

**T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı**

**DESERT HEDGEHOG SİNYAL YOLAĞININ  
ANORMAL SPERMATOGENEZ VE  
TESTİKÜLER KANSER OLUŞUMUNDAKİ  
ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

**Zeliha ŞAHİN**

**Doktora Tezi**

**Antalya, 2010**

**T.C.**  
**AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı**

**DESERT HEDGEHOG SİNYAL YOLAĞININ**  
**ANORMAL SPERMATOGENEZ VE**  
**TESTİKÜLER KANSER OLUŞUMUNDAKİ**  
**ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

**Zeliha ŞAHİN**

**Doktora Tezi**

**Tez Danışmanları**  
**Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL**  
**Doç. Dr. Kate LOVELAND**

“Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir”

**Antalya, 2010**

**Sağlık Bilimleri Enstitüsü M¼d¼rl¼ę¼ne;**

Bu alışma j¼rimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Doktora Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir. 25/06/2010

**Tez Danışmanı** : Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fak¼ltesi  
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Ramazan DEMİR  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fak¼ltesi  
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Candan ÖZOğUL  
Gazi Üniversitesi Tıp Fak¼ltesi  
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Üye : Doç. Dr. Mustafa Faruk USTA  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fak¼ltesi  
¼roloji Anabilim Dalı

Üye : Doç. Dr. iler ÇELİK ÖZENCİ  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fak¼ltesi  
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

**ONAY:**

Bu tez, Enstit¼ Y¼netim Kurulunca belirlenen yukarıdaki j¼ri üyeleri tarafından uygun g¼r¼lm¼ř ve Enstit¼ Y¼netim Kurulu'nun ..... / .... / 2010 tarih ve . ./ . sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

**Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL**  
**Enstit¼ M¼d¼r¼**

## Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kurul ve Senato Kararı

Sağlık Bilimleri Enstitüsünün 22/06/2000 tarih ve 02/09 sayılı enstitü kurul kararı ve 23/05/2003 tarih ve 04/44 sayılı senato kararı gereğince ‘‘Sağlık Bilimleri Enstitülerinde lisansüstü eğitim gören doktora öğrencilerinin tez savunma sınavına girebilmeleri için, doktora bilim alanında en az bir yurtdışı yayın yapması gerektiği’’ ilkesi gereğince yapılan yayınların listesi aşağıdadır (Orjinalleri ekte sunulmuştur).

1. Itman C, Whiley PA, Zhou W, Meistrich M, **Sahin Z**, Loveland KL. Regulated production of SnoN2 is a feature of testicular differentiation. Microsc. Res Tech. 2009 Nov;72(11):833-844.

## ÖZET

Hedgehog (Hh) sinyal yolağı, birçok dokunun gelişimi sırasında düzenleyici olarak rol oynamakta ve bazı kanser türlerinde ekspresyonları artmaktadır. Hh sinyalinin, çeşitli kanser türlerinin oluşumunda katkı sağladığı kabul edilmesine rağmen, bu yolağın testis gelişimindeki rolü, yetişkin testisinde spermatogoniyal kök hücrelerdeki ekspresyonu ve spermatogenezdeki rolü henüz bilinmemektedir. Embriyonik gelişim sırasında, olgunlaşmasını normal olarak tamamlayamayan germ hücrelerinin, yetişkinlik döneminde testis kanseri ile ilişkilendirilmesinden dolayı, bu tez çalışmasında Hh'ların, normal gelişmekte olan testiste ve testis gelişiminin hasara uğradığı durumlarda, yetişkin testisindeki spermatogoniyal kök hücrelerde ve normal yetişkin spermatogenezindeki rolleri sorgulandı. Bu amaçla, Desert Hedgehog sinyal yolağının anormal spermatogenez ve testiküler kanser oluşumundaki rolü, *in situ* hibridizasyon, immünohistokimya, tübül damla kültürü ve qRT-PCR yöntemleriyle araştırıldı.

Çalışmamızın sonuçları, spermatogenezin ilk dalgasında, Hh sinyal yolağının, erken embriyonik germ hücrelerinde aktivite gösterdiğini, doğum sonrası dönemdeki germ hücrelerinde sinyal aktivitesinin kaybolduğunu ve yetişkinlik döneminde, spermatogenezle beraber, Hh sinyalinin tekrar aktifleştüğünü gösterdi. Radyasyona maruz kalan yetişkin sıçan testisi modeli kullanarak yaptığımız analizler sonucunda, Hh sinyal yolağının, yalnızca embriyonik dönemdeki testiküler kök hücrelerde değil ancak, yetişkin sıçan testisindeki farklılaşmamış spermatogoniyal kök hücrelerde de aktivite gösterdiği bulundu. İlginç olarak, hormonal çevrenin değişmesiyle birlikte, kök hücrelerin bir sonraki aşamaya farklılaşmasıyla Hh sinyalinin de aktivitesini yitirdiği gözlemlendi.

Dibütilfitalat maruziyeti veya aktivin beta-A geninin knock-out edilmesiyle, embriyonik testis gelişiminin hasara uğradığı durumlarda, Hh sinyalinin ekspresyon şiddetinin de değiştiği gözlemlendi. Bu durum, anormal germ hücre gelişiminde, Hh sinyal yolağının da katkı sağlayabileceğini gösterebilir.

Seminifer tübül damla kültürü yöntemiyle, Hh sinyal yolağı aktivitesinin, Hh inhibitörü olan Cyclopamine ile inhibe edilmesinin ardından, postnatal 1 günlük testiste, *SCYP3* ve *Stra8* gibi mayoz ilişkili genlerin up-regüle olduğu bulundu.

Kemirgen testis dokularında, germ hücre gelişiminin özel aşamalarında rol oynadığı gösterilen Hh sinyal yolağının, insan testiküler kanserli dokularında da aktivite gösterdiği anlaşıldı.

Bu tez çalışmasında bildirilen, Hh'ların gelişim farklı aşamasındaki testiküler hücrelerdeki ekspresyonlarıyla ilgili bilgiler, Hh sinyalinin, spermatogenezin özel basamaklarında aktif olduğunu ve çok sıkı bir şekilde denetlenerek, spermiogenezle kapandığını göstermektedir. Testis gelişim ve fonksiyonu sırasında bu derece kritik olan ve sıkı bir şekilde denetlenen Hh sinyal yolağında meydana gelebilecek herhangi bir hasarın, anormal spermatogenezle sonuçlanabileceği ve dahası testisküler kanser oluşumuna katkı sağlayabileceği söylenebilir.

**Anahtar Kelimeler:** Desert Hedgehog sinyal yolağı, spermatogenez, testiküler gelişim, *in situ* hibridizasyon.

## ABSTRACT

Hedgehog (Hh) signalling regulates many aspects of normal development and is upregulated in some cancers. Although the contribution of Hedgehog signalling to cancers is widely accepted, its importance for testis development, spermatogonial stem cells, a unique pluripotent cell type sustained through adulthood, and its roles in spermatogenesis are unknown. Because it is hypothesised that the germ cells which couldn't mature properly during embryonic life are associated with testicular cancer in adult life, this thesis aimed to clarify the contribution of Hedgehog signalling in abnormal spermatogenesis and testicular cancer by using *in situ* hybridisation, immunohistochemistry, tubule drop culture and qRT-PCR techniques..

The results of our study showed that during the first wave of spermatogenesis, Hh signaling pathway is active in germ cells, disappearing at birth and reactivating with spermatogenesis in adults. The results from irradiated rat testis model showed that Hh signalling is not only active in embryonic spermatogonial stem cells but also in adult stem cells in the testis. These findings provide the first indication that Hh signalling is active in resting stem cells and are turned off when stem cells mature.

When embryonic testis development is disturbed by using DBP exposure and Activin $\beta$ -A knock-out models, we observed that the activity of Hh signalling has been changed. This suggests the possible contribution of Hh signalling in abnormal germ cell development.

By using a hanging drop culture system on postnatal day 1 mouse seminiferous cords with or without Cyclopamine, (an inhibitor of the Hh signalling pathway), we showed that the genes associated with meiotic divisions such as *Stra8* and *SCYP3* are upregulated.

As well as the expression sites of Hh signalling in murine testis shown in this study, we also understand that Hh signalling is active in testicular cancer patients samples.

This thesis provides fresh information regarding Hh signalling which demonstrated that Hh pathway component expression is highly regulated in the testis, indicating that Hh signals function at discrete stages of spermatogenesis. The data presented in this thesis provide a new understanding of how Hh signalling is regulated *in vivo* and demonstrate its potential contribution to male fertility and infertility. As our understanding of the number of cancers associated with Hh signalling increases, understanding the mechanisms by which Hh signal transduction is regulated is essential for identifying potential target drugs and developing new treatments.

**Key Words:** Desert Hedgehog signalling pathway, spermatogenesis, testicular development, *in situ* hybridization.

## TEŞEKKÜR

Bu tezimin gerekleŐmesinde;

Sayın DanıŐman hocam Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL ve ikinci danıŐman hocam Sayın Do.Dr. Kate LOVELAND'e tezimin gerçekleşmesi için gÖstermiŐ oldukları bilimsel katkılarından ayrıca maddi ve manevi destekten dolayı,

Monash Üniversitesi Tıp Fakóltesi LOVELAND laboratuvarının değerli çalıŐanlarına, gÖstermiŐ oldukları her tÖrlÖ destek ve bilimsel katkılarından dolayı,

Anabilim Dalımız'daki Sayın hocalarıma ve tÖm arkadaŐlarıma, tezimi Monash Üniversitesinde tamamlamama izin verdikleri ve bu sÖre içerisinde gÖstermiŐ oldukları toleranslarından dolayı,

Sevgili aileme, bana her zaman destek oldukları ve sağladıkları tÖm imkânlardan dolayı, sonsuz teŐekkÖrlerimi sunarım.

Zeliha ŞAHİN

## İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
<b>ÖZET</b>	v
<b>ABSTRACT</b>	vi
<b>TEŞEKKÜR</b>	vii
<b>İÇİNDEKİLER DİZİNİ</b>	viii-x
<b>EKLER</b>	x
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ</b>	xi-xii
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	xiii-xiv
<b>GİRİŞ ve AMAÇ</b>	1-2
<b>GENEL BİLGİLER</b>	3-28
2.1. Memelilerde Testis Gelişimi	3-21
2.1.1. Memeli Testisinin Genel Yapısı	3-4
2.1.2. Fötal Kemirgen Gonadındaki Olaylar	5-7
2.1.3. Doğum sonrası Fare Testisindeki Olaylar	7-8
2.1.4. Spermatogoniya	8-9
2.1.5. Spermatozitler	9-12
2.1.6. Spermatoitler	12-14
2.1.7. Yetişkin Kemirgen Testisi	14-15
2.1.8. Kemirgen Testisinin Somatik Hücreleri	16-18
2.1.8.1. Sertoli Hücreleri	16-17
2.1.8.2. Leydig Hücreleri	17-18
2.1.8.3. Peritübüler Myoid Hücreler	18
2.1.8.4. Endotelyal Hücreler	18
2.1.9. Spermatogenezin Hormonal Kontrolü	19-21
2.1.9.1. Follikül Stimüle Edici Hormonun Rolü	20
2.1.9.2. Luteinize Edici Hormonun Rolü	20-21
2.2. Hedgehog Sinyal Yolağı	21-27
2.2.1. Hedgehog Sinyal Transdüksiyon Mekanizması	21-23
2.2.2. Hedgehog Sinyalinin Gelişimdeki Rolü	23-27
2.2.2.1. Embriyogenezde Hedgehog Sinyalinin Rolü	23-24
2.2.2.2. Kanser Oluşumunda Hedgehog Sinyalinin Rolü	24-25
2.2.2.3. Testiste Hedgehog Sinyal Yolağı	26-27
2.3. Hipotez ve Amaç	28
<b>GEREÇ ve YÖNTEM</b>	29-42
3.1. Radyasyon Alan Sıçan Testis Modeli	29-30
3.2. Fötal Dönemde Dibütülfitalat (DBP)'ye Maruz Kalmış Sıçan Testis Modeli	30-31



3.3.	Aktivin Knock-Out (Inhba <sup>-/-</sup> ) Fare Testis Modeli	31-32
3.4.	Patolojik İnsan Testis Neoplazma Doku Örnekleri	32
3.5.	Seminifer Tübül Damla Kültürü	32-33
3.5.1.	Kantitatif Real Time-PCR (qRT-PCR)	33-34
3.6.	In Situ Hibridizasyon ve Probların Hazırlanması	34-40
3.6.1.	cDNA'ların DIG ile İşaretlenmesi Öncesi PCR ile Elde Edilmeleri	34-39
3.6.1.1.	Dizayn Edilen Primerlerden PCR Ürünü Elde Edilmesi	34-36
3.6.1.2.	PCR Ürününün pGEM-T Easy Vektörüne Klonlanması	36
3.6.1.3.	pGEM-T Easy Vektörünün E.Coli DH5α Bakterisine Transformasyonu	36-37
3.6.1.4.	Vektör İçeren Bakteri Klonisinin Belirlenmesi	37
3.6.1.5.	Vektörümüzün Bakteriden Uzaklaştırılması(Miniprep) ve Sekans Analizi	37-38
3.6.1.6.	Riboproların DIG-ile İşaretlenmesi	38
3.6.1.7.	Dot Blot Protokolü	38-39
3.6.2.	İn Situ Hibridizasyon Protokolü	39-40
3.7.	İmmünohistokimya	40-42
<b>BULGULAR</b>		<b>43-63</b>
4.1.	Yetişkin Sıçan Testisinde Hh Sinyal Yolağı mRNA Ekspresyonu	43-48
4.1.1.	Yetişkin Sıçan Testisinde Hh Sinyal Yolağı, Ligand-Reseptör mRNA Ekspresyonu	43-45
4.1.2.	Yetişkin Sıçan Testisinde Hh Sinyal Yolağı, Hücreiçi Sinyal Elemanlarını mRNA Ekspresyonu	46-48
4.2.	Radyasyona Maruz Kalmış Yetişkin Sıçan Testisi Modelinde, Hh Sinyal Yolağı mRNA Ekspresyonu	48-51
4.2.1.	Radyasyona Maruz Kalmış Yetişkin Sıçan Testisi Modelinde, Hh Sinyal Yolağı Ligand-Reseptör mRNA Ekspresyonu	49
4.2.2.	Radyasyona Maruz Kalmış Yetişkin Sıçan Testisi Modelinde, Hh Sinyal Yolağı, Hücreiçi Sinyal Elemanları mRNA Ekspresyonu	50-51
4.3.	Gelişmekte Olan Sıçan Testisinde Hh sinyal Yolağı mRNA Ekspresyonu	52-56
4.3.1.	Gelişmekte Olan Sıçan Testisinde Hh sinyal Yolağı Ligand-Reseptör mRNA Ekspresyonu	54
4.3.2.	Gelişmekte Olan Sıçan Testisinde Hh sinyal Yolağı Hücreiçi Sinyal Elemanları mRNA Ekspresyonu	55-56
4.4.	DBP'ye Maruz Kalmış Sıçan Testisinde Hh sinyal Yolağı mRNA Ekspresyonu	57-60
4.4.1.	DBP'ye Maruz Kalmış Sıçan Testisinde VASA ve PCNA İmmünohistokimya Analizi	57-58
4.4.2.	DBP'ye Maruz Kalmış Sıçan Testisinde, Hh Sinyal Yolağı mRNA Ekspresyonu	59-60
4.5.	Aktivin Beta-A Knock-Out (Inhba <sup>-/-</sup> ) Embriyonik Fare Testisinde Hh Sinyal Yolağı Ekspresyonu	60-61

4.5.1. Vahşi Tip ve Inhba <sup>-/-</sup> Embriyonik Fare Testisinde Gli1 mRNA Sentezi	61
4.6. Seminifer Tübül Damla Kültür Yöntemiyle Hh Sinyal Yolağının İnhibe Edilmesi ve Testisteki Gen ekspresyon Değişiminin qRT-PCR ile Belirlenmesi	62
4.7. Yetişkin İnsan Testisi, Non-Seminoma, Seminoma ve CIS Örneklerinde Gli1 mRNA Ekspresyonu	63
<b>TARTIŞMA</b>	<b>64-71</b>
<b>SONUÇLAR</b>	<b>72</b>
<b>KAYNAKLAR</b>	<b>73-91</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>92</b>
<b>EKLER</b>	<b>93</b>
<b>Ek 1.</b> Microsc. Res Tech. 2009 Nov;72(11):833-844. Regulated production of SnoN2 is a feature of testicular differentiation. Itman C, Whiley PA, Zhou W, Meistrich M, <b>Sahin Z</b> , Loveland KL.	

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>PGH</b>	: Primordiyal germ hücre
<b>CIS</b>	: Carcinoma in Situ
<b>Hh</b>	: Hedgehog
<b>Shh</b>	: Sonic hedgehog
<b>Ihh</b>	: Indian hedgehog
<b>Dhh</b>	: Desert hedgehog
<b>Sry</b>	: Sex determining region on Y chromosome
<b>E</b>	: Embriyonik gün
<b>AMH</b>	: Anti-Müllerian hormon
<b>PLAP</b>	: Plasental like alkalın phosphatase
<b>PCNA</b>	: Proliferasyon cell nüklear antijen
<b>SCF</b>	: Stem cell faktör
<b>W</b>	: White spotting
<b>ST</b>	: Steel
<b>PND</b>	: Postnatal gün
<b>A<sub>S</sub></b>	: Tip A single spermatogoniya
<b>A<sub>al</sub></b>	: Tip A aligned spermatogoniya
<b>A<sub>al</sub></b>	: Tip A paired spermatogoniya
<b>Ngn3</b>	: Neurogenin-3
<b>FSH</b>	: Follikül stimüle edici hormon
<b>LH</b>	: Luteinize edici hormon
<b>GnRH</b>	: Gonodotropin salgılayıcı hormon
<b>SC</b>	: Sinaptonemal kompleks
<b>TP</b>	: Tranzisyon proteinleri
<b>CaMKIV</b>	: Ca <sup>+2</sup> /Calmodilin bağımlı protein kinaz IV
<b>mRNP</b>	: Messenger ribonükleoprotein parçacıkları
<b>BTB</b>	: Kan-testis bariyeri
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	: Transforme edici büyüme faktörü alfa

<b>TGF-<math>\beta</math></b>	: Transforme edici büyüme faktörü-beta
<b>PDGF</b>	: Platelet-derived growth factor
<b>Ptc</b>	: Patched
<b>Ptc1</b>	: Patched-1
<b>Ptc2</b>	: Patched-2
<b>Gli1</b>	: Gli transkripsiyon faktörü 1
<b>Gli2</b>	: Gli transkripsiyon faktörü 2
<b>Gli3</b>	: Gli transkripsiyon faktörü 3
<b>Smo</b>	: Smoothed
<b>Fu</b>	: Fused
<b>SuFu</b>	: Supressor of Fused
<b>ZF</b>	: Zinc finger
<b>Dhh<sup>-/-</sup></b>	: Desert hedgehog knock-out
<b>Ihh<sup>-/-</sup></b>	: İndian hedgehog knock-out
<b>Shh<sup>-/-</sup></b>	: Sonic hedgehog knock-out
<b>Inhba<sup>-/-</sup></b>	: Aktivin beta-a knock-out
<b>SCLC</b>	: Small-cell lung cancer
<b>PanINs</b>	: Pankreatik karsinogenez prekürsör lezyonu
<b>PC3</b>	: Prostat kanser hücre soyu
<b>LBNF1</b>	: Lewis ve Brown norway hibritleri birinci soyu
<b>DBP</b>	: Dibütilfitalat
<b>TBS</b>	: Tris tamponu
<b>DEPC</b>	: Dietil prokarbonat
<b>DAB</b>	: 3,3' Diaminobenzidine
<b>DMEM</b>	: Dulbecco's modified essential medium
<b>BSA</b>	: Bovine serum albumin
<b>TAE</b>	: Tris edta tamponu
<b>dNTP</b>	: Deoksinükleotid trifosfat solüsyonu
<b>PCR</b>	: Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>qRT-PCR</b>	: Kantitatif real-time polimeraz zincir reaksiyonu

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil No</b>	<b><u>Sayfa No</u></b>
2.1.1.1. Kemirgen testisi yapı ve organizasyonu.	4
2.1.2.1. Farede bipotent gonadın cinsiyet farklanması.	5
2.1.2.2. Fötal fare gonadında cinsiyet farklanması.	7
2.1.3.1. Spermatogenezin ilk dalgası.	8
2.1.5.1. Mayoz hücre siklusunun basamakları.	10
2.1.7.1. Yetişkin fare testisi enine kesiti.	14
2.1.7.2. Seminifer tübül siklusunun basamaklandırılması.	15
2.1.9.1. Spermatogenezin hormonal kontrolü.	19
2.2.1.1. Hh sinyal yolağı.	22
2.2.1.2. Hh sinyal yolağı Gli transkripsiyon faktörleri.	23
3.1.1. Radyasyon alan sıçan testis modelinin şematik şekli.	30
3.2.1. DBP'ye maruz kalmış sıçan testis modeli şematik şekli.	31
3.3.1. Fötal dönemde aktivin ekspresyonu.	32
3.5.1. Seminifer tübül damla kültürü yöntemi.	33
3.6.1.1.1. pGEM-T Easy vektörü sekans referans noktaları.	36
4.1.1.1. Memeli testisinde Dhh ekspresyonu.	43
4.1.1.2. Yetişkin sıçan testisinde Hh sinyal yolağı ligand ve reseptör mRNA ekspresyonu.	45
4.1.2.1. Yetişkin sıçan testisinde Hh sinyal yolağı hücreiçi sinyal elemanları mRNA ekspresyonu.	47
4.1.1. Yetişkin sıçan testisinde Hh sinyal yolağı ekspresyonu	48
4.2.1.1. Radyasyona maruz kalmış sıçan testisi modelinde Hh sinyal yolağı ligand-reseptör mRNA ekspresyonu.	49
4.2.2.1. Radyasyona maruz kalmış sıçan testisi modelinde Hh sinyal yolağı hücreiçi elemanları mRNA ekspresyonu.	50-51
4.2.1. Radyasyona maruz kalmış sıçan testisi modelinde Hh sinyal yolağı ekspresyonu.	51

<b>4.3.1.</b> Gelişmekte olan sıçan testisinde AMH, PCNA ve VASA immünohistokimyası.	<b>53</b>
<b>4.3.1.1.</b> Gelişmekte olan sıçan testisinde Hh sinyal yolağı ligand-reseptör mRNA ekspresyonu.	<b>54</b>
<b>4.3.2.1.</b> Gelişmekte olan sıçan testisinde Hh hücreiçi sinyal elemanları mRNA ekspresyonu.	<b>55-56</b>
<b>4.3.2.</b> Gelişmekte olan sıçan testisinde Dhh ekspresyonu.	<b>56</b>
<b>4.3.3.</b> Gelişmekte olan sıçan testisinde Ptc2, Smo, Gli1, Gli2, Gli3 Fu ve SuFu ekspresyonu.	<b>56</b>
<b>4.4.1.1.</b> DBP'ye maruz kalmış sıçan testisinde VASA ve PCNA immünohistokimyası.	<b>58</b>
<b>4.4.2.1.</b> DBP'ye maruz kalmış sıçan testisinde Hh sinyal yolağı elemanları mRNA ekspresyonu.	<b>59-60</b>
<b>4.5.1.</b> Aktivin beta-A immünohistokimyası.	<b>60</b>
<b>4.5.1.1.</b> Vahşi tip ve <i>Inhba</i> <sup>-/-</sup> embriyonik fare testisinde Gli1 mRNA ekspresyonu.	<b>61</b>
<b>4.6.1.</b> qRT-PCR sonuçları.	<b>62</b>
<b>4.7.1.</b> Yetişkin insan neoplazma örneklerinde Gli1 mRNA ekspresyonu.	<b>63</b>

## GİRİŞ ve AMAÇ

Erkek bireylerde, puberte sonrası testiste gerçekleşen spermatogenez olayıyla sperm elde edilir ve böylece genetik yapı nesilden nesile aktarılır. Spermatogenez, hücresel yenilenme ve farklılaşma işlemi olup, testis kök hücreleri olan Tip A spermatogoniyanın farklılaşması ile başlayarak spermatid oluşumu ile sonlanır. Spermiyogenez olarak adlandırılan matürasyon işlemiyle bu spermatidler seminifer tübül lümenine spermatozoa olarak atılır. Spermatogenez, puberte ile birlikte başlamasına rağmen, bu olay için ilk adımlar fetal yaşamda atılır.

Embriyonik dönemde, epiblast'tan köken alan primordiyal germ hücreleri (PGH), gonad taslağında ilk farklılaşmasını geçirdikten sonra, erkek bireylerde gonosit, dişi bireylerde ovogonya olarak adlandırılır. Daha sonra, Sertoli hücreleri ve peritübüler myoid hücreler, gonositleri çevreleyerek primitif testiküler kordonları oluşturur. Leydig hücreleri ise interstisiyel alanda kalır. Primitif kordonlar içerisinde bir süre çoğalmasını sürdüren gonositler, ardından mitotik olarak inaktif oldukları dinlenme dönemine girer ve doğum sonrasına kadar bu durumlarını korurlar. İnsanlarda puberte ile birlikte, farelerde doğumun hemen ardından, sıçanda ise doğumdan 4-5 gün sonra, dinlenme dönemindeki gonositler, mitotik çoğalmalarına yeniden başlayarak spermatogenezin ilk dalgasını başlatırlar. Seminifer tübüllerin periferinde yerleşik olan ve yetişkinlik döneminde testis kök hücre popülasyonunu oluşturan spermatogoniyal kök hücreler, mitotik bölünmelerle çoğalarak bir taraftan kendilerini oluştururken diğer taraftan yönelmiş (farklılaşmış) spermatogoniyaları oluştururlar. Farklılaşmış spermatogoniyalar, bir seri mitotik ve mayotik bölünmenin ardından spermiyogenez olayı ile olgunlaşmalarını tamamlayarak sperm hücrelerini oluşturur.

Carcinoma İn Situ (CIS) olarak adlandırılan hücrelerin, olgunlaşmasını normal olarak tamamlayamayan gonositlerden köken aldığı belirtilmekte ve yetişkinlik döneminde ortaya çıkan testiküler kanser ile ilişkilendirilmektedir. CIS hücreleri ile gonositler arasındaki morfolojik ve ultrastrüktürel benzerlikler, CIS hücrelerinin, gonositler tarafından eksprese edilen embriyonik dönem proteinlerini eksprese etmesi, bu hücrelerin gelişimlerini tamamlayamayan gonositlerden köken alabileceklerini göstermektedir. CIS hücreleri, embriyonik döneme ait genleri/proteinleri yüksek derecede eksprese ettiğinden, bu hücreler yetişkin testisinde yeniden programlanarak seminom veya non-seminom teratomlara farklılaşabilmektedir (1).

İlk olarak sirke sineği *Drosophila*'da keşfedilen Hedgehog (Hh) sinyal yolağı memelilere kadar uzanan canlıların embriyonik gelişimlerinde rol oynar (2). Embriyonik dönemde hücre çoğalmasını, farklılaşmasını ve hücre canlılığının korunmasını sağlayarak birçok değişik dokunun embriyonik gelişiminde önemli rol oynar. Hh sinyal yolağının görevleri, embriyonik dönemle sınırlı olmayıp yetişkin

dönemde de kök hücrelerin çoğalmasında ve farklılaşmasında rol alarak doku fonksiyonuna katılır (3).

*Drosophila*'da sadece bir *Hh* geni bulunurken, memelilerde 3 tane homoloğu vardır: Sonic Hedgehog (Shh), Indian Hedgehog (Ihh) ve Desert Hedgehog (Dhh). Her bir Hh geninin ekspresyonu, gelişimsel olarak düzenlenir ve farklı Hh genleri farklı dokuların oluşumuna katılır (4-6). Dhh, memeli testisinde eksprese olur ve spermatogenezin düzenlenmesinde rol oynar. Testisteki Dhh mRNA'si ilk olarak, *Sry* ekspresyonunu takiben, embriyonik gün (E) 11.5'de Sertoli hücrelerinde gözlenir, yetişkinlik döneminde de ekspresyonunu sürdürür (6).

Dhh geni çıkarılmış (knock-out) erkek farelerin testislerinde, seminifer tübüllerin düzensiz ve bazal laminanın kesintili olduğu, olgunlaşmasını tamamlayamamış peritübüler myoid hücre, Leydig hücresi ve Sertoli hücrelerine rastlandığı, ayrıca, seminifer tübüllerde çok az sayıda germ hücresi bulunduğu ve bunların anormal morfolojik yapı göstererek testiküler kordonların dışında yerleşik olduğu belirtilmektedir (6). Dhh sinyal yolağının, yetişkin fare testisindeki spermatogenezde de rol oynadığı gösterilmiştir; Dhh'nin transkripsiyon faktörü olan Gli1'i aşırı eksprese eden transgenik erkek farelerin seminifer tübüllerinde, germ hücre gelişiminin pakiten spermatosit aşamasından ileriye gidemediğini ve bu farelerin infertil olduğu belirtilmiştir (7).

