin P., Kuscu N., Celik-Ozenci C. Evaluation of Caspase-dependent and caspase-independent apoptosis in postnatal mouse testis development. XI. National Histology and embriyology Congress, May 16-19, Denizli, 2012
22. Celik-Ozenci C., **Ordueri E.**, Sahin P., Kuscu N., Erişkin fare testislerinde CD200 ve CD200R yerleşimlerinin değerlendirilmesi. XI. National Histology and Embryology Congress, May 16-19, Denizli, 2012.
23. Çelik-Özenci Ç, **Ordueri E**, Sırcan-Küçüksayan A, Şahin P, Canpolat M. Normal ve germ hücre hasarı olan sıçan seminifer tübüllerinin görüntüleme ve spektroskopik yöntemlerle in vivo ve gerçek zamanlı değerlendirilmesi: TESE için yeni bir yaklaşımın ön bulguları. 5th National Reproductive Endocrinology and Infertility Congress, September 27-30, Çeşme, 2012.
24. Soner ÇELİK, Pınar ŞAHİN, **Nazlı Ece ORDUERİ**, Çiler ÇELİK-ÖZENCİ. POSTNATAL FARE OVARYUM GELİŞİMİNDE APOPTOZ İNDÜKLEYİCİ FAKTÖR (AIF) YERLEŞİMİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ. 21. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi, 28-31 Mayıs 2013. Mersin.
25. Çiler Çelik-Özenci, Nilay Kuşcu, Nayçe Bektaş, **Ece Ordueri**, Pınar Şahin, Arda Taşatargil. Doksorubisin uygulanan PARP-1 geni silinmiş farelerde FOXO transkripsiyon faktörlerinin yerleşimleri spermatogenez sürecinde değişiklik gösterir. IV. Üreme tıbbı Derneği Kongresi, 26-30 Eylül 2013, Antalya.
- 26- Ayse Akman Karakas, Ciler Celik-Ozenci, Dijle Kipmen Korgun, **Nazlı Ece Gungor**, Mehmet Akif Ciftcioglu, Erkan Alpsoy. Deri hastalıklarında sürfaktan proteininin araştırılması: Kontrollü çalışma. Prof. Dr. A. Lutfu Tat Sempozyumu, Kasım, 13 - 17, Ankara, 2013.

- 27- **Nazli Ece Gungor-Ordueri**, Ciler Celik-Ozenci, C. Yan Cheng. Ezrin Is A Regulatory And Actin Binding Protein During Spermatogenesis In Blood-Testis Barrier Regulation. XII. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Mayıs 27-30, Ankara, 2014.
- 28- **N. E. Gungor- Ordueri**, C Celik-Ozenci. Crb3 yerleşiminin kadmiyum-uygulanan sıçan testis modeli kullanılarak araştırılması. XIII. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Nisan 30- May 3, İzmir, 2016.