Dhh ligadının, fetal dönemde Sertoli hücrelerinde eksprese olması ayrıca, bu sinyal yolağında meydana gelen bozuklukların yetişkin spermatogenezini tahrip etmesi, Hh yolağının, gelişmekte olan ve yetişkin testisinde spermatogenezini düzenleyebileceğini dahası testiküler kök hücrelerde eksprese olarak bu hücrelerin proliferasyon ve farklılaşma olaylarını düzenleyebileceğini düşündürmektedir. Eğer bu yolak, farklı dönemlerdeki testiküler kök hücrelerin fonksiyonlarını düzenliyorsa, bu yolakta meydana gelebilecek herhangi bir hasarın anormal spermatogenezle ilişkilendirilebileceğini, CIS hücrelerinin oluşumuna katkı sağlayabileceğini düşünmekteyiz. Bu nedenle, Desert Hedgehog sinyal yolağının anormal spermatogenez ve testiküler kanser oluşumundaki rolü araştırıldı.



## GENEL BİLGİLER

### 2.1. Memelilerde Testis Gelişimi

Testis dokusunda, germ hücre gelişimi, embriyonik gelişimin erken döneminde başlayarak yetişkinlik dönemine kadar devam eden ve birçok hücrel farklılaşma aşamasını içeren bir olgunlaşma sürecidir. Bu tezin ilerleyen bölümlerinde, memeli testisinin genel yapısı ayrıca, fetal, juvenil ve yetişkin kemirgen gonadında germ hücre olgunlaşması anlatılacaktır.

#### 2.1.1. Memeli Testisinin Genel Yapısı

Yetişkin testisi, fonksiyonel olarak birbirinden farklı iki bölge içerir; interstisyum ve seminifer tübüller (8). İnterstisyumda, kan ve lenfatik damarlar, androjenlerin ve diğer bazı steroidlerin üretiminden sorumlu Leydig hücreleri ve makrofajlar bulunur (9). Seminifer tübüller (Şekil 2.1.1.1), yoğun olarak kıvrıntılı bir morfoloji sergilemekte ve gelişmekte olan germ hücrelerini ve bu hücrelerin gelişimini destekleyen epitelyal hücre soyundan gelen somatik Sertoli hücrelerini içerir (9). Bu tübüller, germ hücre olgunlaşmasının gerçekleşebilmesi için Şekil 2.1.1.1’de gösterildiği gibi oldukça düzenli bir hücrel yapıya sahiptir. Her bir Sertoli hücresi, tübülün kaideye yakın bölgesinden iç boşluğuna kadar uzanır. Bu hücreler, hem kendisine komşu olan Sertoli hücresiyle hem gelişmekte olan germ hücreleriyle sıkı bağlantı (tight junction) ve oluklu bağlantılar (gap junction) yapar (10). Bu bağlantılar, seminifer tübül epitelinin bazal ve adluminal bölgelere ayıran kan-testis bariyerini oluşturur ve post-mitotik germ hücrelerinin tübül içerisinde gelişimi için eşsiz bir mikroçevre oluşturur. Sertoli hücrelerinin sitoplazması ile kontakt halinde olan hücreler germ hücreleridir. Bu hücreler, seminifer tübüllerde olgunlaşma aşamalarına göre tabakalanır:

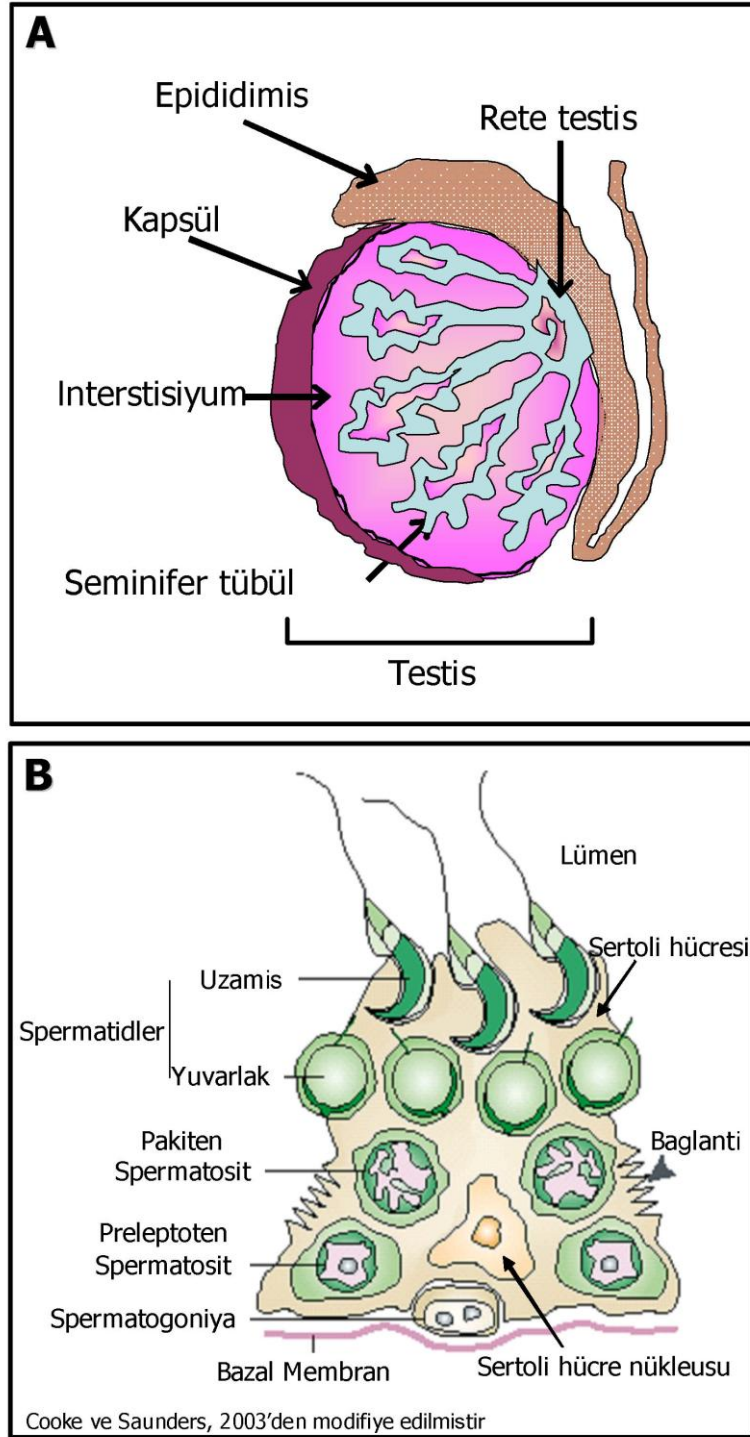
Mitotik spermatogonyum, seminifer tübüldeki en az farklılaşma geçirmiş (en az olgun) hücre olup bazal membrana yakın yerleşir ve seminifer epitelin bazal bölümünde bulunur.

En olgun germ hücreleri adluminal bölümde yerleşir; mayotik spermatositler, tübülün kaideye yakın bölgesine yerleşirken yuvarlak ve uzamış haploid spermatidler tübül lümenine yakın yerleşirler (9) (Şekil 2.1.1.1).

Sertoli-germ hücre mikroçevresi, bazal lamina ve peritübüler myoid hücreleri ile sarılıdır.

Yetişkin testisinde seminifer tübüller, sperm hücresi üretimi için özelleşmiş yapılardır. Yukarıda tarif edilen düzen, embriyonik gelişimin erken basamaklarında başlayan olaylar zincirinin sonucudur. Devam eden bölümlerde, testis farklılaşmasının

başlangıç basamakları derlenecek, embriyoda başlayan ve doğum sonrası testiste devam eden germ hücre olgunlaşması özetlenecektir.

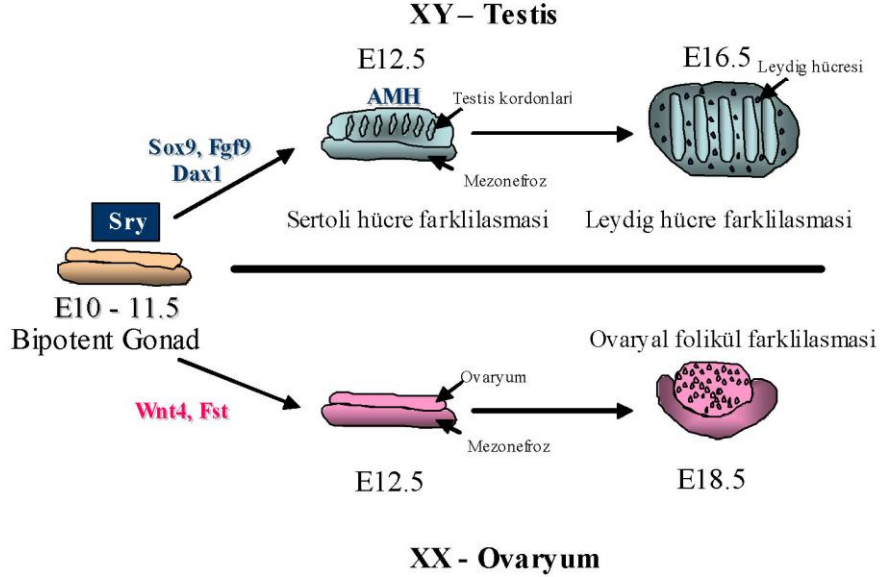


Şekil 2.1.1.1. Kemirgen testisi yapı ve organizasyonu.

### 2.1.2. Fötal Kemirgen Gonadındaki Olaylar

Farelerde fötal gonad, embriyonik gün (E) 9-10 arasında, her bir mezonefroz'un yüzeyinde ventrolateral bir kalınlaşma olarak belirir (11). Fötal gonad, gelişiminin erken dönemlerinde bipotent potansiyele sahip olup testis veya ovaryum yönünde farklılaşabilir. Memelilerde, bipotent gonadın testise farklılaşması, E10.5'de Y kromozomu üzerinde bulunan *Sry* (Sex Determining Region on Y Chromosome) geninin somatik hücrelerde ekspresyonuyla belirlenir (12-15). *Sry* ekspresyonu, yaklaşık 48 saat boyunca devam eder (16) ve somatik hücrelerin öncü-Sertoli hücrelerine farklılaşmasını yönlendirir (Şekil 2.1.2.1). Bu hücreler, germ hücrelerinin etrafında toplanır ve ikisi birlikte testiküler kordonları oluştururlar (11). Özetle, gonadların "erkek cinsiyeti" yönünde farklılaşabilmesi için *Sry*'nin ekspresyonunu şarttır.

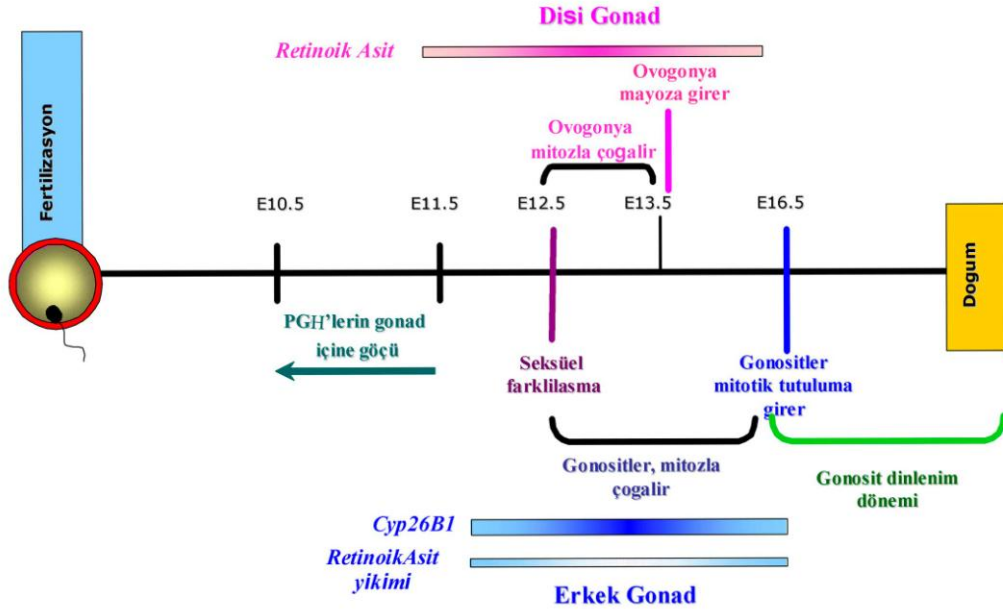
Testis gelişiminde gerekli olan diğer bir gen ise *Sox9*'dur. *Sox9*, yapısal olarak *Sry*'ye benzer bir proteini kodlar ve öncü-Sertoli hücrelerinin anti-Müllerian hormon (AMH) ekspresyonunu düzenler (17). AMH, dişi üreme kanallarının baskılanmasını (18) dolayısıyla erkek ürogenital kanalların gelişmesini sağlar. XX kromozomlu dişi gonadında, Y kromozomunun olmaması ve somatik hücrelerinde *Sry* ekspresyonunun bulunmaması nedeniyle, bu bireylerdeki somatik hücreler granüloza hücrelerine farklılaşır (Şekil 2.1.2.1).



Şekil 2.1.2.1. Farede bipotent gonadın cinsiyet farklılaşması.

Primordiyal germ hücreleri (PGH), farede, yaklaşık E6.5'de primitif ektoderm/epiblasttan farklanmaya başlar (19). İlk olarak, E7'de alkalın fosfataz ve diğer bazı özel antikor boyanmalarıyla gözlenebilir (20, 21). Bu günden sonra PGH'ler bir yandan mitoz ile çoğalmaya başlarken diğer yandan genital kabarıntı bölgesine doğru göç ederler. 4 gün süren göçleri, gastrulasyon esnasında arka bağırsağın invaginasyonu ile pasif olarak başlar ve daha sonra aktif olarak devam eder (22). PGH'lerin çoğalma ve göç etme olaylarında bir tirozin kinaz reseptörü olan c-kit ve bunun ligandı olan Kök Hücre Faktörü (Stem Cell Factor; SCF) görev alır (23). Bu genlerde meydana gelen herhangi bir mutasyon farede, *white-spotting* (W) ve *Steel* (st) olarak adlandırılır ve her iki mutasyonda da anormal PGH matürasyonu gözlenir (24, 25). Farelerde, st lokusunun mutasyonu (SCF protein üretiminin durması) PGH'lerin göç etmesini tamamen durdururken, c-kit mutasyonu, göç eden PGH sayısını azaltmaktadır. E11'de PGH, farklılaşan gonadlarda kolonize olmaya başlar ve çoğalmalarını sürdürürler.

PGH'nin cinsiyet farklanması, göç ettikleri gonadın somatik mikroçevresi ile kontrol edilir. Gelişmekte olan gonadlarda bulunan PGH bipotenttir ve bu özellikleri yaklaşık E11.5'e kadar devam eder (26). Bu günden sonra PGH iki yönden birisine farklanırlar; 1) dişi yolak; burada PGH'ler ovaryum içerisinde mayoza girerler veya 2) erkek soma hücreleri ile çevrelenerek mayoza girmeleri engellenir ve kısa bir süre daha çoğaldıktan sonra mitotik tutuluma girerler (22) (Şekil 2.1.2.2). Mezonefrozda üretilen retinoik asit'in, PGH'nin cinsiyetinin belirlenmesinde birincil düzeyde yönlendirici olduğu düşünölmektedir (27, 28). Dişilerde, ürogenital kabarıntı bölgesinde bulunan germ hücrelerinin mayoza yönelmesi, *Stra8* tarafından eksprese edilen retinoik asit ile düzenlenir (27, 28). Bu hücreler, mayozun I. Profazını tamamladıktan sonra E17.5'de diploten basamağında tutuluma girerler ve doğumdan hemen sonra diploten basamağını tamamlarlar (29, 30). Testiste ise retinoik asit, Cyp26B1 enzimi tarafından yıkıma uğrattılır (27, 28) ve bundan sonra PGH gonosit olarak adlandırılır. Gonositler, E16.5-E17'ye kadar çoğalmalarına devam eder ve sonrasında mitotik olarak sessiz oldukları bir döneme girerler (31) (Şekil 2.1.2.2).



Şekil 2.1.2.2. Fötal fare gonadında cinsiyet farklılaşması.

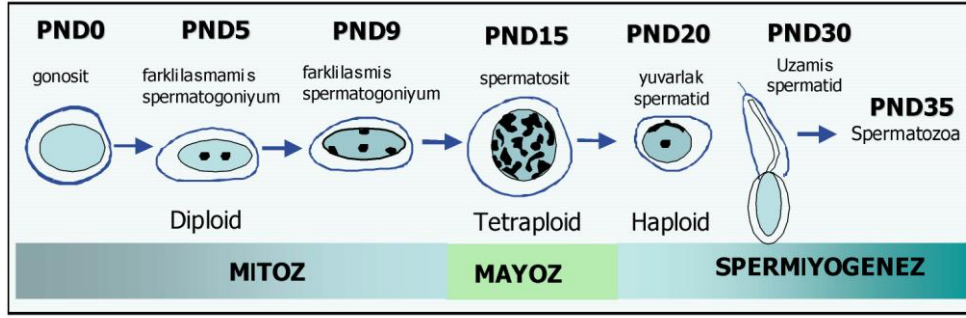
### 2.1.3. Doğum Sonrası Kemirgen Testisindeki Olaylar

Doğum sonrası gonositler tekrar hücre siklusuna girer ve seminifer kordonların bazal membranına doğru göç ederler. Bu dönemde gonositler, farklılaşmamış spermatogoniya olarak adlandırılır ve spermatogenezin ilk dalgası başlar. Spermatogenezin ilk dalgasının başlamasıyla, testiste farklı germ hücre tipleri ilk defa görülür. Spermatogenezin ilk dalgası kabaca 3 faza ayrılır;

- 1) spermatogoniyal kök hücrelerin ve farklılaşan spermatogoniyanın mitoz ile çoğalması,
- 2) spermatositlerin mayozu,
- 3) spermiyogenez; yuvarlak, haploid spermatidlerin spermatozoayı oluşturmak üzere morfolojik olarak farklılaşması.

Şekil 2.1.3.1'de, spermatogenezin ilk dalgası şematize edilmiştir. Bu şekil, postnatal günlerde (PND) mevcut olan hücre tiplerini göstermektedir.

Bundan sonraki bölümde memeli testisinde bulunan germ hücre tipleri anlatılacak ve gelişimlerinin nasıl düzenlendiği açıklanacaktır.



**Şekil 2.1.3.1.** Spermatogenezin ilk dalgası. Doğumdan sonra gonositler mitozla çoğalmalarını devam ettirir ve bazal membrana göç ederek spermatogonyum haline gelir. Birçok defa mitotik bölünmeden sonra spermatogonyum mayozla girer ve spermatositi oluşturur. Primer spermatosit, mayoz I bölünmesiyle devam ederek sekonder spermatositleri oluşturur. Mayoz II'nin tamamlanmasından sonra sekonder spermatositler haploid spermatidleri oluşturur. Haploid spermatidler, uzamış spermatidleri oluşturmak için morfolojik bir değişim geçirirler. PND: postnatal gün.

#### 2.1.4. Spermatogoniya

Doğum sonrası dönemde, testis dokusunda mitotik bölünme ile çoğalan germ hücreleri spermatogoniya olarak adlandırılır. Bu hücreler, yetişkin yaşamı boyunca testiste germ hücre popülasyonunun yenilenmesi ve varlığı için çoğalmak durumundadır. Spermatogoniyalar üç kategoride sınıflandırılır; Tip A, İntermediyet ve Tip B (32). Tip A farkedilasmamı s spermatogoniya, kendi kendini yenileyebilen spermatogoniyal kök hücre tipi olup, tek bir hücre ya da A single ( $A_s$ ) olarak adlandırılır (32). Tip A spermatogoniyalar bölünerek kendilerini çoğaltıkları gibi diğer taraftan A paired ( $A_{pr}$ ) ve A aligned ( $A_{al}$ ) gibi diğer tip spermatogoniyaları da oluşturur.  $A_{pr}$  ve  $A_{al}$  gibi spermatogoniya tipleri sitoplazmik köprüler aracılığı ile birbirleriyle bağlantı halindedir (8). Hücreler arasındaki bu sitoplazmik köprüler, spermatogenez boyunca varlığını sürdürür ve kardeş germ hücreleri arasında mRNA'ların ve proteinlerin hareketini sağlar (33).  $A_{al}$  spermatogoniya, mitotik çoğalmanın interfaz basamağında bir farkedilasma geçirerek  $A_1$  spermatogoniyaya farklanır (32).  $A_1$  spermatogoniya, 5 kez ard-arda mitoz geçirdikten sonra preleptoten primer spermatositleri oluşturur ve daha sonra sırasıyla  $A_2$ ,  $A_3$ ,  $A_4$ , İntermediyet (In) ve Tip B spermatogoniyaya farklanır. Preleptoten primer spermatositlerler daha sonra mayozla girer (9). Spermatogoniyalar her zaman seminifer tübüllerin bazal membranı ile fiziksel kontakt (bağlantı) halindedir (8) (Şekil 2.1.1.1.) ancak, hücrelerin farkedilasma sırasında bu fiziksel kontakt azalır.  $A_s$  spermatogoniyadan  $A_{al}$  spermatogoniya'ya doğru gelişen hücreler, bazal lamina ile yüksek derecede kontakt yaparken Tip B spermatogoniyadan preleptoten spermatogoniyaya gelişen hücrelerin bazal membran ile teması tamamen kopar (34).

Yakın zamanda yapılan bir çalışmada (35), puberte öncesi kemirgen testisindeki gonositlerin spermatogoniyaya farkedilasma sırasında önemli bir ayrıntı keşfedilmiştir. Doğum sonrasında hücre siklusuna tekrar giren ve bazal membrana doğru göç eden gonositlerin kaderleri, *neurogenin-3* (*Ngn3*) ekspresyon edip-etmemelerine göre değişmektedir; *Ngn3* ekspresyon etmeyen bir grup gonosit kendi-

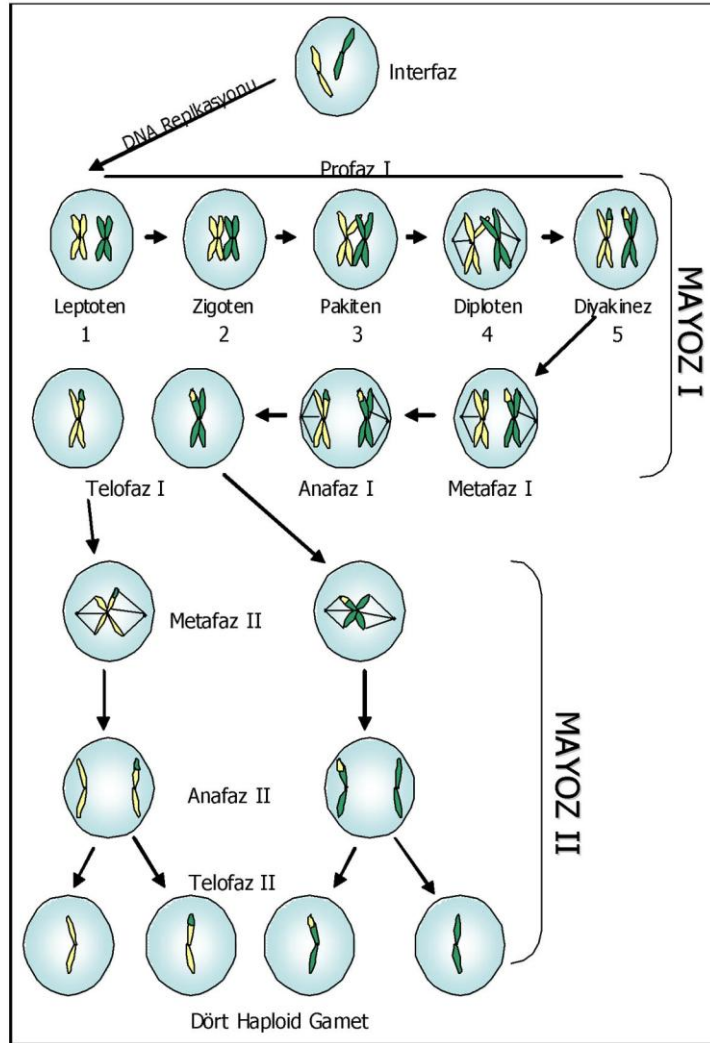
kendilerini yenileme basamağını atlayarak direkt olarak A<sub>1</sub> spermatogonyaya farklılaşmaktadır. Bu germ hücreleri, spermatogenezin ilk dalgası boyunca ilerler ve matür spermatozoa'yı oluşturur. *Ngn3* eksprese eden gonositler ise kendi-kendilerini yenileme potansiyeline sahip ve sperm üretiminin devamlılığını sağlayan hücreler olan farklılaşmış spermatogoniyaları oluşturur (35).

Embriyonik germ hücre gelişimini kontrol eden eden iki kritik faktör c-kit/SCF ve retinoik asit (Bölüm 2.1.2.'de anlatılmıştır), spermatogoniyal farklılaşmayı da kontrol eder. Sertoli hücrelerinde bulunan SCF proteini ile spermatogoniyada bulunan c-kit proteini, spermatogoniyal hücre farklılaşmasının kontrolünde önemli role sahiptir (23, 36). Spermatogoniyalarda c-kit/SCF sinyalinin durdurulması, Tip A<sub>1-4</sub> spermatogoniyal hücre çoğalmasının bozulmasına neden olur (23, 37) ve spermatogoniyal hücrelerin apoptozla ölüm oranını artırır (38). Retinol (Vitamin A) ve retinoik asit, spermatogoniyal farklılaşmanın anahtar düzenleyicilerinden birisidir. Retinoik asit sinyali, farklılaşmamış spermatogoniyanın A<sub>1</sub> spermatogoniyaya geçişinde önemli rol oynadığından, Vitamin-A hasarlı fare testislerinde, sadece Tip A farklılaşmamış spermatogoniyalar bulunur (39). Retinoik asit sinyal yolağına ait nükleer retinoik asit reseptörlerinin, hem Sertoli hücrelerinde hem de spermatogoniyada eksprese olması da bu yolağın bu hücre tiplerinde aktif olduğunu gösterir.

Spermatogoniyal farklılaşmayı kontrol eden diğer bir mekanizma ise hormonal regülasyondur. Sıçanlarda, normal spermatogenez sırasında, follikül stimüle edici hormon (FSH) ve testosteron sinerjistik olarak bu olayı yönlendirir (40, 41). Radyasyona maruz bırakılan sıçan testisinde, hem testosteron hemde FSH'in spermatogoniyal farklılaşmayı durdurduğu gösterilmiştir (42). Hem FSH hem de intratestiküler testosteron düzeyleri yüksek olan bu sıçanların testisinde, sadece Tip A spermatogoniyalar bulunur (43). Bu patolojik modelde, FSH ve testesteron düzeylerinin baskılanmasıyla spermatogoniyal farklılaşmanın tekrardan stimüle edildiği gözlenmiştir (43). Tüm bu sonuçlardan görüldüğü gibi spermatogoniyal matürasyon, gen ekspresyonunda değişiklikleri tetikleyen birçok bütünleşmiş faktör tarafından kontrol edilmektedir.

### **2.1.5. Spermatisitler**

Spermatisitler, mayoz olarak adlandırılan özelleşmiş hücre bölünmesi geçirirler (Şekil 2.1.5.1.). Bu bölünme, testiste ve ovaryumda bulunan germ hücrelerine özel bir bölünme şekli olup diploid gametten haploid gamet oluşumunu sağlar. Mayoz iki fazda incelenir. Birincisi, homolog kromozomların eşleşmesi ve rekombinasyonu, ikincisi ise kardeş kromatidlerin ayrılmasıdır (44).



**Şekil 2.1.5.1.** Mayoz hücre siklusunun basamakları. Kromozomlar, Profaz I'e girmeden önce replike olurlar. Profaz I, 5 alt basamağa ayrılır: 1) leptoten, 2) zigoten: kromozomlar yoğunlaşmaya ve eşleşmeye başlar, 3) pakiten: rekombinasyon gerçekleşir, 4) diploten: kromozomlar rekombinasyon bölgesinde bir araya gelir ve 5) diyakinez: kromozomlar ayrılır ve tamamen yoğun hale gelir. Bundan sonraki aşama metafaz I ve anafaz I'dir. Burada homolog kromozomlar birbirlerinden ayrılarak hücrenin karşı kutuplarına yerleşir. Telofaz sırasında oluşan iki kardeş hücre hızlıca mayoz II'ye başlar. Metafaz II ve anafaz II sırasında kardeş kromatidler birbirinden ayrılır ve hücrenin karşı kutuplarına gider. Mayoz hücre siklusu sonucu dört tane haploid gamet oluşur.



Fare testisinde, primer spermatositler ilk olarak PND15’de görülür ve bazal membran ile ilişkisini koparan Tip B spermatogoniyadan köken alır (8). Bu hücreler ilk önce preleptoten spermatositler olarak adlandırılır. Preleptoten spermatositler, DNA’sını replike eden son germ hücreleridir (45). DNA sentezi tamamlandığında preleptoten spermatositler mayozun profaz I’ine girer ve artık leptoten spermatositler olarak adlandırılır (9). Preleptoten spermatositlerin, leptoten spermatosite farklanması, bu hücrelerin Sertoli hücreleri arasından geçerek bazal membrandan uzaklaşması ve seminifer tübüllerde intermediyet kompartıman olarak adlandırılan 3. bir kompartıman oluşturması ile karakterizedir (9). Bu göç olayı sırasında, germ ve Sertoli hücreleri arasındaki bağlantı komplekslerinin kırılması ve yeniden yapılması söz konusudur.

Memeli kemirgenlerinde mayotik profaz I, doğum sonrası yaklaşık 3. haftada sonlanır. Mayotik profaz I, spermatositlerde gerçekleşen kromatin değişiklikleri göz önüne alınarak beş faza ayrılır; leptoten, zigoten, pakiten, diploten ve diyakinez (Şekil 2.1.5.1) (44). Profaz I sırasında homolog kromozom rekombinasyonu da gerçekleşir. Bu olayda çift zincirli DNA’da kırıklar oluşur ancak eşleşen kromozomlar arasındaki DNA değiş-tokuşuyla DNA zincir tamiri gerçekleşir (46). Mayoz bölünmeye özgü olan bu değiş-tokuş olayı sinoptenamel kompleks (SC) tarafından kontrol edilir (44, 47).

Mayotik profazın ilk fazı olan leptoten, iplik-benzeri kromozomların oluşumuyla başlar (8). Zigoten fazında homolog kromozomların eşleşmesi görülmeye başlar ve SC oluşur (sinaps). Ayrıca hücrelerde kromatin kalınlaşması da zigoten fazıyla karakterizedir (45). Burada görev alan üç önemli SC proteini; SYCP1, SYCP2 ve SYCP3’ dür. Tüm bu proteinler “fermuar” yapısında yer almakta ve rekombinasyonun gerçekleşmesi için iki homolog kromozomu birbirine yakın olarak tutmaktadır. Bu proteinler, kromozom yoğunlaşması (kondenzasyon) ve sinapsis olaylarında da görev alırlar (44). Pakiten hücrelerinde, kromozomlar tamamen sinaps yapmış ve SC oluşumu tamamlanmıştır (47). Rekombinasyonun gerçekleştiği ve hücrelerin hızlı bir şekilde büyüme gösterdiği faz olan pakiten, memelilerde yaklaşık bir hafta sonunda tamamlanır (9). Diploten, rekombinasyonun olduğu, kiazmata bölgelerinin görüntülenebildiği, SC kompleksinin birbirinden ayrılmaya başlayarak sadece rekombinasyonun olduğu bölgelerde kontağın kaldığı fazdır (44). Profaz I, diyakineze sona erer. Diyakinez, kromatinlerin ileri derecede kondanse olduğu ve kromozom ayrılmasına hazırlık olarak kiazmatanın serbestlendiği fazdır (45).

Erkeklerde, homolog kromozomların mayotik eşlenmesi dişilerden farklılık gösterirler. Erkek diploid germ hücreleri, 22 çift homolog otozom ve X-Y seks kromozomlarını taşır (XY, bivalent). Profaz I sırasında, seks kromozomları genellikle eşleşmemiş olarak kalır. Rekombinasyon sadece pseudootozomal bölgelerde (bu iki kromozomun eşleştiği) kalmaktadır (44). XY bivalent, pakiten ve metafaz arasında transkripsiyonel olarak inaktif olup XY bodayı yapmak için heterokromatin yapısında belirgin değişiklikler yapar (48). XY bodi, spermatositlerin nükleusuna özgüdür ve mayotik bölünmenin ilerlemesi için gereklidir (49).

Profazı takip eden metafaz aşamasında homolog kromozomlar, iğ iplikçiklerine tutunurlar ve anafaz aşamasında hücrenin karşıt kutuplarına yerleşirler

(50) (Şekil 2.1.5.1.). Telofaz sırasında, her biri iki kromatid içeren haploid kromozomlu iki kardeş hücre meydana gelir ve bu hücreler, hücrelerarası köprülerle halen birbirlerine bağlıdır (45).

Birinci mayozun profazı tamamlandıktan sonra sekonder spermatositler oluşur. Testiste, mayoz II çok hızlı bir şekilde gerçekleşen bir olay olduğundan bu hücreler kısa ömürlü hücrelerdir. Sekonder spermatositler adeta mitozu taklit ederler; kardeş kromatidler iğ iplikçikleriyle birbirlerine tutunurlar ve metafaz-anafaz II sırasında hücrenin karşıt kutuplarına yerleşirler (8). Mayoz II sonunda oluşan en son ürün, spermatid olarak adlandırılan 4 adet haploid gamettir.

Mayoz sırasında meydana gelebilecek herhangi bir mutasyon germ hücre soyu boyunca kalıtıldığından mayoz hücre bölünmesi sıkı bir şekilde kontrol edilir. SC, mayozun kontrolünde büyük önem taşır; çift zincirli DNA'nın rekombinasyonu ve tamirini kontrol eden hücre siklusu düzenleyici proteinler için yerleşim bölgesidir (44). Hücre siklusunda checkpoint noktalarının kontrolü, mayozun düzgün ilerlemesi için gereklidir ve mitozda olduğu gibi siklinler ve siklin bağımlı kinazlar (cdks) ile kontrol edilir. Mayoz için önemli olan iki düzenleyici cdk2 ve siklin A1 dir. *cdk2* geni olmayan erkek farelerde, spermatositler pakiten fazına kadar ilerlemekte ancak bu hayvanların testislerinde diploten spermatosit görülmeyip SYCP3 dağılımı bozulmaktadır (51). Siklin A1, germ hücre özellikli bir siklin olup mayoz I de profazdan metafaza geçişi düzenler (52). Bu proteini eksprese etmeyen mutant hayvanların testislerinde spermatositler, metafaz geçişinde tutuluma uğrar ve bu hayvanlar infertil bir fenotip sergiler.

### 2.1.6. Spermatidler

Yuvarlak spermatidler, kemirgen testisinde ilk olarak PND20'de görülür. Spermatidler, spermiyogenezin habercisidir. Spermiyogenez, yuvarlak ve haploid olan spermatid'in olgun spermatozoaya farklılaşmasıdır. Spermiyogenez sırasında 5 farklı işlem gerçekleşir; 1) akrozom oluşumu 2) nüklear yoğunlaşma ve uzama 3) kuyruk (flagellum) gelişimi 4) sitoplazmanın tekrardan organizasyonu 5) spermiyasyon (45).

Akrozom, spermatozoanın ovosite penetrasyonu sırasında gerekli olan enzimleri içerir (8). Akrozom, Golgi kompleksi tarafından üretilen küçük proakrozomal veziküllerin bir araya gelerek yuvarlak, membran-bağımlı vezikül haline gelmesiyle oluşur (9). Akrozom daha sonra, spermatid hücre nükleusu ile fiziksel olarak ilişkiye girer ve yassılaşıp spermatidlerin ön yarısını kaplar (45). Nükleusun spermatid yüzeyine hareketiyle birlikte akrozomda hücre membranıyla yakın ilişkiye geçer (9). Bu olay, spermatidlerin polarize olmasını sağlar; baş (ön kısım bölgesi) ve kuyruk (flagellum) bölgesi oluşur.

Spermatidlerde nükleusun pozisyon değiştirmesi dışında, kromatin de kademeli olarak kondenzasyona uğrar ve şekil değiştirir (9, 45). Bu yeniden organizasyon sırasında histonlar, protaminler olarak bilinen küçük nükleozom proteinleri ile yer değiştirir. Histonların protaminlerle yer değiştirmesi, kademeli bir

işlem olup ilk önce, histonların tranzisyon proteinleri (TP) ile daha sonra da bunların protaminlerle yer değişimi söz konusudur. Kromatin yeniden modellenmesi sayesinde spermatid DNA'sı çok küçük hacimde paketlenir (somatik hücre nükleusunun 1/20'si kadar) (53). Protamin genlerinden herhangi birisine sahip olmayan erkek farelerde, spermin nüklear yoğunlaşması tahrip olur (54). Günümüzde, spermatidlerde histonların yerdeğiştirme mekanizması henüz tam olarak anlaşılammış olmasına rağmen bu olayın düzenlenmesinde,  $Ca^{+2}$ /Calmodulin-bağımlı protein kinaz IV'ün (CaMKIV) direkt bir rol oynadığı bilinmektedir (45, 55).

Spermatidlerde, kromatinin yeniden düzenlenmesinin ardından transkripsiyon durur. Transkripsiyonun durmasından önce mRNA'lar spermatidlerde depo edilir ve daha sonra bu depo mRNA'ların kullanılmasıyla birlikte protein translasyonu gerçekleşir. Bu olay translasyonel gecikme olarak adlandırılır (56). Mayozdan sonra ve spermatid kondenzasyonundan önce, büyük miktarda mRNA transkripte edilir ve messenger ribonükleoprotein parçacıkları (mRNP) olarak depo edilir. mRNP'ler daha sonra uzamış spermatidlerde translasyona uğrattılır (56). Ayrıca, spermatositlerde ve yuvarlak spermatidlerde, mRNA depolanmasını kolaylaştırmak amacıyla çok miktarda RNA-bağlayıcı protein üretilir. Bu RNA-bağlayıcı proteinlerin en önemlileri TRAX ve TB-RBP'dir.

Sperm kuyruğu (flagellum)'nun gelişimi, haploid erkek germ hücrelerinde başlar. Spermatid sitoplazmasının periferinde bulunan bir çift sentriyol, flagellum oluşumunun başlamasından sorumludur (45). İki sentriyolden birisi, 9+2 şeklinde düzenlenme gösteren mikrotübül yapısındaki Aksonem'i yapar. Mikrotübüllerin aksonem yapısına eklenmesiyle beraber flagellum, seminifer tübül lümenine uzanmaya başlar. Mikrotübül organizasyonunu başlatan sentriyol çifti daha sonra spermatid nükleusuna doğru hareket eder ve en sonunda akrozomun karşıt kutbunda nükleusa yapışır (9). Aksonem uzamaya devam eder ve aksiyal filamanı oluşturur (57).

Flagellar gelişim, yapısına aksesuar bileşenlerin eklenmesiyle tamamlanır ve kuyruğun farklı segmentleri oluşur; orta, esas (principal) ve son parça (57).

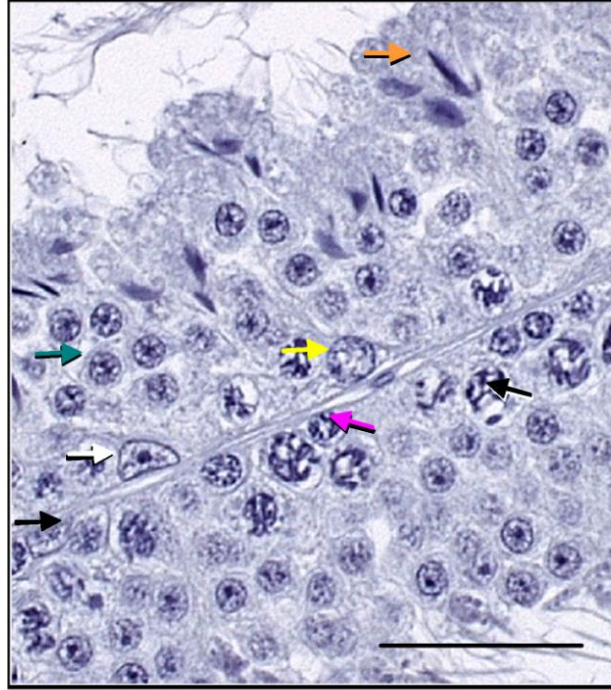
Spermatidlerdeki yeniden-şekillenmede, kuyruk oluşumu dışında, sitoplazma içeriğinin büyük kısmınının atılması da söz konusudur. Bu olay sonrasında, daha küçük ve kendi genetik bilgisini etkili bir şekilde ovosite aktaracak olan hücre soyu ortaya çıkar (9). Sitoplazmanın yeniden organizasyonu sırasında spermatidler kendi orijinal hacimlerinin %25'ine kadar küçülür (58). Bu olayda, nükleus ve sitoplazmadaki suyun eliminasyonu, bazı sitoplazmik kısımların uzayan spermatidlerden atılması (59) ve sperm salınımı sırasında rezidual cisim olarak adlandırılan paketlenmiş sitoplazmanın atılması söz konusudur (60).

Spermiasyon, matür spermatozoanın tübül lümenine atılmasını tarif eder. Bu olay farede yaklaşık doğum sonrası 35.günde başlar (9). Memelilerde, geç spermatidler, tübül lümenine salınımlarından önce kademeli olarak Sertoli hücreleri

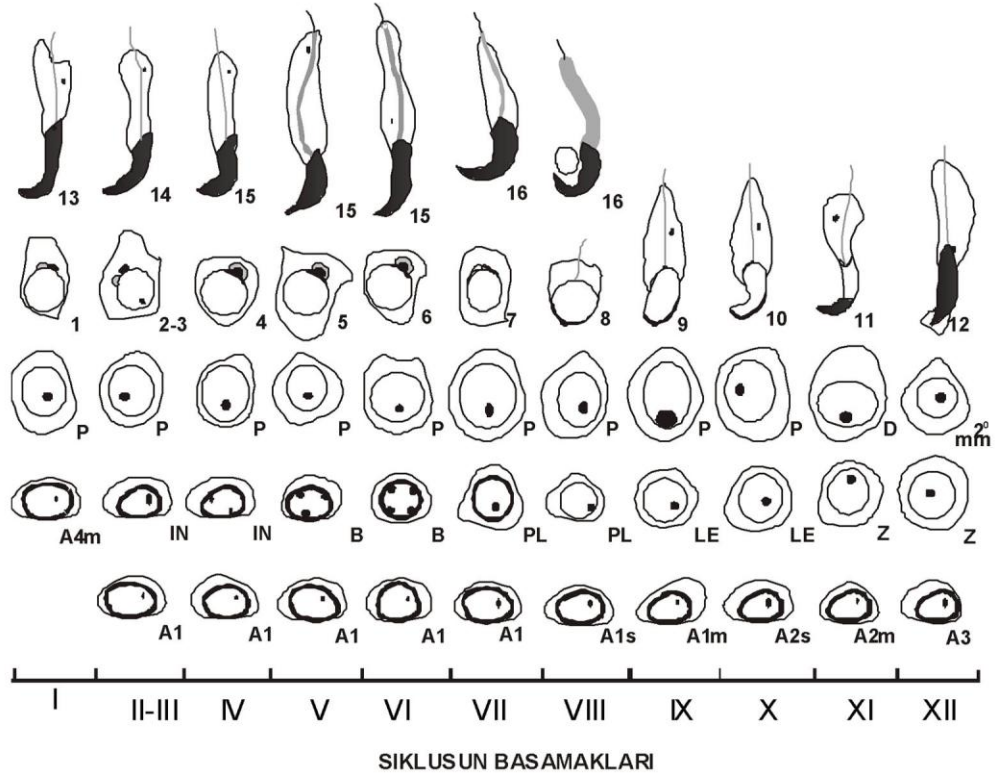
ile olan bağlantılarını kaybeder (45). Ancak bu olayı kontrol eden yegâne mekanizma henüz tam olarak aydınlatılamamıştır.

### 2.1.7. Yetişkin Kemirgen Testisi

Farelerde, PND35'den sonra, olgun spermatozoa devamlı olarak üretilir. Yetişkin testisinde, farklılaşmamış spermatogoniyadan spermatozoaya kadar olan farklı gelişim evrelerindeki hücreler yer alır. Spermatogenez olayında gelişimsel evreler sıkı bir şekilde takip edilir (Şekil 2.1.7.1.). Spermatogoniya, spermatosit ve spermatid popülasyonları her zaman bir arada görülür. Bu nedenle enine kesitteki her bir tübül, barındırdığı germ hücre çeşidine bağlı olarak sınıflandırılır (Şekil 2.1.7.2.). Seminifer tübüldeki bu siklus, olgun sperm üretimini garantiler.



**Şekil 2.1.7.1.** Yetişkin fare testisi enine kesiti. Değişik renlerdeki oklar, farklı hücre tiplerini belirtmektedir. Turuncu: uzamış spermatid; Yeşil: yuvarlak spermatid; Siyah: pakiten spermatosit; Pembe: leptoten spermatosit; Sarı: spermatogoniyum. Beyaz: Sertoli hücre nükleusu. Skala bar: 50  $\mu$ M.



**Şekil 2.1.7.2.** Seminifer tübül siklusunun basamaklandırılması. Yetişkin testisi germ hücreleri birbirleriyle “basamak (stage)” olarak bilinen belirli bir düzen ilişkisi içerisinde bulunurlar. Spermatogenik dalga, seminifer tübülün uzunluğu boyunca linear bir düzlemde bulunur. Yetişkin fare testisinde 12 tane basamak tanımlanmış olup aşağıda belirtilmiştir. A: Tip A spermatogoniya, 1-4, (m: M faz s: S faz), IN: Intermediate spermatogoniya, B: Tip B spermatogoniya, PL: preleptoten primer spermatozoid, LE: Leptoten primer spermatozoid, Z: Zygoten spermatozoid, P: Pakiten spermatozoid, D: Diploten spermatozoid, m2°m: Sekonder spermatozoid, 1-16: spermiyogenez basamakları boyunca bulunan spermatidler.

### **2.1.8. Kemirgen Testisinin Somatik Hücreleri**

Germ hücre gelişimi, Sertoli ve Leydig hücrelerini içeren birçok farklı somatik hücre tipi tarafından desteklenir. Sertoli hücreleri, germ hücre gelişimini direkt olarak desteklerken Leydig hücreleri, testiküler gelişim ve testis fonksiyonu için gerekli olan androjenlerin üretiminden sorumludur. Devam eden bölümlerde bu iki önemli somatik hücre tipi tanıtılacak ve bu hücrelerin spermatogenezin hormonal kontrolüne nasıl katıldıkları özetlenecektir.

#### **2.1.8.1. Sertoli Hücreleri**

Germ hücreleri, Sertoli hücreleri ile fiziksel temas ederek gelişimlerini tamamlar. Sertoli hücreleri, hem fetal hem de doğum sonrası testis gelişiminde germ hücreleri için bir destek görevi görür. Sertoli hücre öncülleri, kölomik epiteliyal hücrelerden köken alır. Bu hücreler, kölomik epitelin yüzeyinden ayrılarak genital kabarıntı bölgesine göç eder. Öncü-Sertoli hücreleri olarak adlandırılan bu hücreler, E11.5'de *Sry* ekspresye eder ve gelişmekte olan gonaddaki bipotent hücre soylarını erkek-özellikli farklılaşmaya yönlendirir ve testis gelişimine öncülük eder (61). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, öncü-Sertoli hücrelerinin prostaglandin D2 ürettiği (26) ve prostaglandin D2'nin reseptörüne bağlanmasıyla Sox9 ekspresyonunu stimüle ederek öncül hücreleri Sertoli hücre soyuna yönlendirdiği belirtilir (27). Gelişmekte olan erkek gonadlarda, PGH kolonizasyonundan sonra öncü-Sertoli hücreleri, germ hücrelerini çevreleyerek seminifer kordonları oluşturur ve PGH'nin spermatogenez yönünde farklılaşmasını sağlar.

Fetal dönem ve puberte öncesi dönem, Sertoli hücre gelişimi ve proliferasyonu için kritik bir süreçtir. Doğumla beraber Sertoli hücreleri, alçak prizmatik bir morfoloji sergiler, düzensiz bir orientasyon gösterir ve bazal membrana yakın bir konumda bulunur. İmmatür Sertoli hücreleri metabolik olarak aktif olup proliferasyon, aromataz aktivitesi, östrojen ve anti-Müllerian hormon salgılanması ve FSH'a maksimum düzeyde yanıt oluşturma gibi fonksiyonları gerçekleştirir. (62). Sertoli hücrelerinde şekil ve pozisyon değişimi, Sertoli hücreleri olgunlaşırken olmaktadır. Bu anda Sertoli hücreleri uzamakta, bazal membrana dikey bir konuma yerleşmekte ve sitoplazmasını uzatarak seminifer kordonun merkezine apikal olarak uzatmaktadır. Yeniden düzenleme sırasında Sertoli hücreleri, sıkı bağlantılar ve bağlantı kompleksleri de kurmaktadır (63). Bu hücreler, matürasyonları sırasında proliferasyon kapasitelerini yitirir ve spermatogenez destekleyebilecekleri fonksiyonlar kazanırlar (64). Sertoli hücrelerinin destek görevi görmesi ve ilettikleri çeşitli sinyaller, yetişkinlerde germ hücre farklılaşması, mayoz ve spermiogenez ve spermatogoniyal kök hücre havuzunun devamlılığı için kritik öneme sahiptir (65, 66).

Sertoli hücresi sıkı bağlantıları farede PND7 ile PND14 arasında yapılmakta ve böylelikle kan-testis bariyeri (BTB) kurularak mayotik ve post-mayotik germ hücreleri, lenf ve kan dolaşımında olan faktörlerden uzak tutulmaktadır. Tip B spermatogoniyal kök hücresinin pre-leptoten spermatozite farklılaşması sırasında germ hücrelerinin bazal kompartımandan adluminal kompartımana geçişi söz konusu olup, bu sırada BTB bütünlüğünde herhangi bir hasar oluşmamaktadır (67). Germ hücrelerinin sıkı bağlantı komplekslerinden geçişi sırasında bağlantı komplekslerinin

hızlı bir şekilde açılması ve pre-leptoten spermatositin göçünden sonra hızlı bir şekilde kapanması gerekmektedir (68). Seminifer tübüllerin bazal kompartımanında bulunan Sertoli ve germ hücrelerinden üretilen ve mikroçevreye salınan tümör nekroz faktör- $\alpha$  (TNF $\alpha$ )'nın Sertoli hücreleri arasındaki bağlantıları geçici süre yeniden yapılandırarak germ hücre göçünü sağladığı düşünülmektedir (69). Germ hücreleri BTB'yi geçtikten sonra, seminifer epitelinde tübül lümenine doğru hareketleri sırasında, Sertoli hücreleriyle geçici adhezyon bağlantıları yapar. Hücre adezyon moleküllerinden JAM/CTX ve nektin ailesi testiste yoğun bir şekilde eksprese olmakta ve homofilik ya da heterofilik etkileşimler yaparak germ hücrelerinin tübül lümenlerine doğru göçlerine katılmaktadır (68). Bu etkileşimler spermatogenezin ilerlemesi için kritik öneme sahiptir ve her bir Sertoli hücresi belirli kapasitede germ hücrelerinin gelişimine destek verebilir (70, 71).

Spermatogenez için gerekli olan pek çok faktör Sertoli hücreleri tarafından üretilmektedir. Örneğin, primer spermatositler glikoliz olaylarında glukoz yerine laktat'ı tercih etmektedir; Sertoli hücreleri, FSH'nin kontrolü altında laktat üretimi yaparak primer spermatositlerin glikoliz olayına katılır (72, 73). Demir bağlayıcı bir protein olan testiküler transferrin de, FSH kontrolünde Sertoli hücrelerinde üretilen diğer bir önemli salgı ürünüdür. Transferrin, reseptör-aracılı endositozla primer spermatositlere demir getirir (74-76). Sertoli hücreleri aynı zamanda bakır bağlayıcı bir protein olan ceruloplasmin de salgılar. Ceruloplasmin, germ hücrelerine bakır getirilmesinden sorumludur (77). Özetle, Sertoli-germ hücre etkileşimi spermatogenezin düzgün olarak gerçekleşebilmesinde çok büyük önem taşımaktadır.

### **2.1.8.2. Leydig Hücreleri**

Leydig hücreleri, luteinize edici hormon (LH) stimülasyonuna yanıt olarak testiste androjen üretiminden sorumlu olan hücrelerdir. Bu hücreler, tübüller arası alanda yer alıp genellikle kan damarları çevresinde yığınlar oluşturmalarına rağmen seminifer tübüllere yakın olarak da yerleşim gösterirler (8).

Memelilerde, fetal ve doğum sonrası dönemlerde farklı Leydig hücre popülasyonu bulunur. Fetal Leydig hücreler, mezonefrostan köken alır ve testisin farklılaşması esnasında interstisyel alanda bulunan mezenşim-benzeri kök hücrelerden gelişir (78-80). Fetal Leydig hücrelerinin gelişimi, Sertoli hücrelerince kontrol edilir (81). Fetal Leydig hücrelerinin proliferasyon ve farklılaşması, platelet derived growth factor (PDGF) ve reseptörü PDGFRA (82), Desert Hedgehog (Dhh) ve reseptörü Patched (83) gibi proteinleri gerektirmekte ve bu faktörler için mutant olan hayvanlarda, Leydig hücre gelişiminin bozulduğu görülmektedir (82, 83). Fetal Leydig hücreleri, E12.5'de, testiste ana androjen olan testosteron üretimini başlatarak maskülenizasyonu sağlar. Bu dönemde üretilen testosteron, yetişkin Leydig hücrelerinde olduğu gibi LH'ya bağımlı değildir (80). Fetal Leydig hücreleri embriyonik gelişim boyunca sayılarını artırır (84).

Doğum sonrasında, fetal Leydig hücre sayısı hızlı bir şekilde azalır ve bu hücreler yetişkin Leydig hücre popülasyonu ile yer değiştirir. Yetişkin Leydig hücre popülasyonu köken olarak, fetal Leydig hücrelerden değil, interstisyel alanda bulunan

farklılaşmamış mezenşimal hücrelerden gelişmektedir (81, 85). Bu mezenşimal hücreler, Leydig hücre soyunu oluşturmak üzere yönlendirilir ve LH stimülasyonu ile beraber olgunlaşmamış Leydig hücrelerine dönüşürler. Hücre çapında büyüme, düz endoplazmik retikulum hacminde artış ve sitoplazmik yağ damlacıkları oranında azalma olgunlaşmamış Leydig hücrelerinin, yetişkin Leydig hücrelerine dönüştüğünün göstergesidir. Yetişkin Leydig hücrelerinden testosteron salgılanması LH ve reseptörleri aracılığıyla kontrol edilir; LH ve reseptörleri, steroid ilişkili yolların çalışabilmesi için gerekli enzimlere ait genlerin transkripsiyonunu uyarır (86). Androjen reseptörleri, Sertoli hücrelerinde ve peritübüler myoid hücrelerinde yerleşim gösterir (87).

#### **2.1.8.3. Peritübüler Myoid Hücreler**

Öncü-Sertoli hücrelerindeki *Sry* ekspresyonu ile beraber başlayan testiküler gelişim sırasında, mezonefroza gelişmekte olan gonada, hücre göçü devam eder (88, 89). Bu göç eden hücrelerden bazıları peritübüler myoid hücreler haline gelir ve Sertoli hücreleri ile etkileşime geçerek bazal membran kordonunu oluşturur. Peritübüler myoid hücrelerin gelişim ve farklılaşması Sertoli hücrelerinden eksprese olan ve peritübüler myoid hücrelerinde reseptörü bulunan Dhh kontrolünde gelişir (90). Mezonefroza göç eden hücreler aynı zamanda Leydig hücre ve interstisyumda bulunan vasküler yapının gelişimine de katılır (79).

Peritübüler myoid hücreleri yassı, düz-kas-benzeri hücreler olup testiküler kordonları sarar. Farede, bu hücreler sadece tek kat şeklinde bulunur (91). Myoid hücreler birbirlerine bağlantı kompleksleri ile bağlanır ve çok miktarda aktin filamanı içerir. Bu aktin filamanları, seminifer tübüllerin düzensiz kasılmalarına olanak sağlar ve böylece Sertoli hücrelerince üretilen salgının ve spermatozoidlerin lümene atılmasını kolaylaştırır (92). Bu hücreler, Sertoli hücre fonksiyonunu etkileyen, hücre dışı matriks bileşenleri ve büyüme faktörleri gibi diğer bazı maddeler de salgırlar (91). Myoid hücrelerin, testis gelişimi için gerekli olan androjen reseptörü içerdiği ve retinol işlevinde görev aldığı da bilinmektedir (91). Özetle, myoid hücreleri testisin yapısal bütünlüğünün korunmasında ve normal spermatogenik fonksiyonun işlenmesinde görev üstlenmektedir.

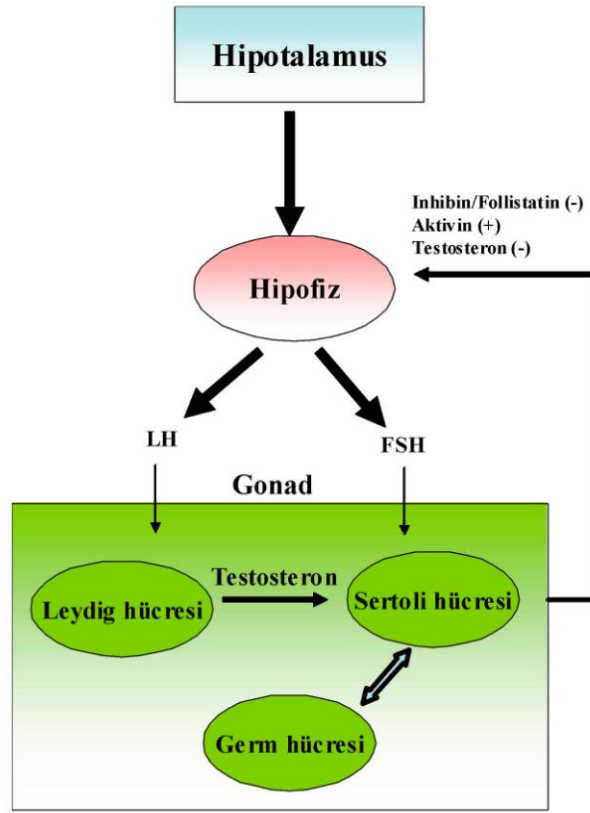
#### **2.1.8.4. Endotelial Hücreler**

Her iki cinsiyete ait gonadlar, fetal dönemlerde oldukça yoğun damarlanma gösterir (13, 82). Testisteki endotelial hücreler, özellikle anti-mezonefrik yüzeyde ve testis kordonları arasındaki bölgelerde yoğun bir damarlanma gösterir (27). Kan damarları ve testis kordonları, birbirlerini tamamlayan yapılar olduğundan, testis kordonlarının oluşumu ve vasküler yolak arasında karşılıklı bir etkileşim söz konusudur. Son yıllarda yapılan bir çalışmada, germ hücrelerinin kendi-kendilerini yenileme kapasitelerinin, farklılaşmamış olan spermatogoniyanın vasküler ağa yakın bir konumda yerleşim göstermesine bağlı olduğu gösterilmiştir (93). Vasküler sistem, aynı zamanda testis matürasyonu ve fonksiyonu için gerekli olan Leydig ve Sertoli hücrelerince üretilen hormonların dolaşıma katılmasını da sağlar.



### 2.1.9. Spermatojenin Hormonal Kontrolü

Testiküler fonksiyonun gerekleŖebilmesi için, hipotalamustan salınan gonadotropin salgılayıcı hormon (GnRH)'un salgılanması ve bunun hipofizi uyararak FSH ve LH gibi, testis üzerinde direkt etki gösteren, glikoprotein yapısındaki hormonları salgılatması gerekir. Testiküler fonksiyonun düzenlenmesinde gonodotropin üretimini negatif yönde etkileyen aktivin, inhibin ve follistatin gibi hormonlar da rol oynar. İlerleyen bölümde spermatojenin hormonal kontrolü ve hormonların Sertoli ve Leydig hücreleri üzerindeki özel fonksiyonları anlatılacaktır. Ŗekil 2.1.9.1. hipotalamus-hipofiz-gonad aksında LH, FSH, aktivin, inhibin ve follistatin'in spermatojenin düzenlenmesindeki rolü zetlenmiŖtir.



**Ŗekil 2.1.9.1.** Spermatojenin hormonal kontrolü. Gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH), hipotalamus tarafından salgılandıktan sonra hipofizi etkileyerek buradan Luteinize edici hormon (LH) ve folikül stimule edici hormon (FSH) gibi gonodotropinlerin salgılanmasını uyarır. LH, Leydig hücrelerini uyararak testosteron üretimini sağlar; testosteron, Sertoli hücreleri üzerinde rol oynar ve germ hücre davranışını düzenler. FSH Sertoli hücreleri üzerinde etkisini göstererek bu hücrelerin proliferasyonunu düzenler ve indirekt olarak germ hücre sayısını belirler. Aktivin, inhibin ve follistatin, testis geribildirimiyile FSH seviyesini düzenlemek için hipofizden üretilir (Gregory *et al.*, 2004'den adapte edilmiŖtir).

### 2.1.9.1. Follikül Stimüle Edici Hormonun Rolü

Erkek bireylerde FSH, Sertoli hücre sayısının belirlenmesi, sperm üretiminin indüklenmesi ve devamlılığı için gereklidir. Testiste, FSH reseptörünün ekspresyonu (FSH-R) yalnızca Sertoli hücreleriyle sınırlıdır (94). Spermatogenez olayında FSH'ın birincil rolü, puberte öncesi dönemde Sertoli hücre proliferasyonunun indüklenmesidir (95). GnRH hasarlı farelere testosteron verildiğinde bu hayvanlarda kalitatif olarak normal spermatogenez görülmesine rağmen testis büyüklüğünde ve germ hücre sayısında azalma olmaktadır. Testosterona ilaveten FSH verilen aynı hayvanlarda hem kalitatif olarak normal spermatogenez hemde normal testis büyüklüğü görülmektedir (96, 97). Ayrıca, FSH'ın neonatal ve pre-pubertal testislere eklenmesiyle testis büyüklüğünün normalden daha fazla arttığı ve Sertoli hücre sayısının artmasına bağlı olarak toplam germ hücre sayısının da daha yüksek olduğu gösterilmiştir (96, 98). Özetle, FSH ekspresyonu, Sertoli hücre proliferasyonunu ve matürasyonunu etkileyerek testisin büyüklüğünü ve dolayısıyla testisin spermatozoa yapım kapasitesini etkilemektedir.

FSH düzeyi, hipofiz bezindeki aktivin, inhibin ve follistatin aktivitesi ile belirlenir. Aktivin, hem FSH salgılanmasını hemde *FSH $\beta$*  mRNA ekspresyonunun artmasını sağlarken, inhibin ve follistatin bu mRNA ekspresyonunu azaltmakta ve belirlenemeyecek düzeylere kadar yıkıma uğratmaktadır (99-103). Aktivin ve follistatin gonad, hipofiz ve hipotalamus tarafından sentezlenir (104). Follistatin, aktivine dönüşümsüz olarak bağlanarak aktivitesini negatif yönde düzenler. İnhibin, Sertoli hücrelerinden dolaşıma salgılanır ve hipofizde aktivin tip II reseptörüne bağlanarak FSH salgılanmasını baskılar. Böylece aktivin sinyali durdurulur. Dolaşımdaki FSH düzeyinin, yeri geldiğinde Sertoli hücrelerince üretilen inhibin üretimini düzenlemesi bu olayın, klasik bir negatif kontrol mekanizmasıyla çalıştığını gösterir.

### 2.1.9.2. Luteinize Edici Hormonun Rolü

LH, heterodimerik bir glikoprotein olup hipofizden GnRH stimülasyonuna yanıt olarak eksprese olur. LH reseptörleri (LH-R) başlıca Leydig hücrelerinde bulunmasına rağmen reseptöre ait boyanmalara spermatogenik hücrelerde de rastlanır (105). LH-R eksik (null) erkek fareler, fenotipik olarak normal doğmakta ve vahşi-tip yavrulardan ayırt edilememektedir. Ancak, postnatal farelerde, testiküler büyüme ve testiküler inme defektleri, eksternal genitalerin ve aksesuar bezlerin olgunlaşmasında durma ve spermatogenezin yuvarlak spermatid basamağında durması (arrest olması) gibi bozukluklar görülür. Bu farelerde, Leydig hücre sayısı ve hacmi de anlamlı bir şekilde azalır. Testiküler testosteron üretimi, neonatal mutant ve vahşi-tip hayvanlarda aynıyken, yetişkin homozigot mutant farelerde anlamlı bir azalma söz konusudur. Bu nedenle, LH'nın fetal fare Leydig hücrelerinin farklılaşma ve fonksiyonu için gerekli olmadığı ancak yetişkin Leydig hücrelerinin endokrin fonksiyonunda görev aldığı düşünülür (106, 107).

LH fonksiyonu, özellikle testisteki Leydig hücrelerinden üretilen testosteron sentezinin düzenlenmesinde gereklidir (108). LH-R knockout farelere dışarıdan testosteron verildiğinde bu hayvanlarda spermatogenezin kurtarıldığı gösterilmiştir

(105, 109). Testosteron uygulaması aynı zamanda, hem FSH hem de LH dan yoksun olan erkek farelerde spermatogenezin kurtarılmasını başarmıştır (97). Testosteron fonksiyonu, cinsiyet farklılaşmasının düzgün gerçekleşebilmesi ve spermatogenezin normal devam edebilmesi için gereklidir. Testosteron'un ortamdaki çıkarılmasıyla, ilk olarak yuvarlak spermatidlerin ve daha sonra uzamış spermatidlerin kaybolduğu gösterilmiştir (110). Germ hücreleri ile Sertoli hücreleri arasındaki adezyon da androjen-bağımlıdır. Testosteron'un azalmasıyla beraber matür uzamış spermatidlerin fagositoza uğradığı ve yuvarlak spermatidlerin prematür olarak kaldığı gözlenmiştir (111-113).

## 2.2. Hedgehog Sinyal Yolağı

Hedgehog (Hh) ailesi proteinleri birçok dokunun gelişiminde rol oynar. *Hh* geni ilk olarak, sirke sineği *Drosophila*'da tanımlanmıştır (2). *Hh* geni çıkartılan *Drosophila* embriyolarında, vücudun ön ve arka kısımlarında dikenlere benzer çıkıntılar oluşmuştur ve bu fenotipten dolayı bu gene "hedgehog" (kirpi) adı verilmiştir. Memelilerde 3 Hh geni homoloğu tanımlanmıştır: *Sonic Hedgehog (Shh)*, *Indian Hedgehog (Ihh)* ve *Desert Hedgehog (Dhh)*. Bundan sonraki bölümde Hh sinyalinin biyolojik yanıtı nasıl çevrildiği anlatılacaktır.

### 2.2.1. Hedgehog Sinyal Transdüksiyon Mekanizması

Yeni sentezlenen Hh ligandının, biyolojik aktivitesini yerine getirebilmesi için, N ve C uçlarından sırasıyla palmitat ve kolesterol grupları bağlanır (114, 115). Hh ligandına kolesterol ve palmitatın bağlanması Hh fonksiyonu için önemlidir. Kolesterol modifikasyonu, hücre membranına bağlanmayı kolaylaştırıp ligandın hareketini düzenlerken 16-karbonlu doymuş yağ asidi olan Palmitat, Hh ligandının hangi bölgeye dağılacığını düzenlemektedir.

Hh ligandı için başlıca reseptör, 12-transmembran proteini olan Patched (Ptc)'dir. Bugüne kadar tüm Hh üyelerine benzer afinite ile bağlanan 2 esas Ptc reseptörü tanımlanmıştır; Ptc1 ve Ptc2 (116). Yakın bir zamanda, testis-spesifik bir Ptc geni bulunmuş olup *Ptc3* olarak adlandırılmıştır (117). Ancak, bu reseptörün Hh'a bağlanma kapasitesi henüz tanımlanmamıştır.

Hh ligandının, hücre yüzeyinde reseptörüne bağlanmasının ardından sinyal yolağının nasıl aktive olduğu henüz net olarak bilinmemesine rağmen, Hh ligandı ortamda bulunmadığı zaman, Ptc'nin, 7-transmembran G-protein-reseptör-benzeri reseptör olan Smoothened (Smo)'ya bağlanarak, Smo aktivitesini baskıladığı bilinmektedir. Hh ligandının ortamda bulunması ve reseptörü olan Ptc'ye bağlanmasının ardından Smo serbest kalmakta ve Protein Kinaz Alfa (PKA) aracılı fosforilasyonu gerçekleştirerek Smo aktifleşmektedir. Smo, doğası gereği sürekli olarak aktif olmasına rağmen, Hh ligandının olmadığı durumlarda, Smo'nun hücre yüzeyine lokalizasyonu primer reseptör Ptc tarafından baskılanmakta ve Smo

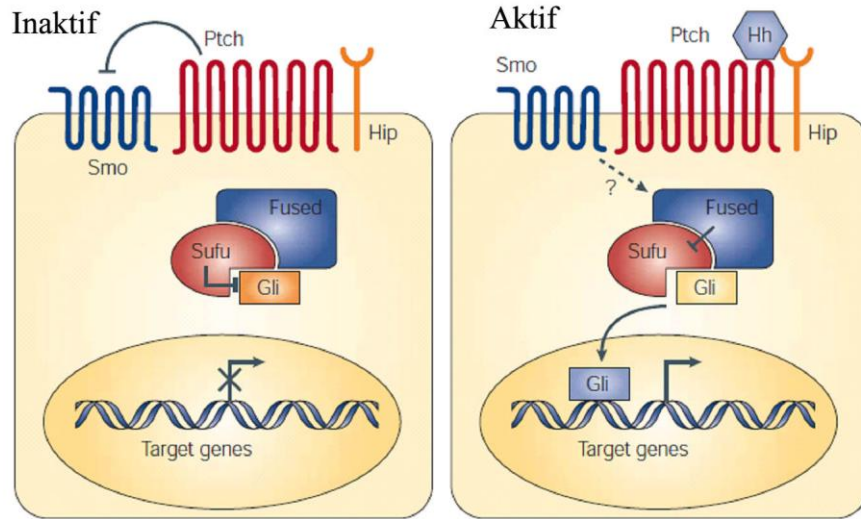
durağan bir durumda kalmaktadır (118, 119). Ptc'nin Smo aktivitesini baskılaması ile ilgili mekanizma henüz tam olarak bilinmemesine rağmen Ptc'nin katalitik bir fonksiyonu olabileceği düşünülmektedir (ör; tek bir Ptc molekülü birçok

Smo molekülünü inhibe edebilmektedir). Bu anlamda, Ptc ve Smo'nun birbirlerine bağlanması veya birlikte lokalize olması gerekmemektedir (120).

Smo'nun alt sinyal çalışma yolağı henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Günümüzde bilinenler, Hh reseptörünün Ptc'ye bağlanmasıyla Ptc tarafından Smo baskılanmasının ortadan kalktığı ve Smo'nun hücre içi sinyal aktivitesini başlattığıdır (121-123).

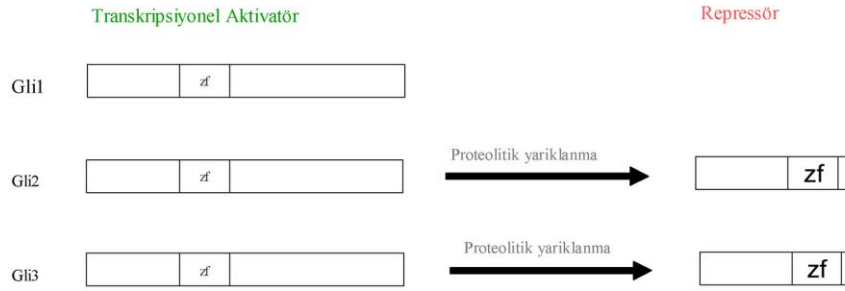
Hh sinyal yolağı, Gli transkripsiyon faktörleri (Gli1, Gli2, Gli3) aracılığı ile aktivitesini gerçekleştirir. Bu transkripsiyon faktörlerinin hem aktivatör hemde repressör fonksiyonları bulunmaktadır. Gli2 ve Gli3, pretolitik yarıklanmaya gitmekte ve transkripsiyonel aktivatör ya da inhibitör olarak görev görmektedir. Gli1 ise bir bütün olarak hücre nükleusuna giderek Hh aktivitesini başlatmaktadır (Şekil 2.2.1.1.).

Hh yolağı inaktif olduğunda, Gli transkripsiyon faktörleri, Fu ve SuFu olarak adlandırılan hücre içi sinyal transdüktörleri tarafından sitoplâzma tutularak aktivitesi engellenmektedir. Fu'nun fonksiyonu tam olarak bilinmemesine rağmen SuFu Hh sinyal yolağının negatif regülatörü olarak bilinmektedir. Yolak aktifleştğinde, Gli transkripsiyon faktörleri, SuFu'dan ayrılarak ve nükleusa gitmekte ve ilgili genlerin aktivitesini kontrol etmektedir (Şekil 2.2.1.1.).



**Şekil 2.2.1.1.** Hh sinyal yolağı. Hh proteinleri salgılandıktan sonra hücre yüzeyindeki reseptörüne bağlanır. Hh ligandının yokluğunda, yolak inaktiftir; transmembran reseptör olan Ptc, Smo ve diğer transmembran proteinlerinin aktivitesini inhibe eder. Bu durumda, Gli transkripsiyon faktörlerinin nükleusa girmesi Fu ve SuFu tarafından önlenir. Sonuç olarak Hh hedef genlerinin transkripsiyonu engellenir. Yolağın aktivasyonu Hh ligandının Ptc reseptörüne bağlanmasıyla başlar. Ligand bağlanmasıyla Smo aktifleşir

ve hücre içindeki diğer sinyal yollarını uyararak Gli1'in nükleusa geçmesini ve transkripsiyonun başlamasını uyarır. (Pasca di Magliano 2003'den modifiye edilmiştir).



**Şekil 2.2.1.2.** Hh sinyal yolağı Gli transkripsiyon faktörleri. Memelilerde 3 adet Gli geni vardır ve her birinin değişik aktivatör ve repressör fonksiyonu bulunur. Yalnızca Gli1 yarıklanmamış formda bulunur ve aktivatör olarak görev görmektedir. Gli 2 ve 3 proteolitik yarıklanmaya gitmekte ve transkripsiyonel aktivatör ya da inhibitör olarak görev görmektedir.

## 2.2.2. Hedgehog Sinyalinin Gelişimdeki Rolü

Hh proteinleri, birçok doku ve organın gelişiminde ana düzenleyici olarak görev yapmaktadır. Gelişimin düzenli olarak ilerleyebilmesi için Hh yolağı aktivasyonu sıkı bir şekilde kontrol edilmelidir. Şöyleki; bu yolağın aşırı aktivasyonu birçok gelişimsel defektlere ve tümör oluşumuna neden olmaktadır. Devam eden bölümde Hh sinyalinin gelişimi nasıl düzenlediği ile ilgili günümüzde bilinen bilgiler sunulacaktır.

### 2.2.2.1. Embriyogeneizde Hedgehog Sinyalinin Rolü

Hh sinyal yolağı, embriyonik gelişimin pek çok aşamasında görev almaktadır. *Drosophila* larvasında mutant Hedgehog proteini, vücut ekseninin gelişimini bozmaktadır. Bu keşiften sonra, Hh'ların hücre büyümesi ve şekillenmesindeki rolü daha fazla anlaşılmaya başlamış ve özellikle uzuv gelişimindeki rolü çokça çalışılmıştır (124).

Hh proteinleri doku organizasyonu ve diğer değişik gelişimsel olaylarda önemli bir rol oynamaktadır. 3 Hh geninin her biri, gelişimsel olarak düzenlenmekte ve çeşitli dokuların oluşumuna katılmaktadır. *Shh*, farede en yüksek miktarda eksprese olan Hh ailesi üyesidir. Gelişmekte olan fare embriyosunda, *Shh* mRNA'sı notokord, nöral tüp ve uvuz tomurcukları gibi yapılarda lokalizedir (125). *Shh* ayrıca, diş, saç, yanak, bağırsak, mesane, duktus deferens, üretra, akciğer ve prostat gibi dokularda da bulunmaktadır (126, 127). *Shh* geni çıkartılmış (*Shh*<sup>-/-</sup>) farelerin birçoğu doğumdan önce ya da doğumda ölmektedir (Table 1). *Shh* genindeki mutasyonlar, hem insanlar hemde farelerde önbeyin yarıklanmasının tamamlanamaması, yüz defektleri, göz defektleri ile karakterize olan holoprosencephaliye neden olmaktadır (125). *Shh*<sup>-/-</sup> fare embriyoları birçok büyüme geriliği de göstermektedir ve vahşi tiplerdeki gibi ön ve arka ekstremiteler bulunmamaktadır (125). Bu farelerde, spinal kord ve aksial iskelet

şekillenmesinde de defektler bulunmaktadır. Ayrıca, akciğerleri yeterince büyüyememekte ve dallanamamaktadır (128).

*Ihh*, başlıca bağırsakta ve kondrositlerde eksprese olmaktadır (126). *Ihh* ekspresyonuna meme bezi, uterus ve ovaryumda da rastlanmaktadır (127, 129). *Ihh* geni çıkartılmış (*Ihh*<sup>-/-</sup>) embriyolarının neredeyse yarıdan fazlası E10.5. ve E12.5'de ölürken, diğer bazıları gebeliğin sonuna kadar gelişimlerini sürdürdüğü ancak solunum yetmezliğinden dolayı doğumla birlikte öldüğü gözlenmiştir. Kıkırdaktaki ekspresyonuyla uyumlu olarak *Ihh*, iskelet gelişiminin düzenlenmesinde rol oynamaktadır. *Ihh*<sup>-/-</sup> fareler çeşitli kemik anomalileri gösterirler; bu bireyler vahşi-tip akranlarına göre daha kısa boylu, daha kısa kafa ve yüz elemanlarına sahip ve daha kısa kuyrukludurlar. Bu farelerde gözlemlenen ve yukarıda belirtilen anormalliklerin kondrosit proliferasyonu ve osteoblast gelişimi defektlerinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir (130).

*Dhh*, Sertoli hücrelerinde eksprese olmakta ve başlıca etkisini geliştirmekte olan testiste göstermektedir (6). *Dhh* ayrıca kranial ve spinal sinirlere ait duyu ve motor nöronların aksonlarını saran Schwann hücrelerinde de eksprese olmakta ve peripherel sinirlerin çevresindeki bağ doku kılıfını oluşturmaktadır (131).

#### **2.2.2.2. Kanser Oluşumunda Hedgehog Sinyalinin Rolü**

Daha önce yapılan çalışmalarda, Hh sinyal yolağı aşırı aktivasyonunun yetişkin dokularında, tümör oluşumuna ve devamlılığına katıldığı vurgulanmaktadır. Hh yolağının aşırı aktivasyonu, gerek Hh'nin aşırı artması (ligand-bağımlı) gerekse sinyal yolağındaki mutasyonlardan (ligand-bağımsız) kaynaklanabilir. Hh sinyal yolağının kanser oluşumundaki rolü ile ilgili seçilmiş bilgiler aşağıda verilmektedir.

Hh-aşırı ekspresyonuyla tanımlanan ilk tümör, small-cell lung cancer (SCLC)'dir. SCLC doku analizleri, 10 adet tümör olgusundan 5 adedinde hem *Shh* hemde *Gli1* ekspresyonu olduğu gösterilmiştir (132). SCLC hücre soyunun büyümesi, anti-Shh antikoru veya cyclopamine olarak adlandırılan inhibitörle inhibe edilebilmiş ve Hh yolağının ligand bağımlı aktivasyonunun, SCLC büyümesini tetiklediği belirtilmiştir. Hh yolağının aşırı regülasyonu, insan pankreas tümörlerinde de gözlenmiştir (133, 134). *Shh* ekspresyonunun arttığı transgenik hayvanların pankreas epitelinde, pankreatik kanser prekürsör lezyonuna (PanINs) benzer anormal tübüler kompleks oluşumuna rastlanmıştır (133). Bu fenotip, pankreatik karsinogenezin erken lezyonu sayılan insan PanIN-1 ile benzerlik göstermektedir. Ayrıca, primer ve metastatik pankreas adenokarsinomu gösteren hücre soylarında da aktif Hh sinyaline rastlanmıştır. Cyclopamine ile Hh sinyalinin inhibe edildiği bu hücre soylarında apoptoz ve proliferasyonun durduğu gözlenmiştir (133). *Ptc1* gen aktivasyonunun mutasyona bağlı olarak bozulmasıyla, Hh sinyalinin devamlı aktive edilmesi sonucu, hem insanlarda hemde farelerde Gorlin's sendromuna rastlanmıştır (135, 136).

Bu hastalık, gelişimsel anomaliler ve basal cell karsinoma, medullablastoma ve ovarian fibroma gibi postnatal kanser oluşumu ile karakterizedir. Hh sinyalinin devamlı aktivasyonu ile beraber insidansı artan diğer neoplazmalar, fibrosarkoma,

meningiomas, rhabdomyosarkoma ve kardiak fibromadır. Hh sinyalinin, *Smo*'dan kaynaklı mutasyona bağlı olarak artışında da, basal cell karsinomaya sıklıkla rastlanır (137, 138). Doğal olarak bulunan ve bir steroid alkaloid olan cyclopamine, *Smo* reseptörü antagonisti olarak çalışarak Hh sinyalini inhibe eder (49). Embriyonik gelişim sırasında cyclopamine uygulaması (Hh sinyalinin durdurulması), hayvanlarda cyclopia ve holoprosencephaly oluşumunu sağlar. Bu durum, Hh yolağı mutasyonundan kaynaklanan tümörlerin tedavisi için cyclopamine'nin tıbbi bir ajan olabileceğini düşündürür.

Bazı tümörlerde ise, SuFu inaktivasyonundan kaynaklanan Hh sinyali aşırı ekspresyonu olduğu belirtilmektedir. 2004 yılında yapılan bir çalışmada, prostat kanserinde hastalığın ilerlemesini derecelendiren bir skor olan Gleason skoru (yüksek skor, hastalığın ilerlediğini ifade etmektedir), birçok prostat kanser örneklerinde yüksek olarak bulunmuştur ve bu örneklerde SuFu proteinine rastlanmamıştır. Düşük Gleason skorlu hastalarda ise belirlenebilir düzeyde SuFu proteine rastlanmıştır. Böylece, SuFu'nun ortamda bulunmaması ile prostate kanseri ilerlemesi arasında bir ilişki olabileceği öne sürülmüştür (139). PC3 prostat kanser hücre soyunun, cyclopamine ile muamele edilmesi sonucunda azalan Hh sinyaliyle beraber hücre proliferasyonunun ve hücre invazyon yeteneğinin de azaldığı gösterilmiştir (139). Bu nedenle, Hh sinyal aktivasyonu hem hücre proliferasyonunu hemde prostat kanseri hücrelerinin invazyon yeteneklerini düzenlemektedir. Bazı akciğer kanserlerinde SuFu'nun inaktif olduğu belirlenmiştir. Buda yine, SuFu'nun tümör-baskılayıcı rolünü açıklamaktadır (140).

Hh yolağının sürekli aktivasyonu ile başlatılan alt yolak mekanizmalar hakkında henüz yeterli bilgi bulunmamasının başlıca nedeni, Gli transkripsiyon faktörlerince kontrol edilen genlerin henüz tam olarak anlaşılabilmiş olmasıdır. Hücre siklusu düzenleyicileri ve anti-apoptotik faktörler, Hh sinyalinin alt yolakları arasında gösterilmektedir. Memelilerde yapılan değişik çalışmalarda, Hh sinyalinin, D-siklinlerin düzenlenmesinde rol aldığı ifade edilmektedir (141-143). Dolayısıyla, kontrolsüz bir Hh sinyali nedeniyle hücre siklusu düzenleyicilerinin uygunsuz bir biçimde aktivasyonu tümör oluşumunu tetikleyebilir.

Bir proto-onkogen olan ve cerebellar granül nöron prekürsörlerinde hücre siklusu ilerlemesini düzenleyen N-myc, Shh yolağının direkt hedefi olarak tanımlanmaktadır (144). Myc proteinlerinin aktivitesi, birçok hücre tipinde proliferasyon ve/veya transformasyonu yönlendirdiği ifade edilmektedir (145). Ayrıca, yoğunluklu olarak *Gli2*'nin, daha az etkili olarak da *Gli1*'in anti-apoptotik faktör olan *Bcl2*'nin, insan epidermal hücrelerindeki ekspresyonlarını artırdığı gösterilmiştir (146, 147). Basal cell karsinomada, *Gli1*, *Gli2* ve *Bcl2* aşırı ekspresyon olmaktadır ve hepsi aynı hücrede ekspresyon göstermektedir (146, 147). Bu durum, bozulmuş Hh sinyalinin tümörlerde hücre proliferasyonunu yönlendirmekle kalmayıp, *Bcl2* gibi pro-survival faktörlerin ekspresyonunu indükleyerek tümörlerin oluşumuna ve devamlılığına katkı sağladığını göstermektedir.

Bu bilgiler, ligand bağımlı ya da ligand-bağımsız yoldan kontrolsüz Hh yolağı aktivasyonunun, birçok kanserin başlamasına ve ilerlemesine katkı sağladığını gösterir.

### 2.2.2.3. Testiste Hedgehog Sinyal Yolağı

Hh sinyalinin, gonadlar, uterus, prostat ve meme bezi gibi üreme organlarında rolü olduğu bilinmektedir (127). Hh sinyalinin, özellikle memeli spermatogenezinin düzenlenmesinde, önemli rol oynadığı vurgulanmaktadır.

*Dhh*, memeli testisinde eksprese olmakta ve testis oluşumunda ve germ hücre gelişiminde fonksiyon görmektedir. *Dhh* mRNA'sı ilk olarak, *Sry* ekspresyonunun başlamasından hemen sonra, kemirgen fetal testisinin Sertoli hücrelerinde E11.5'de gözlenmektedir ve yetişkin dönemde de devam etmektedir (6). *Dhh* geni için genetik olarak eksik (null) olan erkek farelerde, matür sperm üretimi gerçekleşmemesine rağmen dişi farelerde belirgin bir fenotip değişikliğine rastlanmamaktadır (6). *Dhh*<sup>-/-</sup> fenotipi ilk olarak *129/Sv* türü farelerde tanımlanmıştır (6). Bu hayvanlarda E18.5'den itibaren vahşi türlerine göre, testis hacimlerinde azalma ve tübüllerinde germ hücrelerinin olmadığı gözlenmiştir. *Dhh*-null farelerin karışık genetik backgrounda sahip olanları daha hasarlı fenotip sergilemişlerdir; bu hayvanlardan %92.5'i feminize olmuşlardır (pseudohermaphrodit) (90). Feminize *Dhh*-null yetişkin erkeklerin seminifer tübüleri, peritübüler doku defektinden dolayı düzensiz ve anostomiktir. Bu hayvanlarda peritübüler myoid hücreler, olgunlaşmamış bir görünüme sahip olup testisin interstisiyel bölgelerinde fetal Leydig hücresi ve birkaç yetişkin-tip Leydig hücreleri bulunmaktadır (90). *Dhh*-null erkek fenotipi, peritübüler hücre anormallikleri ve bozulmuş spermatogenez göstermektedir. *Dhh*-null fetal testis incelendiğinde, bu defektlerin aslında embriyonik dönemdeseminifer kordonların oluşumunun başladığı, E13.5'den itibaren başladığı anlaşılmaktadır (148). Hh'ların seminifer kordon oluşumundaki rolleriyle uyumlu olarak, E11.5 kemirgen gonadına *in vitro* cyclopamine uygulandığında bu gonadlarda, kontrollerle kıyaslandığında seminifer kordonların bozulduğu ve organizasyonu bozulmuş laminin çökmesi olduğu gözlenmiştir (149). Cyclopamine uygulaması, aynı zamanda fetal Leydig hücre farklılaşmasında da hasarlara neden olmuştur.

Hh sinyalinin, insan normal testis gelişimi için de kritik olduğu bilinmektedir. XY kromozoma sahip ancak testis gelişimi gerçekleştiremeyen kişilerde (46,XY pure gonad disgenesis sendromu), bu durum, yaklaşık %10-15 *Sry* geni bozukluğundan kaynaklansa da, bu kişilerin *DHH* genlerinde de mutasyon olduğu bilinmektedir (150).

Hh yolağı elemanlarının testisteki ekspresyonu ile ilgili yeterince bilgi bulunmamaktadır. *Gli1* ve *Gli3* mRNA ekspresyonu, izole edilen fare Tip A ve Tip B spermatogoniyalarda, Northern Blot yöntemi ile gösterilmiştir (151). Gli1 proteini, yetişkin fare testisinde pakiten spermatositlerin çekirdeğinde yerleşim göstermekte ve yuvarlak spermatid basamağına kadar varlığını korumaktadır; uzamış spermatidlerde ise bu protein artık sitoplazmaya geçmektedir (7). Bu durum, Gli1 proteininin spermatogenez üzerindeki etkisinin, uzamış spermatid aşamasında kaybolduğunu göstermektedir.

İnsan *Gli1* geni, fare germ hücrelerinde deneysel olarak aşırı-eksprese edildiği zaman, bu hayvanlarda spermatogenez, pakiten spermatosit basamağında



duraklamaktadır. Bu transgenik hayvanlarda seminifer túbüller, vahşi-tip farelerle karşılaştırıldığında yüksek oranda bozukluk göstermektedir (7).

Testiste *Ptc1* mRNA sentezi Leydig ve peritúbüler hücrelerde vardır. Dhh/Ptc1 sinyali özellikle fötal Leydig hücrelerinin farklılaşması için gereklidir (6, 83). Radyoaktif in situ yöntemi kullanılarak da *Ptc2* ve *Fu* mRNA'ları spermatositlerde gösterilmiştir (116). Bu bilgiler ışığında, Hh sinyalinin önemi ve normal spermatogenezde rolü olduğu anlaşılmaktadır. Ancak, bu yolağın ne zaman ve hangi hücrelerde eksprese olduğu ile ilgili henüz yeterince bilgi bulunmamaktadır.

## **Hipotez ve Amaç**

Yukarıda verilen bilgiler, Hh sinyal yolağının spermatogenezi de içeren birçok gelişimsel olayda rol oynadığını göstermektedir. Bu tezdeki çalışma, Hh sinyal yolağının spermatogenezin farklı gelişimsel dönemlerindeki kök hücrelerde eksprese olduğu ve spermatogenezi düzenlediği hipotezini desteklemeye yönelik yapılmıştır.

Bu tezin amaçları aşağıdaki gibidir:

1. Gelişmekte olan ve yetişkin sıçan testisinde Hh sinyal yolağına ait elemanların mRNA ekspresyonlarını belirlemek.
2. Radyasyona maruz kalmış sıçan testis modelini kullanarak yetişkin testisküler kök hücrelerdeki Hh sinyal yolağı elemanlarının mRNA ekspresyonunu belirlemek.
3. Embriyonik gelişimleri sırasında Dibütilfitalat'a (DBP) maruz kalan sıçanların testislerinde Hh sinyal yolağı elemanlarının mRNA ekspresyonunu araştırmak.
4. Aktivin knock-out fare modelinde Hh sinyal yolağı elemanlarının testisteki mRNA ekspresyonlarını araştırmak.
5. Postnatal testiste, damla kültür yöntemini kullanarak, cyclopamine ile Hh sinyal yolağının inhibe edildiği durumda, hangi genlerin ekspresyonlarının etkilendiğini belirlemek.
6. İnsan seminoma, non-seminoma ve CIS testis örneklerinde, Hh sinyal yolağı elemanlarının ekspresyonunu araştırmak.

## GEREÇ ve YÖNTEM

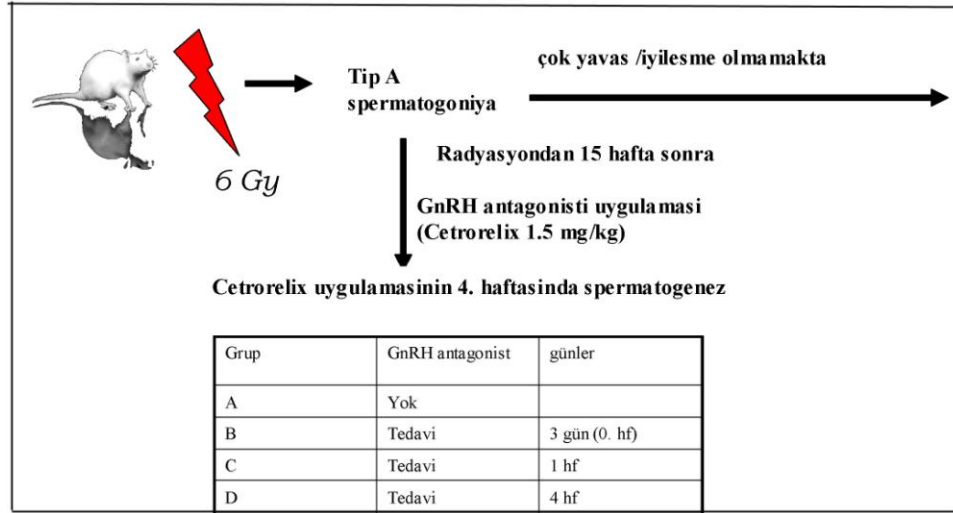
Tez çalışmamızda kullanılan kontrol, fare (CBAxC57B16 F1) ve sıçanlar (Sprague Dawley), Monash Üniversitesi, Merkezi Hayvan Servisinden elde edildi. Testis dokuları elde edilmeden önce hayvanlar, dekapitasyonla (genç fareler) ya da servikal dislokasyonla (genç ve yetişkin sıçanlar) ile öldürüldü. Bu hayvanların deneylerde kullanılması için gerekli izin, Monash Üniversitesi, Hayvan Deneyleri Etik Kurulundan alındı.

### 3.1. Radyasyon Alan Sıçan Testis Modeli

Radyasyon alan sıçan testis modeli, Hh sinyal yolağının yetişkin sıçan testisinde bulunan spermatogoniyal kök hücrelerdeki ekspresyonlarını araştırmak için ideal bir modeldir. Radyasyon uygulamasıyla radyosensitif olan farklılaşmış spermatogoniyalar ölmekte ve testis tübüllerinde farklılaşmamış spermatogoniyalar kalmaktadır (152). Herhangi bir tedavinin uygulanmadığı durumda, sadece radyasyon uygulanan hayvanlarda spermatogenezin yeniden başlaması, ya çok uzun bir zaman sonra gerçekleşmekte ya da hiçbir zaman iyileşme olmamaktadır.

Bu modele ait testis dokuları, Harlan laboratuvarı, Indianapolis, USA'den temin edilmiş olup, radyasyon alan sıçan testis modeli, aşağıda açıklandığı şekilde oluşturulmuştur:

Bu modelde, 10 haftalık LBNF1 türü erkek sıçanlara (Lewis ve Brown–Norway hibritleri) tek doz ve 6 Gy radyasyon uygulanmıştır. Bu hayvanlara, radyasyon alımından 15 hafta sonra, GnRH antagonistleri olan Cetrorelix pamoate ve Cetrorelix acetate (1.5mg/kg) tedavisi uygulanarak, spermatogenezin yeniden stimülasyonu sağlanmıştır (Şekil 3.1.1.). Spermatogenezdeki iyileşme, tübüllerde B spermatogoniya veya daha sonraki basamaklara erişmiş germ hücresinin skorlanması ile belirlenmiştir (153). Radyasyon uygulamasından sonra, sadece radyasyona maruz kalan, ancak tedavi görmeyen gruba ait testisler (Grup A), 3 gün GnRH antagonisti tedavisi gören gruba ait testisler (Grup B), 1 hafta GnRH antagonisti tedavisi gören gruba ait testisler (Grup C) ve 4 hafta GnRH antagonisti tedavisi gören gruba ait testisler (Grup D) toplanmıştır (Şekil 3.1.1.). Tüm dokular Bouins fiksatifinde fikse edilerek, parafin bloklar hazırlanmıştır.



Şekil 3.1.1. Radyasyon alan sıçan testis modelinin şematik şekli.

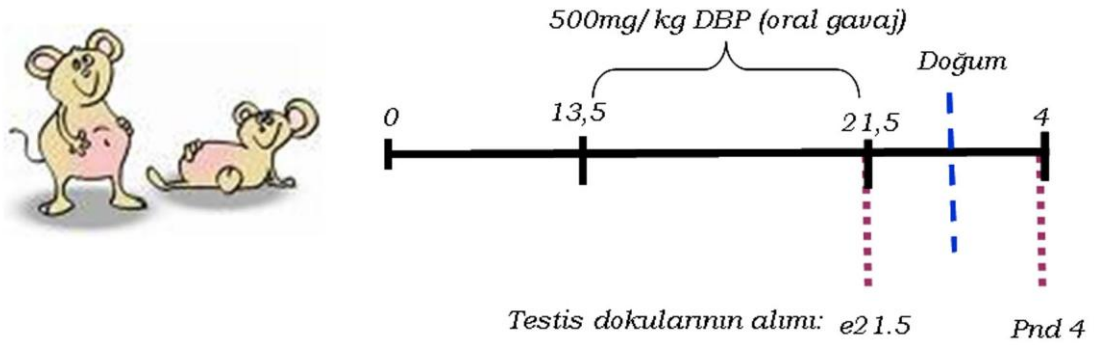
GnRH antagonisti tedavisi ile beraber, spermatogenezdeki iyileşmesi sürecinin, Hh sinyal yolağı ile ilişkili olup olmadığını araştırmak amacıyla, yukarıda belirtilen gruplara ait testis dokularında, *in situ* hibridizasyon yöntemiyle *Dhh*, *Ptc2*, *Smo*, *Gli1*, *Gli2*, *Gli3*, *Fu* ve *SuFu* mRNA ve immünohistokimya yöntemiyle SuFu protein ekspresyonlarına bakılmıştır.

### 3.2. Fötal Dönemde Dibütilfitalat (DBP)'ye Maruz Kalmış Sıçan Testisi Modeli

Aynı model kullanılarak yapılan çalışmalar sonucunda, gebelikleri sırasında DBP'ye maruz kalan dişi sıçanların erkek yavrularında, Sertoli ve Leydig hücrelerinin yetersiz olgunlaştığı ve Sertoli hücre sayısının azaldığı, gonositlerinin anormal yapıda olduğu, gelişimle ilgili bazı gen ekspresyonlarının daha uzun gelişim aralığına yayıldığı ve yetişkinlik dönemlerinde üreme bozuklukları gösterdikleri belirlenmiştir (64). Dolayısıyla, bu model bozulan germ hücre gelişiminin altında yatan mekanizmaların çalışılması açısından uygun bir modeldir.

Bu modele ait testis doku örnekleri, The Quenn's Medical Research Institute, Edinburg, UK'de bulunan Dr. Richard Sharpe'ın laboratuvarından temin edilmiş olup aşağıda belirtildiği gibi oluşturulmuştur:

Bu modelde, Wistar türü gebe dişi sıçanlara, gebeliklerinin 13.5-21.5. günleri arasında, oral gavaj yoluyla 1ml/kg mısır yağı içerisinde 500 mg/kg DBP (Sigma-Aldrich Co. Ltd., Dorset, UK) veya 0 mg/kg (kontrol) verilerek, bu sıçanlara ait erkek yavruların testisleri, E21.5'de ve PND4'de toplanmıştır (Şekil 3.2.1.). Tüm dokular Bouins fiksatifinde fikse edilerek, parafin bloklar hazırlanmıştır.

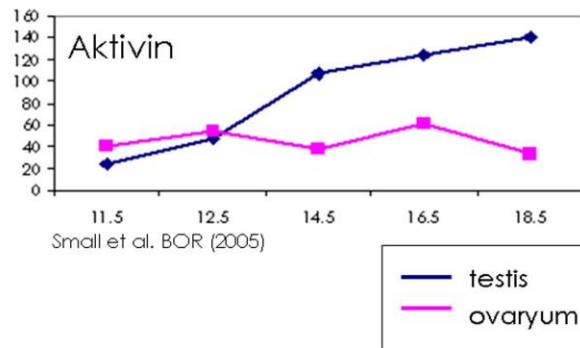


Şekil 3.2.1. Dibütilfitalat (DBP)'ye maruz kalmış sıçan testis modeli şematik şekli.

DBP uygulaması sonucu bozulan germ hücre gelişiminde, Hh sinyal yolağı elemanları aktivitesini araştırmak amacıyla, bu modele ait testis dokularında *in situ* hibridizasyon yöntemiyle *Dhh*, *Ptc2*, *Gli1*, *Gli2* ve *SuFu* mRNA ve immünohistokimya yöntemiyle Vasa ve PCNA proteinlerinin ekspresyonlarına bakılmıştır.

### 3.3. Aktivin Knock-Out (*Inhba*<sup>-/-</sup>) Fare Testis Modeli

Aktivin, Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) süperaillesinin bir üyesi olup, spermatogenezin ilk dalgasında önemli role sahiptir. Aktivin (*Inhba*), en fazla fetal dönemde eksprese olmakta ve farelerde E16.5'den başlayarak ekspresyonu artarak en yüksek düzeyine, doğumdan sonraki bir hafta içerisinde ulaşmaktadır (154) (Şekil 3.3.1.). Aktivin, embriyonik dönemde gonositlerin, fazla proliferasyonunu engellemek amacıyla, sessizlik fazında tutulmalarını sağlarken, doğum sonrasında aktivin ekspresyonu, gonositlerin spermatogoniya'ya farklılaşmasını indüklemektedir. Aktivin transgenik fare modelinde, aktivin'in yokluğunda, germ hücre sayısı artış göstermekte ve Sertoli hücre sayısı azalmaktadır (155). Bu modelde, Hh sinyal yolağının, aktivin'in yokluğundan nasıl etkilendiğinin araştırılması amaçlanmıştır.



Şekil 3.3.1. Fetal dönemde aktivin ekspresyonu. Aktivin, fetal testiste E16.5'den, doğum sonrası ilk haftaya kadar olan zaman aralığında yoğun şekilde eksprese olmaktadır.

Bu modele ait testis doku örnekleri Baylor College of Medicine, Houston, Texas'dan Dr. Martin Matzuk laboratuvarından temin edilmiştir (156, 157).

C57BL6/J türü farelerde embriyonik kök hücre teknolojisi kullanılarak oluşturulan *Inhba*<sup>-/-</sup> farelerde, *Inhba* geni bulunmamakta, bu hayvanlarda Aktivin A üretilmemekte ve bu hayvanlar çeşitli doğum defektlerinden dolayı doğumun 0. gününde ölmektedir. Çalışmamızda, aktivin geni çıkarılmış farelerden, E13.5'de, E17.5'de ve doğumun 0. gününde (D0) testis dokuları elde edilmiştir. Tüm dokular Bouins fiksatifinde fikse edilerek, parafin bloklar hazırlanmıştır.

Aktivin knock-out ve vahşi tip fare testis dokularında, Hh sinyal yolağı elemanlarından *Gli1* ve *SuFu* mRNA ekspresyon aktiviteleri *in situ* hibridizasyon yöntemiyle araştırıldı.

### 3.4. Patolojik İnsan Testis Neoplazma Doku Örnekleri

*In situ* hibridizasyon analizleri için kullanılan patolojik neoplazma insan testis örnekleri (non-seminoma, seminoma ve CIS), Copenhagen Üniversitesi Patoloji bölümündeki Dr. Ewa Rajpert-De Meyts'den elde edildi. Tümör örneklerinde, CIS hücrelerinin varlığı, De Meyts laboratuvarındaki patologlar tarafından, Plasental-like alkalın fosfataz (PLAP) antikoru ile immünohistokimyasal olarak belirlenerek, teyid edildi (158). İnsan tümör dokularının temini ve bilimsel çalışmalarda kullanılması için gerekli izin, Danimarka Tıbbi Araştırma Etik Komitesinden alınmıştır.

### 3.5. Seminifer Tübül Damla Kültürü

Damla kültür, gonad gelişiminde eksojen moleküllerin etkisinin çalışılabilmesi için ideal bir sistemdir (83, 149). Bu yöntemde, Hh sinyal yolağının inhibitörü (cyclopamine) kültür sistemine eklenerek, seminifer tübül parçaları cyclopamine varlığında ve yokluğunda kültüre edildikten sonra, Real Time-PCR yöntemiyle Hh hedef genlerinin nasıl etkilendiği belirlendi. Bu yöntem kısaca aşağıdaki gibi gerçekleştirildi;

Postnatal 1. gününde olan CBAxC57B16 F1 erkek fareler, dekapasitasyonla öldürüldü, testis dokuları mikrodiseksiyon yöntemiyle çıkarıldıktan sonra 1x PBS'e yerleştirildi ve dekapsüle edildi. İnce makas yardımıyla seminifer tübüllerden kısa parçalar, kesilerek elde edildi (Şekil 3.5.1).

Kültür için, iki farklı kültür medyumu hazırlandı:

Deney grupları için, %0.1 oranında Bovine Serum Albumin (BSA, Sigma, A8412) ve Dulbecco's Minimal Eagle Medyum (DMEM, Gibco, 11054-020)'dan oluşan medyum içerisine Hh sinyal yolağı inhibitörü olan cyclopamine (Calbiochem, San Diego, CA, USA), 25 µM konsantrasyonda eklendi. Cyclopamine konsantrasyonu, daha önceki fare embriyonik gonad kültürler çalışmalarına dayanılarak belirlendi (83, 149).

Kontrol grupları için ise, yine %0.1 oranında BSA ve DMEM'den oluşan medyum içerisinde cyclopamine yerine, aynı miktarda etanol eklendi (cyclopamine, etanolde çözüldüğü için).

Hazırlanan medyumlar (cyclopamine içeren medyum veya etanol içeren medyum), 90mm x 14mm boyutlarındaki Petri kaplarının kapak kısımlarına, pipet yardımıyla ve 30µl olacak şekilde, damla yapıldı. Her bir kapağa yaklaşık 20 damla yapıldı. Kesilen seminifer tübül parçaları bu damlalara dikkatlice yerleştirildi. Tübül parçaları, damlalara yerleştirildikten sonra kapak dikkatlice ters çevrildi. Petri kabının alt kısmı, damlaların buharlaşmasını önlemek amacıyla, 50 ml distile su ile dolduruldu. Damla içerisindeki seminifer tübüller, 24 saat boyunca 37°C de, %5 CO<sub>2</sub> etüvde kültüre edildi. 24 saat sonunda seminifer tübüller toplanarak Real time PCR için RNA ekstraksiyonu yapılana kadar -80° de bekletildi.



Şekil 3.5.1. Seminifer tübül damla kültürü yöntemi.

### 3.5.1. Kantitatif Real Time-PCR (qRT-PCR)

Cyclopamine'in ortamda bulunduğu (deney) ve bulunmadığı (kontrol) kültür medyumlarında 24 saat süreyle kültüre edilmiş olan postnatal 1. gündeki farelere ait testis tübül parçalarından, ilk olarak RNA izole edildi. Total RNA, RNeasy extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany) kullanılarak elde edildi. Kontamine olan DNA ise DNA-free kit (Ambion, Austin, TX, USA) kullanılarak temizlendi. RNA'nın kantifikasyonu, Quant-iT RiboGreen RNA Assay Kit (Molecular Probes, Invitrogen) kullanılarak yapıldı. Komplementer DNA ise Superscript III Reverse Transcriptase (Life Technologies, Grand Island, NY) ve random hexamer primerleri kullanılarak elde edildi.

Her bir 10 µl RT reaksiyonu için, 5 µl Roche Diagnostics (Castle Hill, NSW, Australia) SYBR Green PCR Mix, 1 µl (10pmol/ul) hedef genlere ait forward ve reverse primerler, 2 µl kalıp cDNA ve 2 µl DEPC H<sub>2</sub>O eklenerek kuruldu.

Kurulan bu reaksiyon 7900HT real-time system (Applied Biosystems) makinasında sırasıyla 95° 10 dakika, 95° 15 saniye, 62° 30 saniye ve 72° 30 saniye sürelerle ve 45 siklus olmak üzere yürütüldü. Her bir reaksiyon üç defa tekrarlandı ve

negatif kontrol olarak kalıp DNA yerine distile su konularak amplifikasyonun doğruluğu tespit edildi. Hedef genlere ait mRNA'ların normalizasyonu için 18S RNA kullanıldı. Amplifiye olan ürünler melting curve analizi ile kontrol edildi. İstatistiksel analiz, student's unpaired t test ile yapıldı. Kontrol dokuların hedef mRNA değerleri, 1 olarak kabul edildi ve deney grupları ile farklılıklar 1 değerinden kaç kat arttığı ya da azaldığı şeklinde hesaplandı. Yapılan çalışmada, 6 hayvanın ortalama değeri alınarak bulgular elde edildi. RT-PCR reaksiyonunda kullanılan primerler aşağıdaki gibidir:

*Gli1* F 5'-cttcaccctgccatgaaact-3'; R 5'-tccagctgagtggttccag-3'  
*SCYP3* F 5'-gaaatctgggaagccacctt-3'; R 5'-ggcttgaaagaagcttgg-3'  
*Stra8* F 5'-tggatgacctcgtgttatgc-3'; R 5'-tcagatgccaccataaagtcc-3'  
*18s* F 5'-gtaaccctggaacccatt-3'; R 5'-ccatccaatcggtagtagcg-3'

### 3.6. In Situ Hibridizasyon ve Probların Hazırlanması

İn situ hibridizasyon tekniği, parafin kesitlerde hedef mRNA ekspresyonunun araştırılması için kullanıldı. İlerleyen bölümlerde (Bölümler, 3.6.1.-3.6.1.6.) ilk önce in situ hibridizasyon tekniğinde kullanılan hedef mRNA'ların (Prob), nasıl hazırlandığı ve in situ hibridizasyon protokolü anlatılacaktır.

#### 3.6.1. cDNA'ların DIG ile İşaretlenmesi Öncesi PCR ile Elde Edilmeleri

Bu metod ile SP6 ve T7 polimeraz promoterlarıyla işaretli PCR ürünü elde edildi. cDNA'ların DIG ile işaretlenmesi öncesinde yapılan işlemler aşağıda verildi.

##### 3.6.1.1. Dizayn Edilen Primerlerden PCR Ürünü Elde Edilmesi

- 1) <http://frodo.wi.mit.edu/> internet sitesinden yararlanılarak aşağıda belirtilen primerler dizayn edildi.

*Dhh* F 5'-ggagagccagtgggacaag-3'; R 5'-ggggttgtagttgggtacga-3'  
*Ptc2* F 5'-ggggttccccttattgaaaa-3'; R 5'-actcagctcctgagccacat-3'  
*Smo* F 5'-ttcccgcactaacctaatgg-3'; R 5'-cagaagcaagggtcctgaag-3'  
*Gli1* F 5'-cttcaccctgccatgaaact-3'; R 5'-tccagctgagtggttccag-3'  
*Gli2* F 5'-cagcaggacagctaccaaca-3'; R 5'-tggctgaggagctagggata-3'  
*Gli3* F 5'-tgccatcagctactcagtg-3'; R 5'-accctgctgctgactcat-3'  
*Fu* F 5'-gtgccctacaaagtgccaat-3'; R 5'-cccgcatttcaatctct-3'  
*SuFu* F: 5'-accaagtggattggctttg-3'; R: 5'-gttcactggtgggctgaat-3'

- 2) Primerler, 10mM Tris içerisinde resüspanse edilerek stok solüsyonu elde edildi. (Ph:8.5; primerlere nmol değerleri ile eşit hacimde Tris eklenerek işlem gerçekleştirildi).
- 3) PCR reaksiyonu için, stok solüsyon 2 µl stok + 198 µl distile su olacak şekilde dilue edildi.
- 4) Primerlerin çoğaltılması amacıyla, PCR reaksiyonu aşağıda belirtildiği şekilde kuruldu:



10x Tampon .....	2 µl
2mM dNTPs.....	2 µl
Forward primer.....	2 µl
Reverse primer.....	2 µl
Tag.....	0,25 µl
Distile su.....	10,75 µl
Kalıp cDNA.....	1 µl
Toplam reaksiyon.....	20 µl

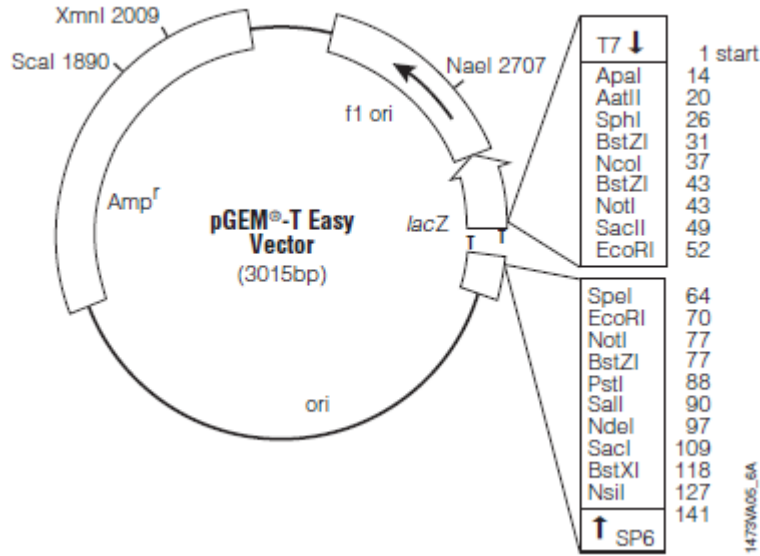
PCR Siklusu (40 siklus):

94 °C.....	5 dakika
94 °C.....	30 saniye
60 °C .....	30 saniye
72 °C.....	7 dakika
15 °C.....	sonsuz

olacak şekilde kuruldu ve agaroz jel elektroforezi yapıldı.

Agaroz jel elektroforezinde % 1-2 agaroz jel kullanıldı. Bu jel, 1 x TAE Tamponu ve 0.1 µg/ml etidiyum bromid kullanılarak hazırlandı. Örnekler yüklemeye boyası (%50 gliserol, Orange G boyası) eklendikten sonra 80-100 V'da DNA fragmanları ayrılana dek yürütüldü.

- 5) PCR ürünü, UV ışığı altında yürütme jelinden UV ışığı altında kesildi ve ependorf tüpüne alındı (PCR ürünü, gerektiğinde -20<sup>0</sup>C'de kullanılma zamanına kadar bekletildi).
- 6) Agaroz jelden DNA ekstraksiyonu için JetSorb gel extraction kit (GenoMed, St Louis, MO) kullanıldı.
- 7) DNA konsantrasyonu, 260nm spektrofotometrede okunarak pGEM-T Easy (Promega) vektörüne klonlandı. pGEM-T Easy Vektör, sekans referans noktaları ile birlikte Şekil 3.6.1.1.1'de gösterildi.



Şekil 3.6.1.1.1. pGEM-T Easy Vektörü sekans referans noktaları.

### 3.6.1.2. PCR Ürününün pGEM-T Easy Vektörüne Klonlanması

PCR ürününün pGEM-T Easy vektörüne klonlanması işleminde, Promega pGEM-T Easy kit (Promega, A1360, Madison, USA) kullanıldı. Reaksiyon aşağıda belirtildiği şekilde kuruldu:

2x Ligasyon Tamponu....	5µl
pGEM-T Easy 50 ng/ul...	0.5µl
PCR ürünü .....	2.5µl
T4 DNA ligaz .....	0.5µl
H <sub>2</sub> O .....	5 µl

Tüm bu kimyasallar belirtilen oranlarda karıştırıldı ve +4° C’de geceboyu inkübe edildi.

### 3.6.1.3. pGEM-T Easy Vektörün E.Coli DH5α Bakterisine Transformasyonu

- 1) 1-2 µl Vektör, DH5α hücrelerinin bulunduğu ependorf konuldu ve ependorf 30 dakika buz üzerinde bekletildi (Bu işlem, bakterinin hücre zarında delikler açılmasını ve vektörün bakteri içerisine girmesini sağlar).
- 2) Hücreler, 45-50 saniye 42°C’de olan ısı tablasında şok edildi (Bu işlem bakterideki delikleri kapatır)
- 3) Ependorflar tekrar 2 dakika buz üzerine alındı ve 250µl LB/Ampisilin medyumuna eklenerek 37°C’de 60 dakika boyunca çalkalanarak inkübe edildi.
- 4) Daha önceden hazırlanan LB/Ampisilin/X-Gal kültür kaplarına yayıldı ve 37°C’de gece boyu inkübe edildi.

LB/Ampisilin'in hazırlanışı:

NaCl:	10gr
Tripton:	10 gr
Maya:	5 gr.
Distile su:	1 litre olana kadar

LB/Ampisilin Agar hazırlanışı:

LB/Ampisilin:	500 ml
Agar:	7.5 gr

Bu karışım önce otoklavlandı ve daha sonra hücre kültür kaplarına boşaltılarak 37°C'lik etüvde kurutuldu.

**3.6.1.4. Vektör İçeren Bakteri Kolonisinin Belirlenmesi**

LB-Ampisilinli kültür kaplarında bulunan bakteri kolonilerinden hangisinin vektörü içerdiğini belirlemek için seçilen kolonilere PCR kuruldu.

**PCR reaksiyonu:**

10 x Tampon .....	2µl
10 x dNTP .....	2 µl
F primer .....	1 µl
R primer .....	1 µl
Taq polymeraz .....	0,1 µl
Kalıp DNA .....	(pipet ucuyla)
H <sub>2</sub> O .....	20 µl olan kadar

94 °C, 30 saniye

58°C, 30 saniye

72°C, 30 saniye

72°C, 5 dakika

35 siklus olacak şekilde thermal cyclus ayarlandı.

PCR reaksiyonu sonrasında yaklaşık 500 kb'lik bantta bulunan kolonilerin kullanılan vektörü içermesi beklendiğinden, 500 kb'lik bantta bulunan koloniler, LB/Ampisilin kültür kaplarına ekilerek 37°C'de geceboyu inkübe edildi (saf kültür).

**3.6.1.5. Vektörümüzün Bakteriden Uzaklaştırılması (Miniprep) ve Sekans Analizi**

Bir gün sonra, saf kültürden alınan her bir koloni, 5ml LB ve 5µl Ampisilin içeren, 15 ml falkon tüpüne konuldu ve 37°C'de gece boyu inkübe edildi. Bu inkübasyon sonrasında, saf kültürün bir kısmı, daha sonra kullanılmak üzere gliserol stok (400µl kültür + 400 µl %80 gliserol) şeklinde -80°C'de saklandı. Saf kültürün bir

kısmı ise Qiagen miniprep kit (QIAprep Spin Miniprep Kit, Cat #27104) kullanılarak, Vektörün, bakterilerden ayrıştırılması gerçekleştirildi. Bu işlem sonrasında, M13F + R primerler kullanılarak PCR reaksiyonu (large scale-50-100µl) ve sekans analizi yapıldı. DNA miktarı spektrofotometre yardımıyla ölçüldü.

M13R primer sekansı :-5' GGAAACAGCTATGACCATG

M13F primer sekansı :-5'GTAAAACGACGGCCAGT

### 3.6.1.6. Riboprobaların DIG-ile İşaretlenmesi

Bu işlem ile PCR ürünü, DIG ile işaretli RNA'ya çevrildi. Reaksiyon aşağıda verildiği şekilde kuruldu:

20µl Reaksiyonda (Promega):

DEPC'li H<sub>2</sub>O .....Xµl  
5X transkripsiyon tamponu...4µl  
DTT(100mM).....2µl  
10X DIG-mix..... 2µl  
Rnasin (40U/l).....0.5µl  
T7, SP6 RNA polimeraz..... 2µl  
PCR ürünü.....300ng

Tüm bu kimyasallar ependorf tüpünde karıştırıldıktan sonra sırasıyla aşağıdaki işlemlerden geçti:

- 1) 37°C'de 2 saat inkübe edildi.
- 2) Her bir 20µl reaksiyon için: 2.0µl 0.2M EDTA (Ph 8.0),  
2.5µl 4M LiCl,  
75µl %100 EtOH eklendi.
- 3) -20°C'de geceboyu inkübe edildi.
- 4) Ertesi gün, +4°C'de, max rpm'de 20 dakika santrifüj edildi.
- 5) Santrifükasyondan sonra, süpernatant atıldı ve 300 µl %80 EtOH eklenerek 5 dakika +4°C'de santrifüj edildi.
- 6) Santrifükasyondan sonra, EtOH atıldı ve kalan pellet, 100µl DEPC H<sub>2</sub>O'de çözdürüldü.
- 7) 100µl DEPC H<sub>2</sub>O'da çözdürülen pellete, 1µl Rnasin eklendikten sonra Dot Blot işlemine başlandı.

### 3.6.1.7. Dot Blot Protokolü

- 1) Her bir prob, 1:100'den 1:12.5'e kadar DEPC H<sub>2</sub>O'da dilue edildi ve DIG-işaretli kontrol RNA hazırlandı.
- 2) Hybond XL membranına her bir dilüsyondan 1.5µl damlatıldı.
- 3) Membranın 2 dakika yüksek dereceli mikrodalgada kurutuldu.
- 4) Membran, 8-10 ml bloklama solüsyonu ile 30 dakika inkübe edildi.
- 5) Membranın bulunduğu bloklama solüsyonuna 8-10 ml bloklama solüsyonu daha eklendi ve 4 µl anti-DIG antikor eklenerek 30 dakika oda ısısında inkübe edildi.
- 6) Buffer 1 de yıkama yapıldı (2 defa 10'ar dakika).

- 7) Alimünyum folyo ile kapalı tutulacak şekilde, 10 ml BCIP/NBT geliştirme solüsyonu ile reaksiyon sağlandı.

### 3.6.2. İn Situ Hibridizasyon Protokolü

- 1) İn situ hibridizasyonda kullanılacak olan bütün kaplar, ilk önce yıkama solüsyonu ile, daha sonrada DEPC H<sub>2</sub>O ile yıkandı,
- 2) Superfrost lamlarda bulunan kesitler Histosolden geçirildi (2defa 10'ar dakika),
- 3) Yükselen etanol serilerinden geçirilerek Rehidrate edildi,
- 4) 0.2 M HCL'de yıkandı (20 dakika),
- 5) DEPC H<sub>2</sub>O'da yıkandı (2 defa 5'er dakika),
- 6) Pap-pen ile çizildi,
- 7) Proteinaz K enzimi ile inkübe edildi (30 dakika, 37°C'de),
- 8) %0.2 glisin solüsyonunda yıkandı (10 dakika, oda ısısı),
- 9) 0.1 TEA solüsyonunda inkübe edildi (5 dakika),
- 10) DEPC H<sub>2</sub>O'da yıkandı (2 defa 5'er dakika),
- 11) 150 µl prehibridizasyon solüsyonuyla inkübe edildi (2 saat, 60°C),
- 12) Probumuz ile inkübe edilmesi (gece boyu, 60°C; diluent, hibridizasyon solüsyonu),
- 13) 2X SSC solüsyonunda yıkandı (Oda ısısı, 15 dakika),
- 14) Sırasıyla, 2X SSC, 1X SSC ve 0.1X SSC'de yıkandı (60 derece, 15'er dakika),
- 15) Buffer 1'de yıkandı (Oda ısısı, 15 dakika),
- 16) Kesitlerdeki reaksiyon, BCIP/NBT solüsyonunda karanlıkta geliştirildi,
- 17) Kesitlerdeki reaksiyon, çeşme suyu ile yıkama sonucu durduruldu,
- 18) Hematoksilen ile zıt boyama yapıldı,
- 19) Distile suda yıkandı (2 dakika),
- 20) Çeşme suyunda yıkandı (2 dakika),
- 21) Distile suya tekrar alındı ve Aqueous kapatma solüsyonuyla kapatılarak fotoğraflandırıldı.

### İN SITU HİBRİDİZASYONDA KULLANILAN SOLÜSYONLAR

10x Bloklama Solüsyonu: 10 gr Bloklama solüsyon tozu + 100 ml Buffer 1

Buffer 1 (pH:7.5): 4.5 L distile su  
58.5 gr Maleik Asit  
43.6 gr Sodyum Klorid

DIF: 500 ml Formamide (Sigma, 221198)  
25 gr Mixed Bed Resin (Biorad, 142-6425)

50x Denhard's Solüsyonu: 300 ml distile su  
2 gr Fikol (%1 w/v)  
3 gr Sığır Serum Albumini (%1 w/v)

DEPC H<sub>2</sub>O: 1 L distile su  
1 ml %97 DEPC

0.5 EDTA (pH:8.0): 800ml distile su

186.1gr EDTA  
Solüsyon, distile su ile 1L'e tamamlandı

20X PBS: 900 ml distile su  
170 gr Sodyum Klorür  
21.4 gr  $NA_2HPO_4$   
7.8 gr  $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$   
Solüsyon, distile su ile 2L'e tamamlandı

Yıkama Solüsyonu: 0.8 L distile su  
4 gr NaOH  
2 ml 0.5 M EDTA  
Solüsyon, distile su ile 1L'e tamamlandı

20X SSC: 1.8 L distile su  
350.6 gr Sodyum Klorid  
176.5 gr Tri-Sodyum Sitrat  
Solüsyon, distile su ile 2L'e tamamlandı

10x TE (TrisEdta) tamponu: 50 ml 1M Tris HCl  
20ml 0.5M EDTA  
Solüsyon, distile su ile 1L'e tamamlandı

### 3.7. İmmünohistokimya

İmmünohistokimya işlemi, daha önceki çalışmalarda yapıldığı gibi (159) uygulandı. Sırasıyla aşağıdaki işlemler gerçekleştirildi:

- 1) Kesitler, rehidrate edildi;  
Ksilol (2 defa 5'er dakika),  
%100 etanol (1 defa 5 dakika),  
%95 etanol (1 defa 5 dakika),  
%70 etanol (1 defa 5 dakika),  
Çeşme suyu ile yıkama (1 defa 5 dakika)  
Distile suda yıkama (1 defa 5 dakika)
- 2) Kesitler, 50 mM Glisin solüsyonu içerisinde 2 dakika 30 saniye yüksek ısı, 7 dakika 30 saniye düşük ısı olmak koşuluyla mikrodalgada kaynatılarak antijenlerin açığa çıkması sağlandı. Bu işlem sonrasında kesitler, oda ısında 20 dakika soğutuldu,
- 3) Distile suda yıkandı (1 defa 5 dakika) ve kesitlerin çevresi, suya dayanıklı kalem (pap-pen) ile çizildi,
- 4) Kesitlerdeki endojen peroksidaz aktivitesini bloklamak için %3 hidrojen peroksit uygulandı (5 dakika; diluent, metanol),
- 5) Distile su ile yıkandı (1 defa 5 dakika),
- 6) TBS ile yıkandı (2 defa 5'er dakika),

- 7) Spesifik olmayan bağlanmaları önlemek amacıyla TB (TBS+%0.1BSA)'de dilue edilen %5'lik normal serum uygulandı. Normal serum seçimi, sekonder antikorun üretildiği hayvana göre belirlendi (20 dakika, oda ısısı),
- 8) Aşağıda belirtilen belirteçlerin belirlenmesi için birinci antikor inkübasyonu yapıldı (oda ısısı, gece boyu; diluent, TB),
  - Germ hücre belirteci için, Rabbit anti-Vasa:(ab13840; Abcam ,dilüsyon 1:1000)
  - Proliferasyon belirteci için, Mouse anti-Proliferating Cell Nuclear Antijen (PCNA), (M0879; DAKO, dilüsyon 1:1000)
  - Sertoli hücre belirteci için, Goat anti-Müllerian Hormon (AMH) (sc, 6886, Santa Cruz, dilüsyon 1:1000)

Negatif kontroller, primer antikorun bulunmadığı TB solüsyonunda inkübe edilerek gerçekleştirildi.

- 9) Ertesi gün, 1XTBS solüsyonunda yıkama yapıldı (3 defa 5'er dakika),
- 10) Kesitler, 1:500 dilüsyonda aşağıda belirtilen ikinci antikorlar ile inkübe edildi (1 saat, oda ısısı; diluent:TB):
  - Vasa için, Biotinylated Goat Anti-Rabbit IgG (BA-1000, Vector lab. 1:500)
  - PCNA için; Biotinylated Goat Anti-Mouse IgG (BA-9200, Vector lab. 1:500)
  - AMH için; Biotinylated Rabbit Anti-Goat IgG (BA-5000, Vector lab. 1:500)
- 11) 1XTBS solüsyonunda yıkama yapıldı (3 defa 5'er dakika),
- 12) Üretici firmanın tavsiye ettiği şekilde kesitler, Vectastain Elite ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA) ile muamele edildi (1 saat oda ısısı),
- 13) 1XTBS solüsyonunda yıkama yapıldı (3 defa 5'er dakika),
- 14) Reaksiyonun görülebilmesi için kesitler DAB (Sigma, D5905, Sigma-Aldrich Company Ltd, Gillingham, UK) ile inkübe edildi,
- 15) Distile suda 5 dakika yıkama yapıldı,
- 16) Kesitlere Harris Hematoksilen ile zıt boyama yapıldı,
- 17) Çeşme suyunda 5 dakika yıkama yapıldı,
- 18) Kesitler, aşağıdaki solüsyonlardan geçirilerek dehidrate edildi:
  - %70 etanol (1 defa 5 dakika),
  - %95 etanol (1 defa 5 dakika),
  - %100 etanol (2 defa 5'er dakika),
  - Ksilol (2 defa 5'er dakika).
- 19) Kesitler, Depex (BDH Laboratories, Poole, UK) kapatma solüsyonu ile kapatılarak fotoğraflandırıldı.

### **İmmünohistokimiyada Kullanılan Solüsyonlar**

<u>10X TBS (Ph:7.5):</u>	242gr Tris (60.55g/l; 0.5µ)
	350 gr NaCl (87.66g/l;1.5µ)
	4 lt distile su

<u>1X TBS:</u>	100 $\mu$ l 10X TBS + 900 $\mu$ l distile su
<u>TB:</u>	50 ml 1XTBS + 0.05gr BSA
<u>Glisin (Ph:3.5):</u>	1 lt distile su + 3.75 gr glisin



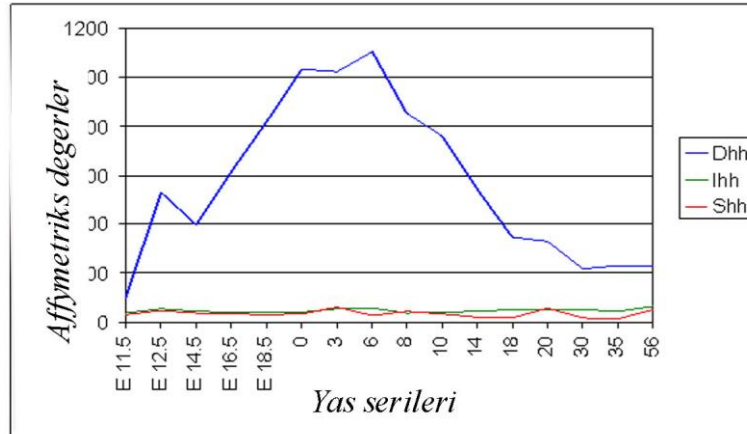
## BULGULAR

### 4.1. Yetişkin Sıçan Testisinde Hh Sinyal Yolağı mRNA Ekspresyonu

İlerleyen bölümlerde (Bölüm 4.1.1. ve 4.1.2.), normal yetişkin sıçan testisinde, Hh sinyal yolağı elemanlarının ekspresyonları gösterildi. Hh sinyal yolağında; Dhh, ligand; Ptc2 ve Smo, reseptörler; Gli1, Gli2 ve Gli3, transkripsiyon faktörleri; Fu ve SuFu, sitoplazmik düzenleyicileri temsil etmektedir. Bu bölüme ait tüm bulgular, Şekil 4.1.1.'de şematize edildi.

#### 4.1.1. Yetişkin Sıçan Testisinde Hh Sinyal Yolağı, Ligand-Reseptör mRNA Ekspresyonu

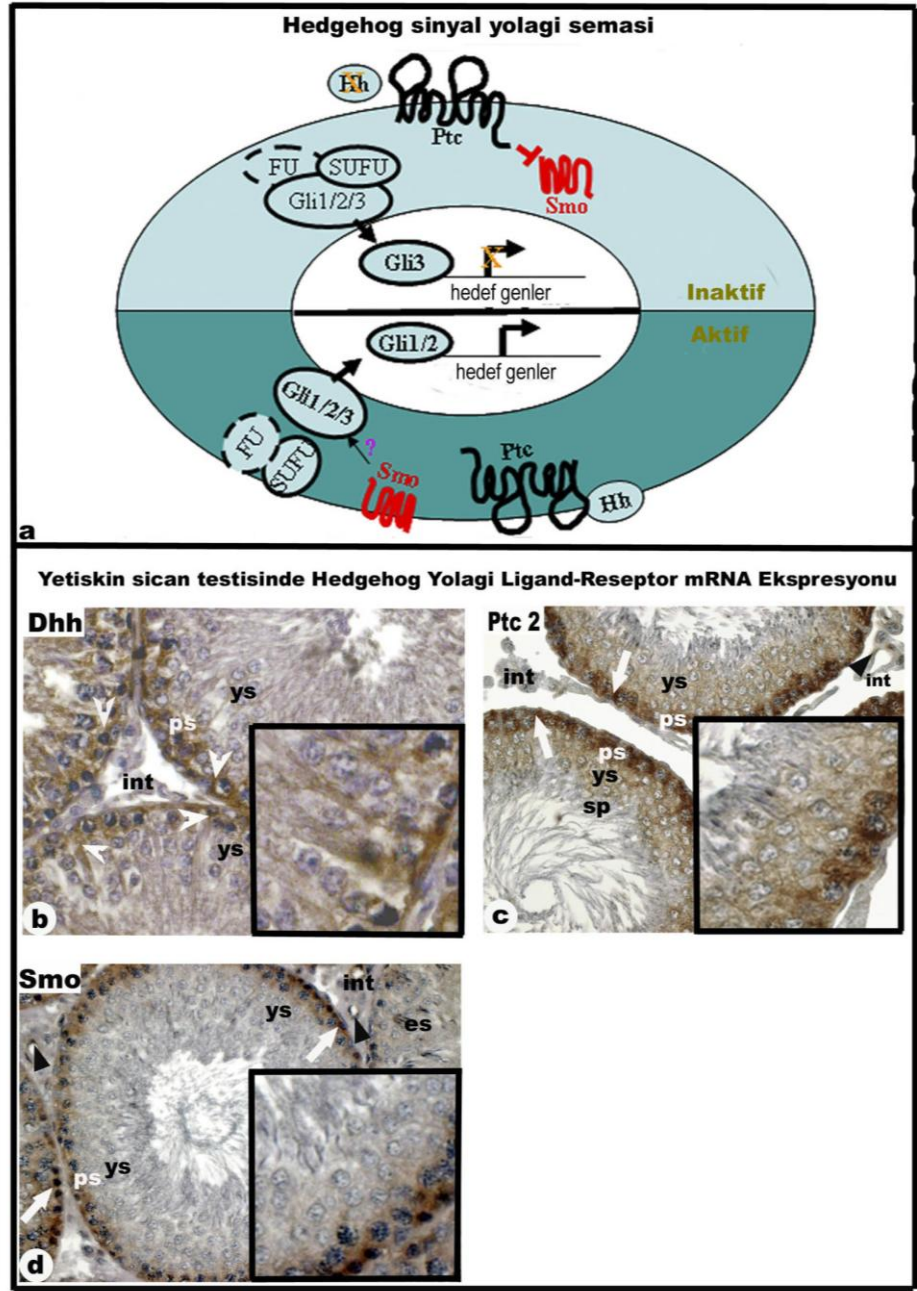
Daha önce yapılan mikroarray veri sonuçları, üç memeli Hedgehog ligandından (*Dhh*, *Ihh*, *Shh*) yalnızca Desert Hedgehog (*Dhh*)'in memeli testisinde eksprese olduğunu gösterdi (160, 161) (Şekil 4.1.1.1.). Bu nedenle bu tez çalışmasında, 3 Hh ligandından yalnızca *Dhh* ligandının ekspresyonu çalışıldı.



Şekil 4.1.1.1. Memeli testisinde *Dhh* ekspresyonu. *Dhh*, testiste eksprese olan Hh ligandır. *Dhh*: Desert Hedgehog; *Ihh*: Indian Hedgehog; *Shh*: Sonic Hedgehog; E: Embriyonik gün.

Şekil 4.1.1.2.a'da Dhh sinyal yolağı şematize edildi; ortamda Hh ligandı bulunmadığında, yolağın reseptörü olan Ptc, Smo'nun aktivitesini baskılamakta ve bu durumda Gli transkripsiyon faktörleri, sitoplazmada SuFu'ya bağlı kalarak nükleusta hedef genlerin aktivitesini gerçekleştirememektedir. Ortamda Hh ligandı bulunduğunda Ptc, Hh ligandına bağlanmakta böylelikle, Smo serbest kalarak aktif hale gelmekte ve Gli transkripsiyon faktörleri nükleusa giderek hedef genlerin aktivitesini başlatmaktadır.

Yetişkin sıçan testisinde, in situ hibridizasyon tekniğı kullanarak yaptığımız analiz sonuçları, Şekil 4.1.1.2.b-d'de gösterildi. Bu sonuçlara göre, *Dhh*'yi kodlayan mRNA, Sertoli hücrelerinde bulundu (Şekil 4.1.1.2.b). Bir transmembran reseptör olan *Ptc2*'yi kodlayan mRNA ekspresyonu ise spermatogoniya, spermatositler ve yuvarlak spermatidlerde gözlemlendi (Şekil 4.1.1.2.c). *Smo*'yu kodlayan mRNA ekspresyonu ise spermatogoniya ve spermatositlerde gözlenmiş olup yuvarlak spermatidlerde ve bazı interstisiyel alanlarda da zayıf bir ekspresyon mevcuttu (Şekil 4.1.1.2.d).

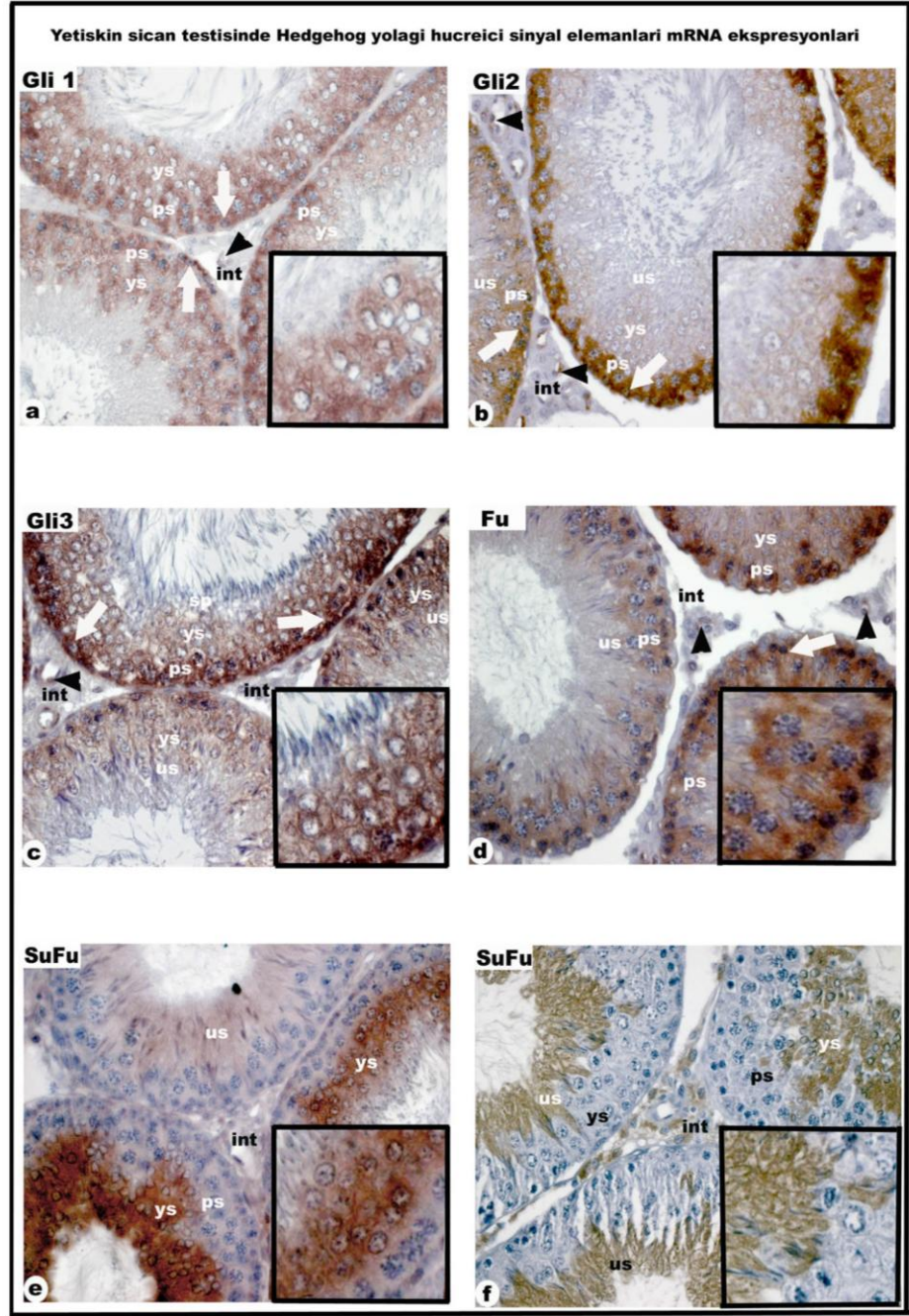


**Şekil 4.1.1.2.** Yetişkin sıçan testisinde Hh sinyal yoluğı, ligand ve reseptör mRNA ekspresyonu. **a.** Hh sinyal yoluğı şematik şekli. **b.** *Dhh* ligandı mRNA'sı, Sertoli hücrelerinde eksprese olmaktadır (ok başları); **c.** *Ptc2* mRNA'sı ve **d.** *Smo* mRNA'sı, yoğun olarak spermatogoniya (oklar) ve spermatositlerde (ps) ve daha az yoğun olarak da yuvarlak spermatidlerde (ys). *Ptc2* ve *Smo* sinyali, interstisiyel alandaki endotelial hücrelerde de görülmektedir (siyah okbaşı). Beyaz ok başı, Sertoli hücresi; Siyah ok başı, endotelial hücre; oklar, spermatogoniya; ps, pakiten spermatosit; ys, yuvarlak spermatid; sp, sperm; int, interstisiyum. Büyütmeler; x40; küçük kareler, x100.

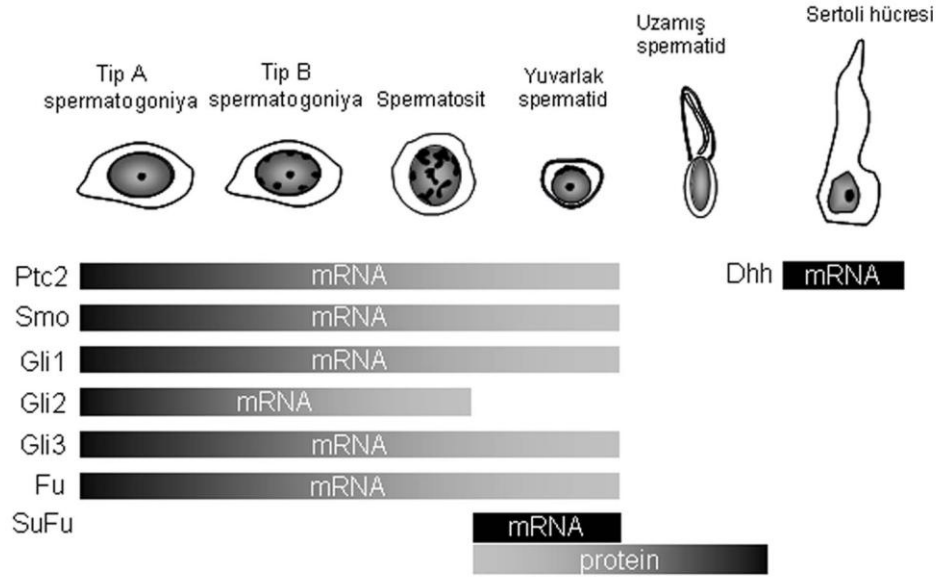
#### 4.1.2. Yetişkin Sıçan Testisinde, Hh Sinyal Yolağı, Hücreiçi Sinyal Elemanları mRNA Ekspresyonu

Yetişkin sıçan testisi in situ hibridizasyon analizi sonuçlarına göre; *Gli1*'i kodlayan mRNA ekspresyonu spermatogoniyada, spermatositlerde ve yuvarlak spermatidlerde gözlemlendi (Şekil 4.1.2.1.a). *Gli2*'yi kodlayan mRNA ekspresyonu yoğun olarak spermatogoniya ve spermatositlerde gözlemlendi. Bununla birlikte, yuvarlak spermatidlerde de zayıf bir ekspresyon mevcuttu (Şekil 4.1.2.1.b). *Gli3*'ü kodlayan mRNA, spermatogoniya, spermatositler ve yuvarlak spermatidlerde mevcuttu (Şekil 4.1.2.1.c).

*Fu* mRNA ekspresyonu spermatogoniyada, spermatositlerde ve yuvarlak spermatidlerde (Şekil 4.1.2.1.d). Yolağın diğer elemanlarının aksine, güçlü bir *SuFu* sinyali yuvarlak spermatidlerde ve daha az yoğun olmak üzere uzamış spermatidlerde gözlemlendi (Şekil 4.1.2.1.e). SuFu proteini de yuvarlak spermatidlerde ve uzamış spermatidlerde mevcuttu (Şekil 4.1.2.1.f).



**Şekil 4.1.2.1.** Yetişkin sıçan testisinde Hh sinyal yolu, hücre içi sinyal elemanları mRNA ekspresyonu. *Gli1* mRNA'sı (a) ve *Gli3* mRNA'sı (c) spermatogoniya (oklar), spermatozoid (ps) ve yuvarlak spermatidlerde (ys) ekspresyon olmaktadır, *Gli2* mRNA'sı (b), spermatogoniyalarda (oklar) ve spermatozoidlerde (ps), az yoğun olarak da yuvarlak spermatidlerde (ys) ekspresyon olmaktadır. *Fu* mRNA'sı (d), spermatogoniyalarda (oklar), spermatozoidlerde (ps) ve az yoğun olarak da yuvarlak spermatidlerde (ys). Negatif regülatör, *SuFu* mRNA'sı (e), yuvarlak spermatidlerde (ys) ve uzamış spermatidlerde (us). SuFu proteini (f), yuvarlak spermatidlerde (ys) ve uzamış spermatidlerde (us). *Gli2*, *Gli3* ve *Fu* mRNA'ları interstisyel alandaki endotelial hücrelerde de pozitifdir (ok başları). Ok başları, endotelial hücreler; Oklar, spermatogonyum; ps, pakiten spermatozoid; ys, yuvarlak spermatid; us, uzamış spermatid; int, interstisyum. Büyütmeler; x40; küçük kareler, x100.



**Şekil 4.1.1.** Yetişkin sıçan testisinde Hh sinyal yolağı ekspresyonu. *Dhh* ligandını kodlayan mRNA Sertoli hücrelerinde iken Hh reseptörlerini kodlayan mRNA'lar (*Ptc2* ve *Smo*), sitoplazmik regülatörler (*Fu*, *SuFu*) ve *Gli* transkripsiyon faktörleri, germ hücrelerinde bulunmaktadır. *Gli*'leri sitoplazmada tutmasından dolayı, Hh sinyalinin negatif regülatörü olan *SuFu* ekspresyonu ise, Hh yolağının diğer elemanlarına göre gecikerek başlamaktadır. Bu durum, *SuFu*'nun, haploid germ hücrelerinde Hh sinyalinin down-regüle ettiğini göstermektedir. Renklerin yoğunluğu, mRNA veya protein ekspresyonunun yoğunluğunu gösterir.

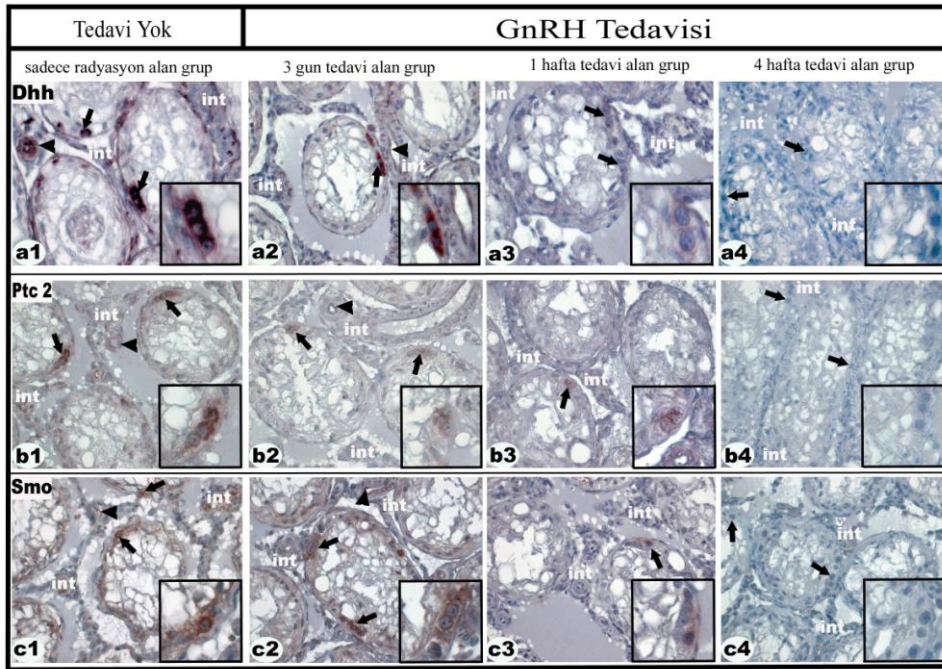
#### 4.2. Radyasyona Maruz Kalmış Yetişkin Sıçan Testisi Modelinde, Hh Sinyal Yolağı mRNA Ekspresyonu

Gereç ve Yöntemlerde, Bölüm 3.1'de detaylı bir şekilde anlatıldığı gibi, radyasyon alan yetişkin sıçan testisinde, radyasyon uygulamasından 15 hafta sonra, testis tübüllerinde kalan tek germ hücre tipi, farklılaşmamış Tip A spermatogoniyalardır (spermatogoniyal kök hücre). Bu hayvanlarda spermatogenez, yani Tip A spermatogoniyaların, Tip B spermatogoniyalara farklılaşması, 4 hafta GnRH antagonisti tedavisinden sonra başladı. Tip A spermatogoniyalarda ve bu hücrelerin Tip B spermatogoniyaya farklılaştığı gruplarda (spermatogenezin başladığı), Hh sinyal yolağı elemanlarının ekspresyonlarına ait bulgular, ilerleyen bölümlerde (Bölüm 4.2.1 ve Bölüm 4.2.2.) gösterildi ve tüm sonuçlar, Şekil 4.2.1'de şematize edildi.

#### 4.2.1. Radyasyona Maruz Kalmış Yetişkin Sıçan Testisi Modelinde, Hh Sinyal Yolağı, Ligand-Reseptör mRNA Ekspresyonu

Radyasyona maruz kalmış sıçan testisi in situ hibridizasyon analizi sonuçlarına göre GnRH tedavisi almayan ve yalnızca radyasyon alan testiste, *Dhh* mRNA ekspresyonu spermatogoniyal kök hücrelerdedir (oklar). Spermatogoniyal kök hücrelerde *Dhh* mRNA ekspresyonu 3 gün ve 1 hafta GnRH antagonisti tedavisi gören gruplarda halen pozitif iken, 4 hafta GnRH antagonisti tedavisi gören grupta (spermatogenezin başladığı ve spermatogoniyal kök hücrelerin farklılaştığı grup) sinyaller kayboldu (Şekil 4.2.1.1 a1-a4).

*Dhh* mRNA'ya benzer şekilde *Ptc2* ve *Smo* mRNA ekspresyonları da GnRH tedavisi öncesinde, spermatogoniyal kök hücrelerdedir (oklar). Spermatogoniyal kök hücrelerdeki *Ptc2* ve *Smo* mRNA ekspresyonları 3 gün tedavi gören ve 1 hafta tedavi gören gruplarda da gözlemlendi. Bu ekspresyonlar, 4 hafta GnRH tedavisinden sonra, yani Tip A spermatogoniyaların Tip B spermatogoniyaya farklılaşmasıyla, kayboldu. (Şekil 4.2.1.1.b1-c4).

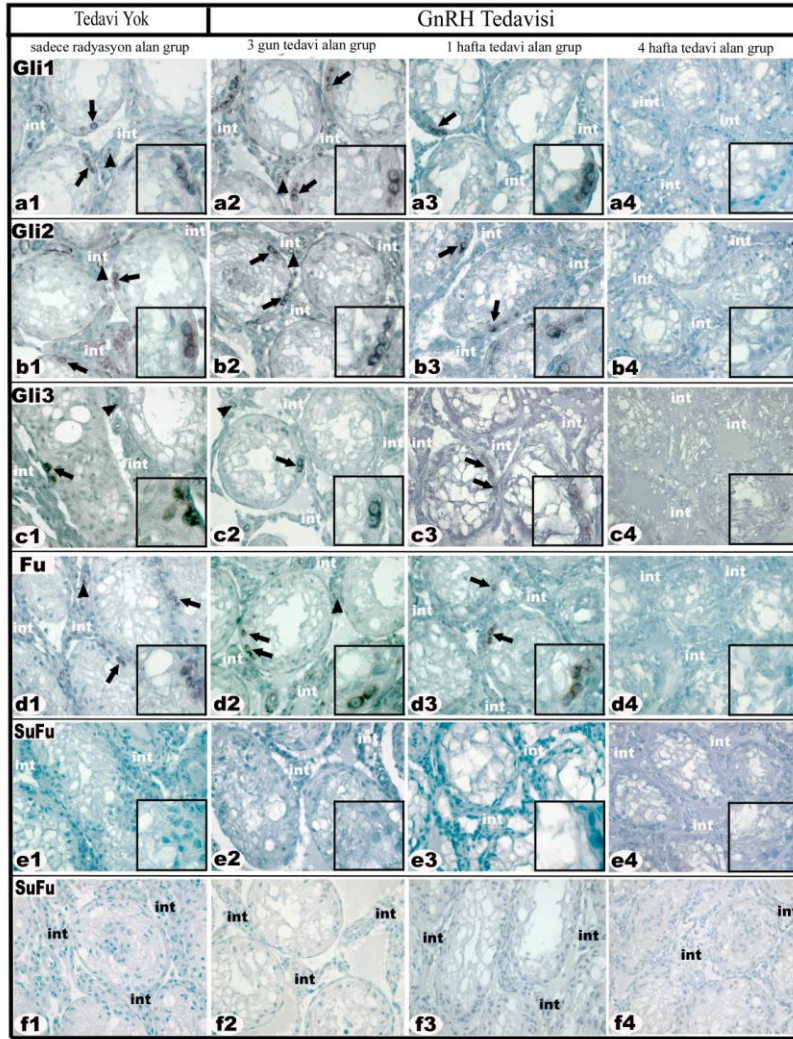


Şekil 4.2.1.1. Radyasyona maruz kalmış sıçan testisi modelinde Hh sinyal yolağı ligand- reseptör mRNA ekspresyonu. Tedavi öncesi, *Dhh* mRNA'sı (a1), *Ptc2* mRNA'sı (b1) ve *Smo* mRNA'sı (c1) spermatogoniyal kök hücrelerdedir (oklar). *Dhh*, *Ptc2* ve *Smo* mRNA'larının ekspresyonları, 3 gün tedavi alan grupta (sırasıyla, a2, b2, c2) ve 1 hafta tedavi alan grupta (sırasıyla, a3, b3, c3), spermatogoniyal kök hücrelerde devam etmektedir (oklar). 4 hafta tedavi alan grupta, *Dhh*, *Ptc2* ve *Smo*'ya ait mRNA'ların sinyalleri kaybolmaktadır (sırasıyla, a4, b4, c4). *Dhh*, *Ptc2* ve *Smo* mRNA'ları interstisyel alandaki endotelial hücrelerde de pozitifdir (ok başları). Ok başları, endotelial hücreler; Oklar, spermatogoniyum, int, interstisyum, Büyütmeler; x40; küçük kareler, x100.

#### 4.2.2. Radyasyona Maruz Kalmış Yetişkin Sıçan Testisi Modelinde, Hh Sinyal Yolağı, Hücreiçi Sinyal Elemanları mRNA Ekspresyonu

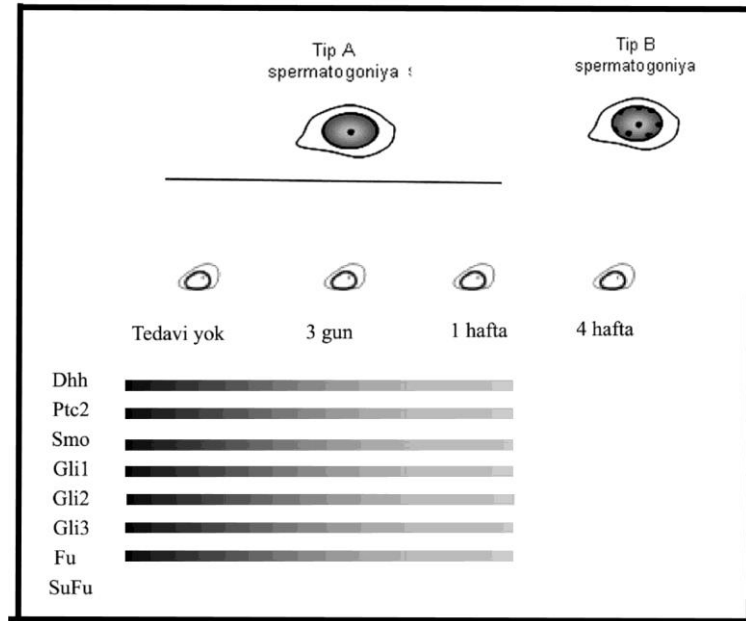
Hh sinyal yolağının ligand ve reseptörleri mRNA ekspresyonuna benzer şekilde *Gli1*, *Gli2* ve *Gli3*'ü kodlayan mRNA ekspresyonları da GnRH tedavisi almayan ve yalnızca radyasyon alan grupta spermatogonyal kök hücrelerde (oklar). 3 gün tedavi gören grupta ve 1 hafta tedavi gören grupta *Gli1*, *Gli2* ve *Gli3* mRNA ekspresyonları yine spermatogonyal kök hücrelerde. Bu transkriptlerin ekspresyonu, spermatogenezin başladığı, 4 hafta tedavi gören grupta gözlenmedi. Şekil 4.2.2.1.a1-c4.

Hh sinyal yolağındaki sitoplazmik regülâtorlerden olan *Fu* mRNA ekspresyonuna GnRH tedavisi öncesi, sadece radyasyon alan grupta, spermatogonyal kök hücrelerde rastlandı (oklar). *Fu* mRNA ekspresyonu 3 gün tedavi alan grupta ve 1 hafta tedavi alan grupta devam etti. *Fu* transkripti 4 hafta tedavi gören grupta kayboldu. Diğer tüm Hh sinyal yolağı elemanlarının aksine yolağın negatif regülâtorü olan *SuFu* mRNA ekspresyonuna, hiçbir grupta rastlanmadı (Şekil 4.2.2.1.d1-e4). *SuFu* mRNA ekspresyonuyla paralel şekilde, SuFu protein ekspresyonuna da tüm gruplarda negatifti (Şekil 4.2.2.1.f1-f4).





**Şekil 4.2.2.1.** Radyasyona maruz kalmış sıçan testisi modelinde Hh sinyal yolağı hücreiçi sinyal elemanları mRNA ekspresyonu. Tedavi görmeyen grupta, *Gli1* mRNA'sı (**a1**), *Gli2*, mRNA'sı (**b1**), *Gli3* mRNA'sı (**c1**) ve *Fu* mRNA'sı (**d1**), spermatogoniyal kök hücrelerdedir (oklar). *Gli1*, *Gli2*, *Gli3* ve *Fu* mRNA ekspresyonları 3 günlük (sırasıyla, **a2**, **b2**, **c2**, **d2**) ve 1 hafta (sırasıyla, **a3**, **b3**, **c3**, **d3**) tedavi alan grupta spermatogoniyal kök hücrelerde (oklar) devam etmektedir. 4 hafta tedavi alan grupta, *Gli1*, *Gli2*, *Gli3* ve *Fu* mRNA'sı kaybolmaktadır (sırasıyla, **a4**, **b4**, **c4**, **d4**). *SuFu* mRNA'sı, çalışılan tüm gruplarda negatiftir (**e1-4**). SuFu proteini de tüm gruplarda negatiftir (**f1-4**). *Gli1*, *Gli2*, *Gli3* ve *Fu* sinyallerine, interstisyel alandaki endotelial hücrelerde de rastlanmaktadır (ok başları). Ok başları, endotelial hücreler; Oklar, spermatogoniyum, int, interstisyum; Büyütmeler; x40; küçük kareler, x100.

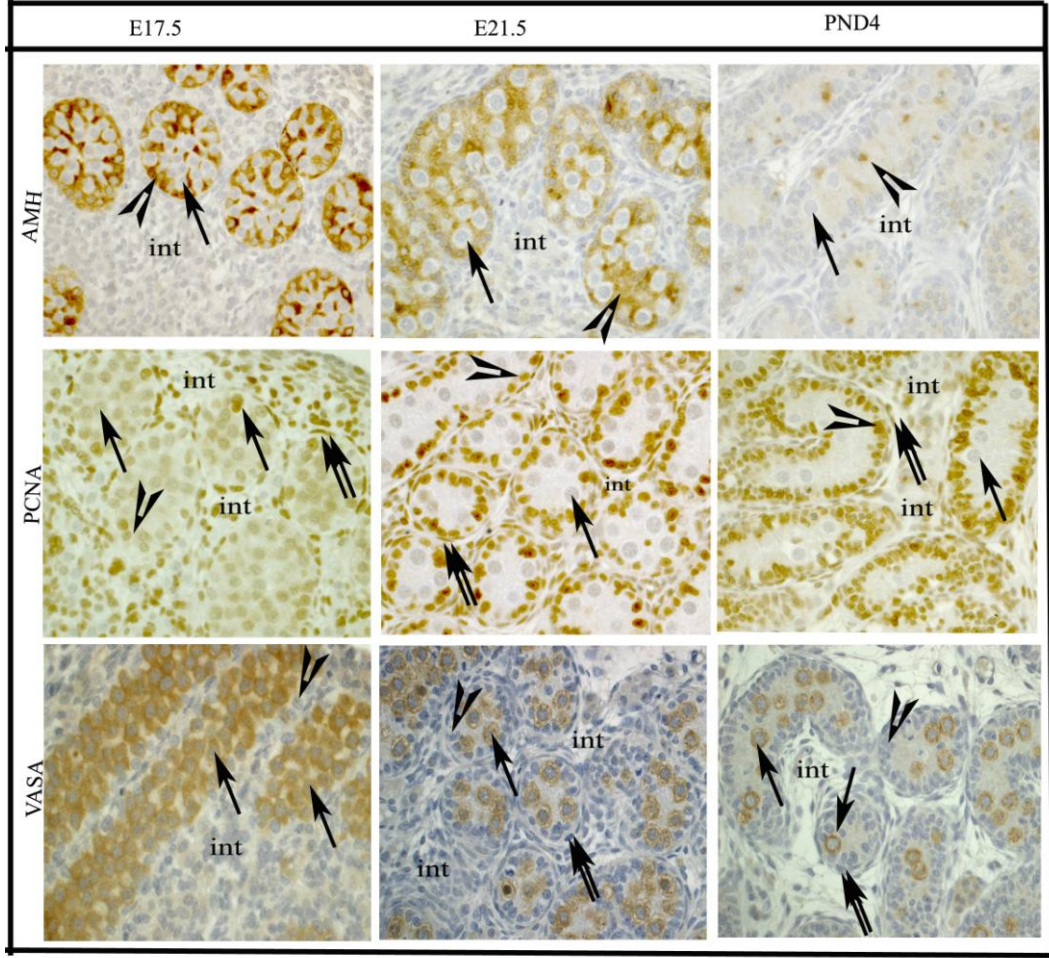


**Şekil 4.2.1.** Radyasyona maruz kalmış sıçan testisi modelinde Hh sinyal yolağı ekspresyonu. Tedavi görmeyen veya 3 gün ya da 1 hafta tedavi gören grupta, Hh sinyal yolağına ait mRNA'lar (*Dhh*, *Ptc2*, *Smo*, *Gli1*, *Gli2*, *Gli3*, *Fu*) Tip A spermatogoniyada eksprese olmaktadır. Ancak, spermatogoniyal kök hücrelerin Tip B spermatogoniyaya farklılaşmasıyla beraber, sinyal kaybolmaktadır. *SuFu* mRNA ekspresyonuna ise hiçbir grupta rastlanmamaktadır. Renklerin yoğunluğu, mRNA ekspresyonunun yoğunluğunu gösterir.

### 4.3. Gelişmekte Olan Sıçan Testisinde Hh Sinyal Yolağı mRNA Ekspresyonu

Gonositler, embriyonik dönemde, testiste bulunan tek germ hücre tipidir ve Sertoli hücreleri ile beraber seminifer kordonları oluşturur. Seminifer kordonların etrafı, peritübüler myoid hücreleri ile çevrilidir. Leydig hücreleri ise seminifer kordonların arasındaki interstisiyel alanda bulunur. Gonositler, yaklaşık E17'ye kadar proliferasyonlarını sürdürdükten sonra, bu günden doğuma kadar olan zaman aralığında mitotik aktivitelerini durdurarak, tutuluma girerler. Doğumdan sonra, mitotik aktivitelerini tekrar başlatan gonositler, seminifer kordonların bazaline doğru göç etmeye başlayarak postnatal 5. günle beraber spermatogoniyalara farklılaşarak spermatogenezin ilk dalgasını başlatırlar (Bakınız Genel Bilgiler, Şekil 2.1.2.2. ve Şekil 2.1.3.1.).

Şekil 4.3.1.'de E17.5, E21.5 ve PND4'de testis genel görünümüleri, Anti-Müllerian Hormon (AMH; Sertoli hücre belirteci), Proliferasyon Cell Nükleer Antijen (PCNA; proliferasyon belirteci) ve VASA (germ hücre belirteci) immünohistokimya boyanması ile gösterildi. Gelişmekte olan testiste, AMH, E17.5 ve E21.5'de yoğun olarak eksprese olurken, PND4'de bu proteinin miktarı, Sertoli hücrelerinin olgunlaşmasına paralel olarak azaldı (ok başları). PCNA boyanmalarında, E17.5'de özellikle, peritübüler myoid hücrelerin (çift ok) ve interstisiyel alandaki hücrelerin pozitif olduğu görüldü. Bu günde, bazı gonositlerin hala mitotik sikluslarına devam ettiği de gözlemlendi (oklar). E21.5 ve PND4'de PCNA boyanmasının Sertoli hücrelerinde (ok başı), peritübüler myoid hücrelerde (çift ok) ve interstisiyel alandaki bazı hücrelerde olduğu görüldü. Gonositler, bu günlerde hala sessizlik (dinlenme) dönemlerini devam ettirdi. VASA boyanmaları ile, E17.5'de gonositlerin, seminifer kordonların merkezinde olduğu görüldü (oklar). E21.5'de gonositler, seminifer kordonların merkezinden, bazaline doğru yerleşim gösterdi. PND4'de, bazı gonositler halen seminifer kordonların merkezine yakın yerleşimlerini sürdürürken, bazılarının seminifer kordonların bazaline yakın yerleşim gösterdiği görüldü (ok).



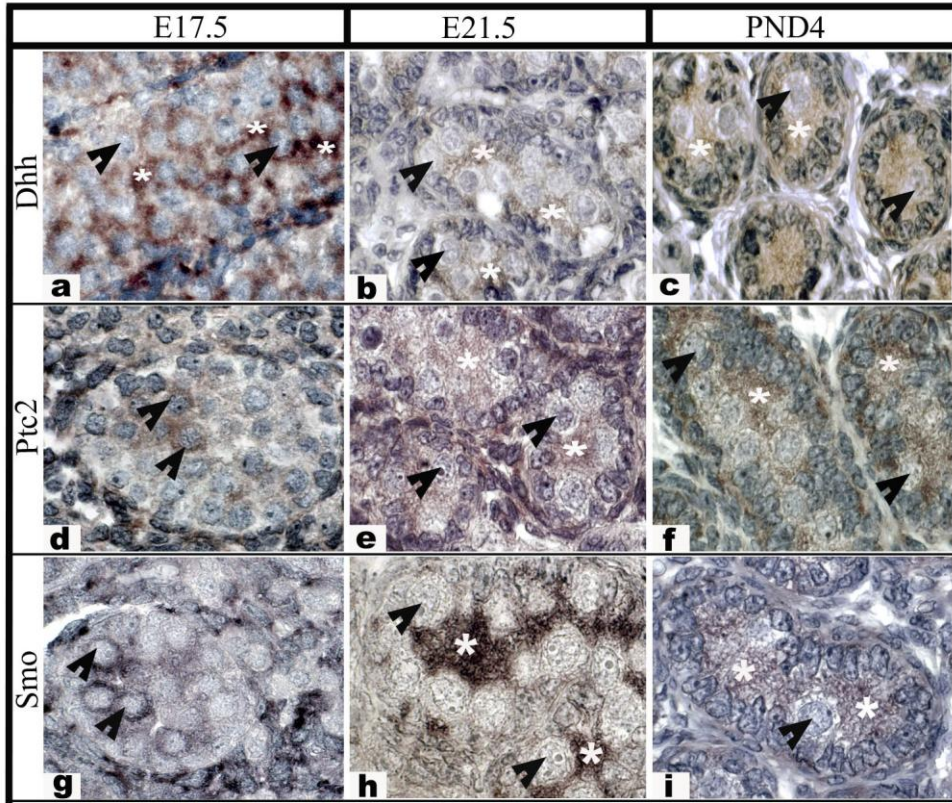
**Şekil 4.3.1.** Gelişmekte olan sıçan testisinde AMH, PCNA ve VASA proteinleri immünohistokimya lokalizasyonları. **AMH**, Sertoli hücrelerindedir. Boyanmanın şiddeti PND4'de azalmaktadır. **PCNA**, E17.5'de bazı gonositlerde (ok) ve peritübüler hücrelerde (çift ok) pozitifdir. E21.5 ve PND4'de Sertoli hücreleri (ok başı) ve peritübüler hücreler (çift ok) pozitifdir. **VASA**, germ hücrelerindedir. E17.5'de gonositler (ok), seminifer kordonların merkezindedir. E21.5'de gonositler (ok), genelde seminifer kordonların merkezine yakın yerleşmiştir. PND4, gonositler (ok), seminifer kordonların bazaline yakın yerleşim göstermiştir. Ok, gonositler; Ok başı, Sertoli hücreleri; çift ok, peritübüler hücreler; int, interstisyum; E, embriyonik gün; PND, postnatal gün; Büyütmeler, x40.

Devam eden bölümlerde (Bölüm 4.3.1 ve Bölüm 4.3.2.), Hh sinyal yolağının embriyonik ve postnatal testisteki mRNA ekspresyonları gösterildi ve tüm sonuçlar, Şekil 4.3.2. ve Şekil 4.3.3.'de şematize edildi.

#### 4.3.1. Gelişmekte Olan Sıçan Testisinde Hh Sinyal Yolağı Ligand-Reseptör mRNA Ekspresyonu

*Dhh* mRNA ekspresyonu, E17.5’de gonositlerde (ok başları), Sertoli hücrelerinde (yıldızlar) gözlemlendi. Bu günde, Hh sinyal yolağı reseptörleri olan *Ptc2* ve *Smo* mRNA ekspresyonu ise gonositlerde (ok başları) gözlemlendi. Şekil 4.3.1.1.a,d,g.

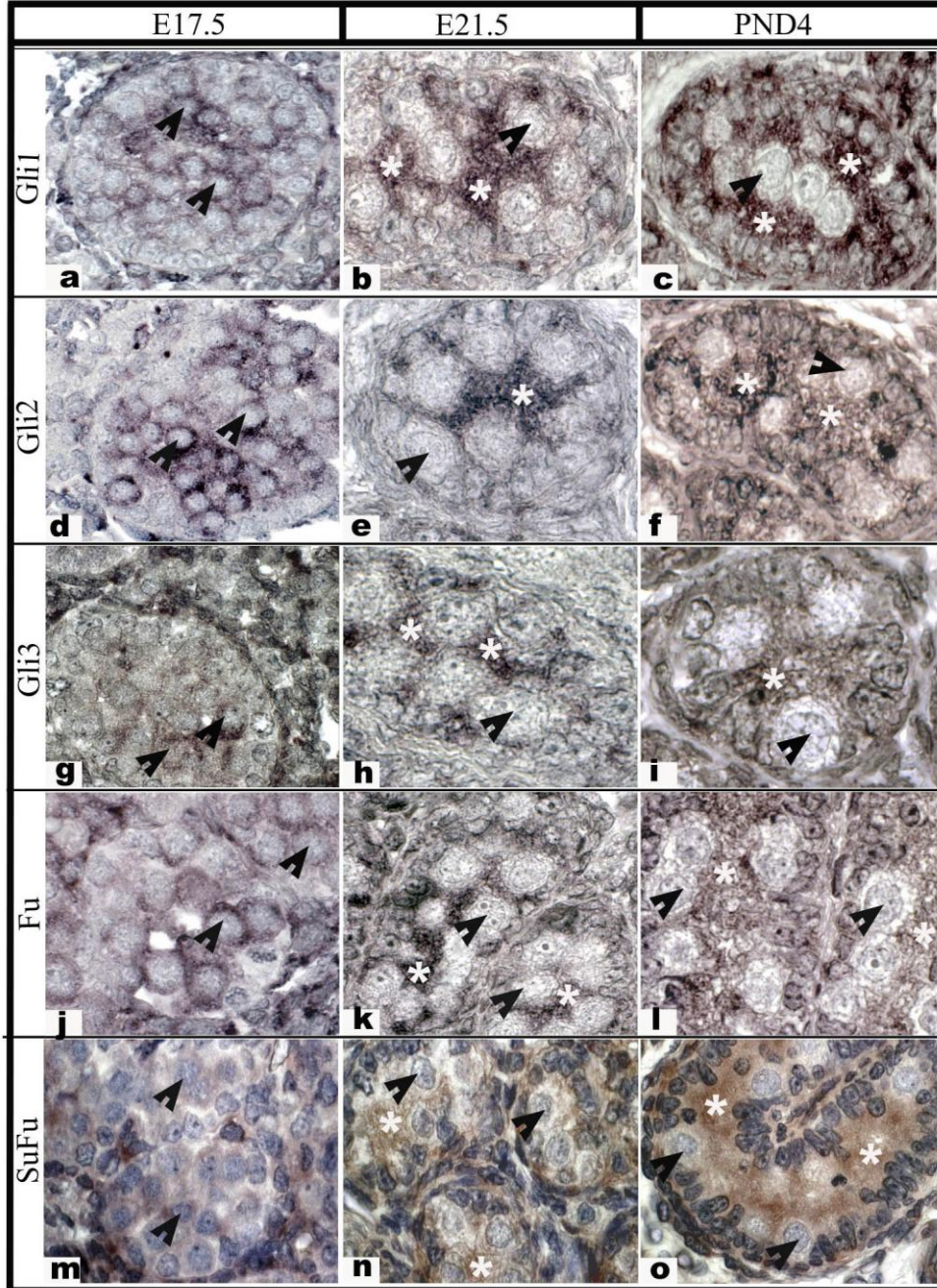
E21.5’de ve PND4’de ise, hem *Dhh* ligandı hemde *Ptc2* ve *Smo* reseptörlerine ait mRNA’lar, Sertoli hücrelerinde (yıldız) eksprese oldu (ok). Gonositler ise negatif (ok başları). Şekil 4.3.1.1.



Şekil 4.3.1.1. Gelişmekte olan sıçan testisinde Hh sinyal yolağı ligand-reseptör mRNA ekspresyonu. E17.5’de, *Dhh* mRNA’sı (a), Sertoli hücrelerinde (yıldız) ve gonositlerde (ok başı). *Ptc2* (d) ve *Smo* (g) mRNA’ları ise gonositlerde (ok başı). E21.5’de ve PND4’de *Dhh* (sırasıyla, b, c), *Ptc2* (sırasıyla, e, f) ve *Smo* (sırasıyla, h, i) mRNA’ları Sertoli hücrelerindedir. Ok başları; Gonositler, Yıldızlar, Sertoli hücre sitoplazması; E, embriyonik gün; PND, postnatal gün; Büyütmeler x100.

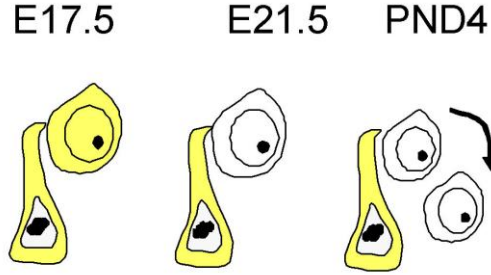
#### 4.3.2. Gelişmekte Olan Sıçan Testisinde Hh Hücreiçi Sinyal Yolağı Elemanları mRNA Ekspresyonu

Hh sinyal yolağının ligand ve reseptörlerine ait mRNA ekspresyonunda olduğu gibi, *Gli1*, *Gli2*, *Gli3*, *Fu* ve *SuFu* olarak adlandırılan Hh hücre içi sinyal yolağı elemanlarını kodalayan mRNA'lar da, E17.5'de, gonositlerde eksprese oldu. *Gli1*, *Gli2*, *Gli3*, *Fu* ve *SuFu* ekspresyonlarına E21.5'de ve PND4'de ise Sertoli hücrelerinde rastlandı. Bu günlerde gonositlerde ekspresyon negatif (ok başları). Şekil 4.3.2.1..

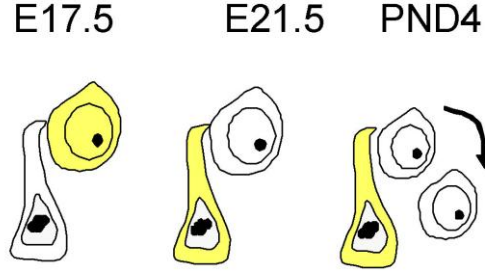


Şekil 4.3.2.1. Gelişmekte olan sıçan testisinde, Hh hücreiçi sinyal yolağı elemanları mRNA ekspresyonu. E17.5'de, *Gli1* mRNA'sı (a), *Gli2* mRNA'sı (d), *Gli3* mRNA'sı (g), *Fu* mRNA'sı (j) ve *SuFu* mRNA'sı (m), gonositlerde (ok başları). E21.5 ve PND4'de ise, *Gli1* (sırasıyla, b,c), *Gli2* (sırasıyla, e,f), *Gli3* (sırasıyla, h,i), *Fu* (sırasıyla, k,l) ve *SuFu* (sırasıyla, n,o) mRNA'ları Sertoli hücrelerinde (yıldız). Ok başları, gonosit;

Yıldızlar, Sertoli hücre sitoplazması; E, embriyonik gün; PND, postnatal gün; Büyütmeler, x100.



**Şekil 4.3.2.** Gelişmekte olan sıçan testisinde *Dhh* ekspresyonu. E17.5’de, *Dhh* mRNA’sı, Sertoli hücrelerinde ve gonositlerde. E21.5 ve PND4’de ise ekspresyon, Sertoli hücrelerindedir. Sarı dolgular, ekspresyonun pozitif olduğu hücreleri belirtmektedir. Yuvarlak yapılar, gonositleri temsil etmekte; Üçgenimsi yapılar ise Sertoli hücrelerini temsil etmekte. E, embriyonik gün; PND, postnatal gün.



**Şekil 4.3.3.** Gelişmekte olan sıçan testisinde *Ptc2*, *Smo*, *Gli1*, *Gli2*, *Gli3*, *Fu* ve *SuFu* ekspresyonunu. E17.5’de belirtilen elemanlar gonositlerde eksprese oldu. E21.5 ve PND4’de ise ekspresyon Sertoli hücrelerinde gözlemlendi. Sarı dolgular, ekspresyonun pozitif olduğu hücreleri belirtmektedir. Yuvarlak yapılar, gonositleri temsil etmekte; Üçgenimsi yapılar ise Sertoli hücrelerini temsil etmekte. E, embriyonik gün; PND, postnatal gün

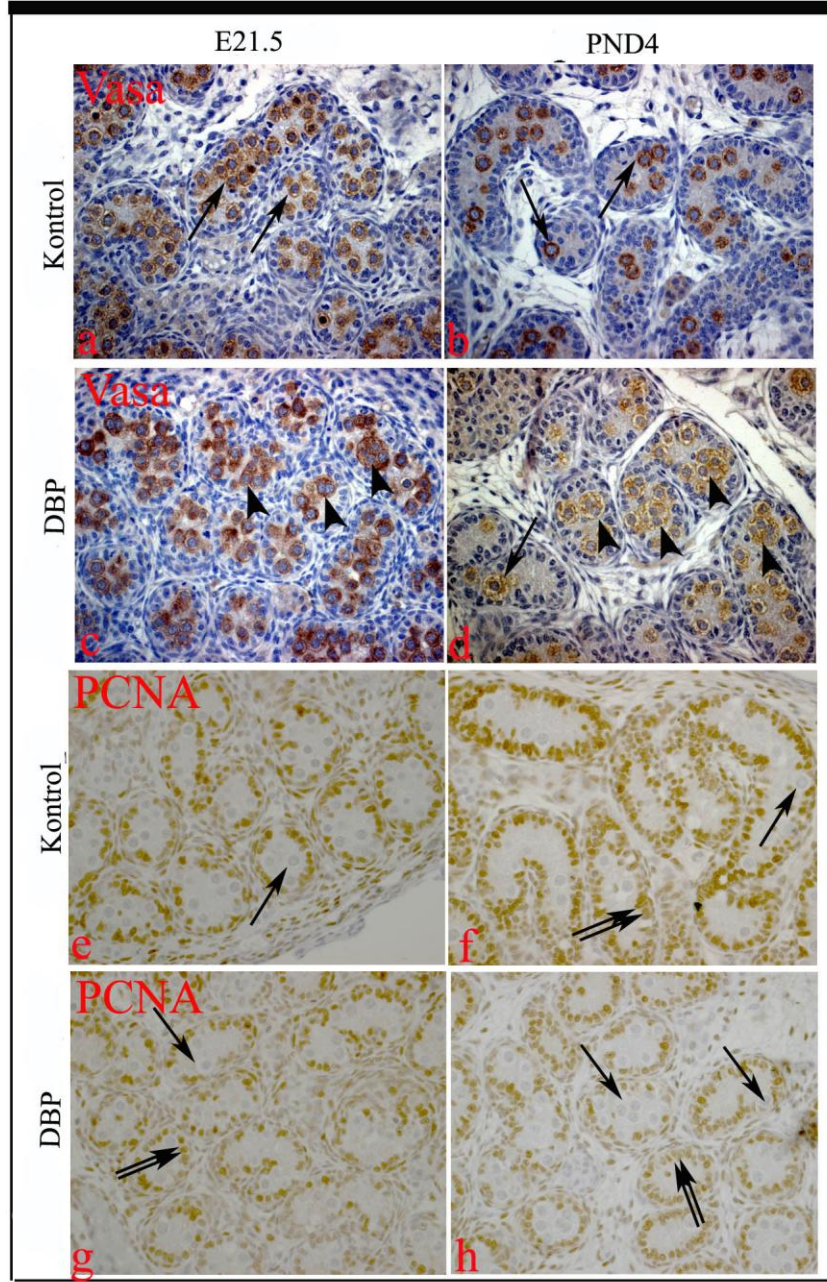
#### **4.4. DBP'ye Maruz Kalmış Sıçan Testisinde Hh Sinyal Yolağı mRNA Ekspresyonu**

Fötal dönemde DBP maruziyetiyle, çok-nükleuslu gonositlerin (multinükleated gonocytes, MNG), Sertoli hücrelerinin ve Leydig hücrelerinin yetersiz olgunlaştığı ve Sertoli hücrelerinin, prenatal dönemde sayısının azaldığı, embriyonik dönemde eksprese olan genlerin ekspresyon zaman aralığının uzadığı daha önceki yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (162, 163). Bu hayvanların yetişkinlik dönemlerinde de, insanlardaki testisküler disgenez sendromuna benzer üreme bozuklukları bildirilmiştir. Böylesine anormal testis gelişimi bulunan hayvanlarda, Hh sinyal yolağı ekspresyonu Şekil 4.4.2.1.'de verilmiştir.

#### **4.4.1. DBP'ye Maruz Kalmış Sıçan Testisinde VASA ve PCNA İmmünohistokimya Analizi**

DBP'ye maruz kalmış ve kontrol hayvanların testis örneklerinde, germ hücre belirteci olan VASA immünohistokimya analizi sonucunda, E21'de hem kontrol hemde DBP grubunda gonositler, seminifer kordonların merkezinde yerleşim gösterdi (oklar). DBP grubunda, MNG'lerin artışı dikkat çekti (ok başları). PND4'de her iki gruba ait gonositler, seminifer kordonların bazaline yakın yerleşim gösterdi ancak, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, DBP'ye maruz kalmış hayvanlarda MNG'ler yine dikkat çekti. Şekil 4.4.1.1.a-d.

Proliferasyon belirteci olan PCNA boyanması sonucunda, E21.5'de ve PND4'de hem kontrol hemde DBP grubunda, gonositlerin negatif (oklar) ve Sertoli hücrelerinin pozitif olduğu (çift ok) gözlemlendi. PND4'de her iki gruba ait gonositler, seminifer kordonların bazaline yakın yerleşim gösterdi (oklar). Ancak, PND4'de DBP grubunda, MNG'lerin halen seminifer kordonların merkezinde yerleşim gösterdiği gözlemlendi (ok başı). Ayrıca, PND4'de PCNA immünoboyanma şiddetinin DBP grubunda, kontrol hayvanlara göre azaldığı gözlemlendi. Şekil 4.4.1.1.e-h..

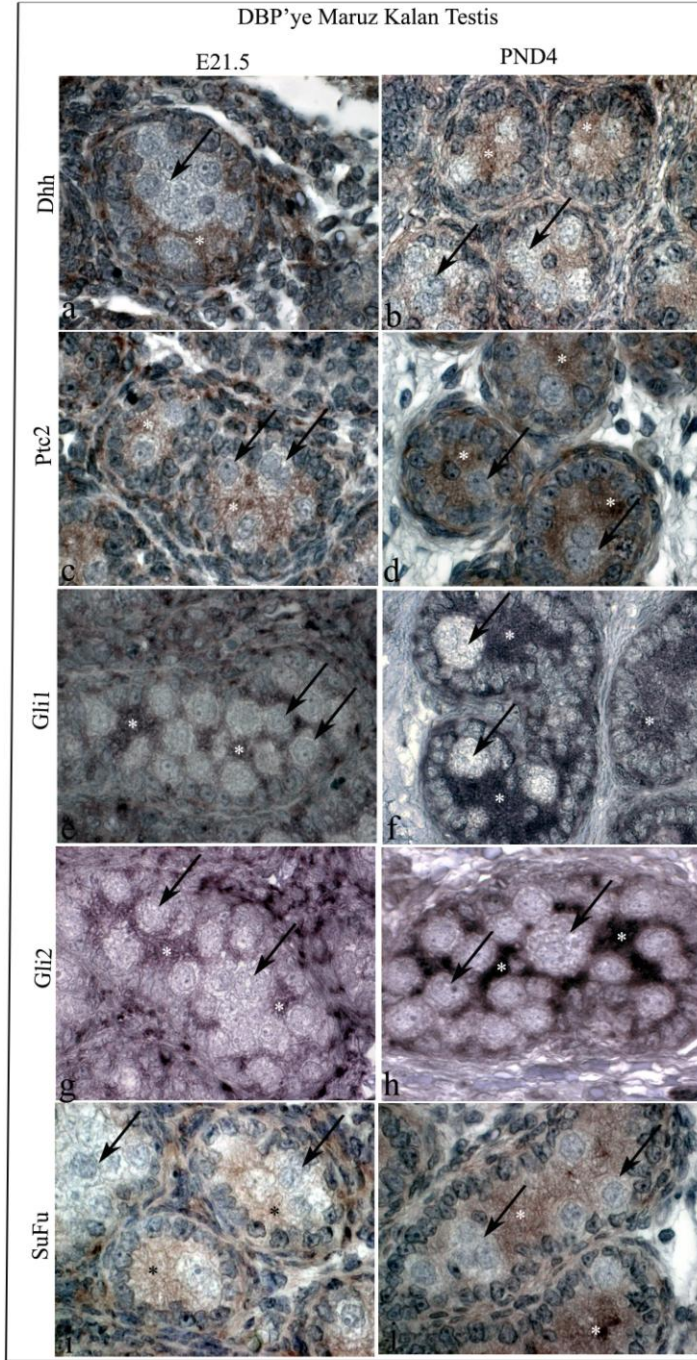


**Şekil 4.4.1.1.** DBP'ye maruz kalmış sıçan testisinde VASA ve PCNA immünohistokimyası. E21.5'de, VASA boyanması ile kontrol (a) ve DBP (c) grubunda gonositler (oklar) seminifer kordonların merkezindedir. DBP grubunda, MNG'lerin varlığı dikkat çekmektedir (ok başları). PND4'de, kontrol (b) ve DBP (d) grubunda gonositler (oklar), seminifer kordonların bazaline yakın konumda bulunur. DBP grubunda MNG'lerin artışı dikkat çekicidir (ok başları). E21.5'de ve PND4'de, PCNA boyanması ile, kontrol (sırasıyla, e,f) ve DBP (sırasıyla, g, h) grubunda gonositlerin prolifer olmamakta (oklar), Sertoli hücreleri prolifer olmaktadır (çift ok). PND4'de, DBP (h) grubunda PCNA boyanma şiddeti azalmaktadır (çift ok). Oklar; gonositler; çift ok; Sertoli hücreleri; Okbaşları, MNG'ler; E, embriyonik gün; PND, postnatal gün; Büyütme x40.



#### 4.4.2. DBP'ye Maruz Kalmış Sıçan Testisinde, Hh Sinyal Yolağı mRNA Ekspresyonu

Bu modelde, E21.5 ve PND4'de *Dhh*, *Ptc2*, *Gli1*, *Gli2*, *SuFu* mRNA ekspresyonları, kontrollerde olduğu gibi Sertoli hücrelerinde gözlemlendi (kontrol için bakınız, Şekil 4.3.2.1.). Ancak, kontrol ile karşılaştırıldığında mRNA ekspresyon şiddeti DBP'ye maruz kalan hayvanlarda artış gözlemlendi. Şekil 4.4.2.1.



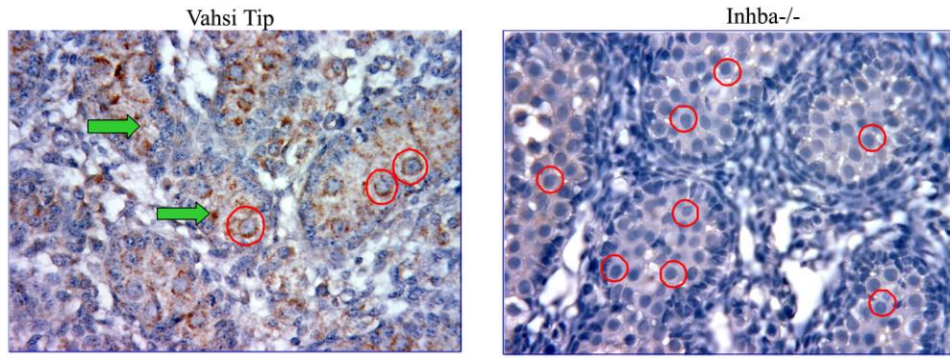
Şekil 4.4.2.1. DBP'ye maruz kalmış sıçan testisinde Hh sinyal yolağı elemanları mRNA ekspresyonu. E21.5'de ve PND4'de, *Dhh* (sırasıyla, a, b), *Ptc2* (sırasıyla, c, d), *Gli1* (sırasıyla, e, f),

*Gli2* (sırasıyla, **g, h**) ve *SuFu* (sırasıyla, **ı, i**) mRNA ekspresyonları, Sertoli hücrelerindedir (yıldızlar), gonositler negatiftir (oklar). Oklar, gonositler; Yıldızlar, Sertoli hücre sitoplazması; E, embriyonik gün; PND, postnatal gün; Büyütme x100.

#### 4.5. Aktivin Beta-A Knock-Out (*Inhba*<sup>-/-</sup>) Embriyonik Fare Testisinde, Hh Sinyal Yolağı Ekspresyonu

Aktivin mRNA'sı, embriyonik dönem fare testisinde bulunan gonositlerde ve Sertoli hücrelerinde eksprese olur. Aktivin mRNA'sı değil ancak, aktivin proteini doğumun 0.gününde (D0), gonositlerde ve Sertoli hücrelerinde depolanır (Şekil 5.5.1.) (154). Aktivin geni çıkarılan hayvanların (*Inhba*<sup>-/-</sup>) testislerinde, D0'da gonosit hücre sayısı vahşi tipe göre artış gösterir ancak, Sertoli hücre sayısı azalır. Aktivin geni çıkarılan hayvanlar, D0'da çeşitli embriyonik defektlerden dolayı ölür (155).

D0'da vahşi tip ve *Inhba*<sup>-/-</sup> fare testisi, aktivin beta-a proteini için immünohistokimyasal olarak değerlendirildiğinde, aktivin geni çıkarılmış hayvaların testislerinde, aktivin protein üretiminin olmadığı görüldü (Şekil 4.5.1.).

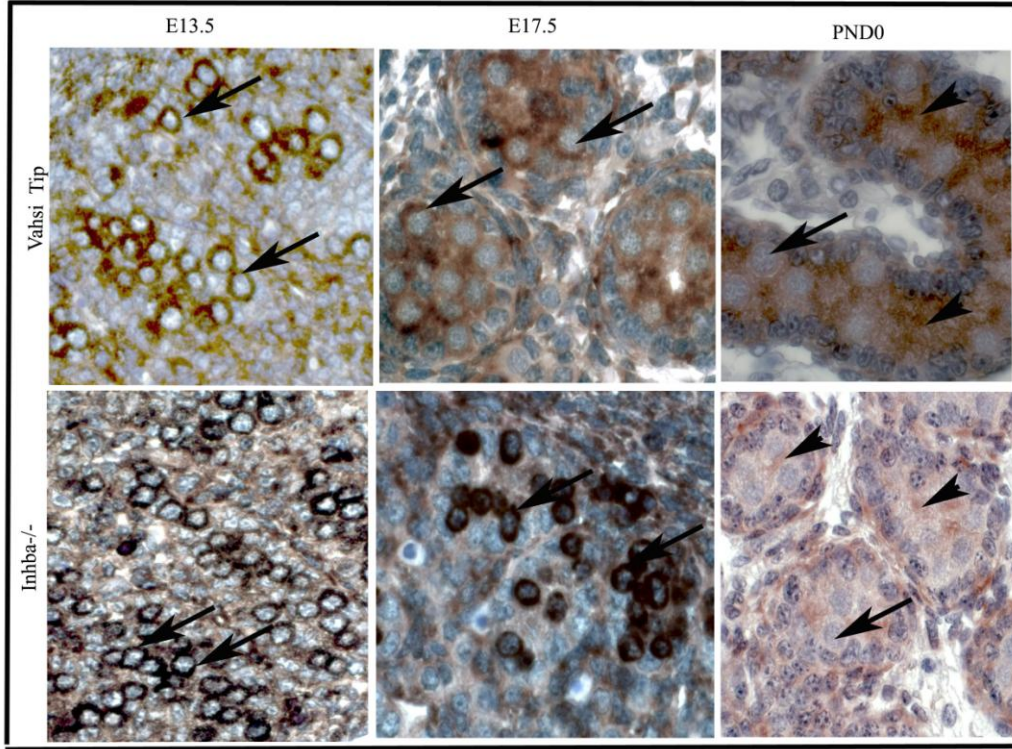


**Şekil 4.5.1.** Aktivin beta-A immünohistokimyası. Doğumun 0. gününde aktivin, vahşi tipte, gonositlerde (yuvarlak içerisine alınmış yapılar) ve Sertoli hücrelerinde (oklar) depo edilmektedir. *Inhba*<sup>-/-</sup> fare testisinde, bu protein eksprese olmamaktadır. Kırmızı yuvarlak içerisindeki yapılar, gonositler; yeşil oklar, Sertoli hücre sitoplazması; Büyütme x40.

#### 4.5.1. Vahşi Tip ve *Inhba*<sup>-/-</sup> Embriyonik Fare Testisinde *Gli1* mRNA Ekspresyonu

Vahşi tip fare testisinde, E13.5’de transkripsiyon faktörü, *Gli1* mRNA ekspresyonuna gonositlerde (oklar) rastlandı. E17.5’de, *Gli1* mRNA ekspresyonu, halen gonositlerde mevcuttu. D0’da *Gli1* mRNA ekspresyonu, Sertoli hücrelerinde gözlemlendi. Şekil 4.5.1.1..

*Inhba*<sup>-/-</sup> fare testisinde, E13.5’de *Gli1* mRNA ekspresyonu, vahşi tipe göre daha yoğun ve vahşi tipteki gibi gonositlerde (oklar) ekspresye oldu. E17.5’de *Gli1* mRNA ekspresyonu, halen gonositlerde. E17.5’de, *Gli1* mRNA ekspresyon şiddeti, vahşi tipe göre artış gösterdi. D0’da ise *Gli1* mRNA ekspresyonuna, Sertoli hücrelerinde rastlandı. Vahşi tip ile karşılaştırıldığında, *Inhba*<sup>-/-</sup> farelerde bu günde, *Gli1* mRNA ekspresyonu azaldı. Şekil 4.5.1.1..

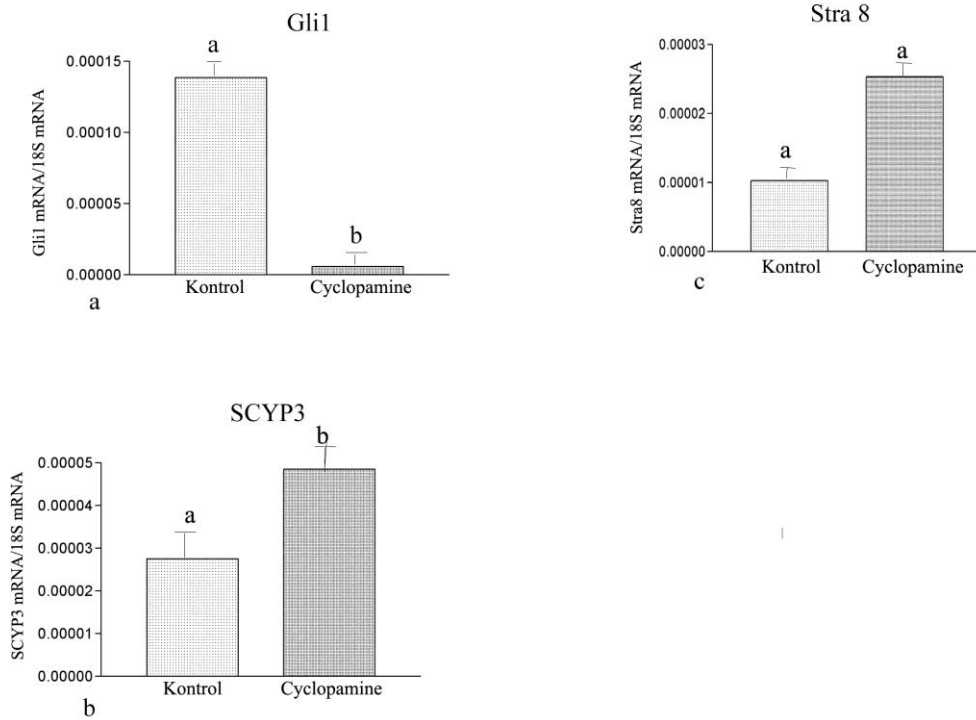


Şekil 4.5.1.1. Vahşi Tip ve *Inhba*<sup>-/-</sup> embriyonik fare testisinde *Gli1* mRNA ekspresyonu. Her iki grupta da E13.5 ve E17.5’de *Gli1* mRNA’sı, gonositlerde (oklar) ekspresedir. *Inhba*<sup>-/-</sup> hayvanlarda, vahşi tipe göre ekspresyon daha yoğundur. PND4’de ise *Gli1*’i kodlayan mRNA, Sertoli hücrelerindedir (ok başları). *Inhba*<sup>-/-</sup> hayvanlarda, ekspresyonun şiddeti, vahşi tipe göre azalmıştır. E, embriyonik gün; PND, postnatal gün, *Inhba*; Aktivin knock-out hayvan, Büyütmeler, x100.

#### 4.6. Seminifer Tübül Damla Kültür Yöntemiyle, Hh Sinyal Yolağın İnhibe Edilmesi ve Testisteki Gen Ekspresyon Değişiminin, qRT-PCR ile Belirlenmesi

Hh sinyal yolağının hangi genlerin transkripsiyonunu etkilediğini görmek amacıyla postnatal 1.günde olan fare testislerine ait seminifer tübüller, Hh sinyal yolağı inhibitörü olan cyclopamine ile muamele edildi. Tübül kültürü sonrasında toplanan kontrol ve cyclopamine gruplarına ait testis parçalarından izole edilen RNA'larda, qRT-PCR tekniği kullanılarak mayoz belirteçleri olan *SCYP3* ve *Stra8* gen ekspresyonları karşılaştırıldı (Bakınız, bölüm 3.5 ve 3.5.1.).

Cyclopamine uygulamasını takiben, yolağın transkripsiyon faktörü olan Gli1 ekspresyonunu anlamlı derecede azaldı ( $p < 0.05$ ) (Şekil 4.6.1.a). Cyclopamine uygulaması sonucunda, Hh yolağının inhibe edildiği gruplarda, kontrol ile karşılaştırıldığında *SCYP3* ekspresyonu anlamlı derecede arttı ( $p < 0.05$ ). *Stra8* gen ekspresyonunda da, kontrolle karşılaştırıldığında, cyclopamine grubunda artış olmasına rağmen aradaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p > 0.05$ ) (Şekil 4.6.1.b-d).

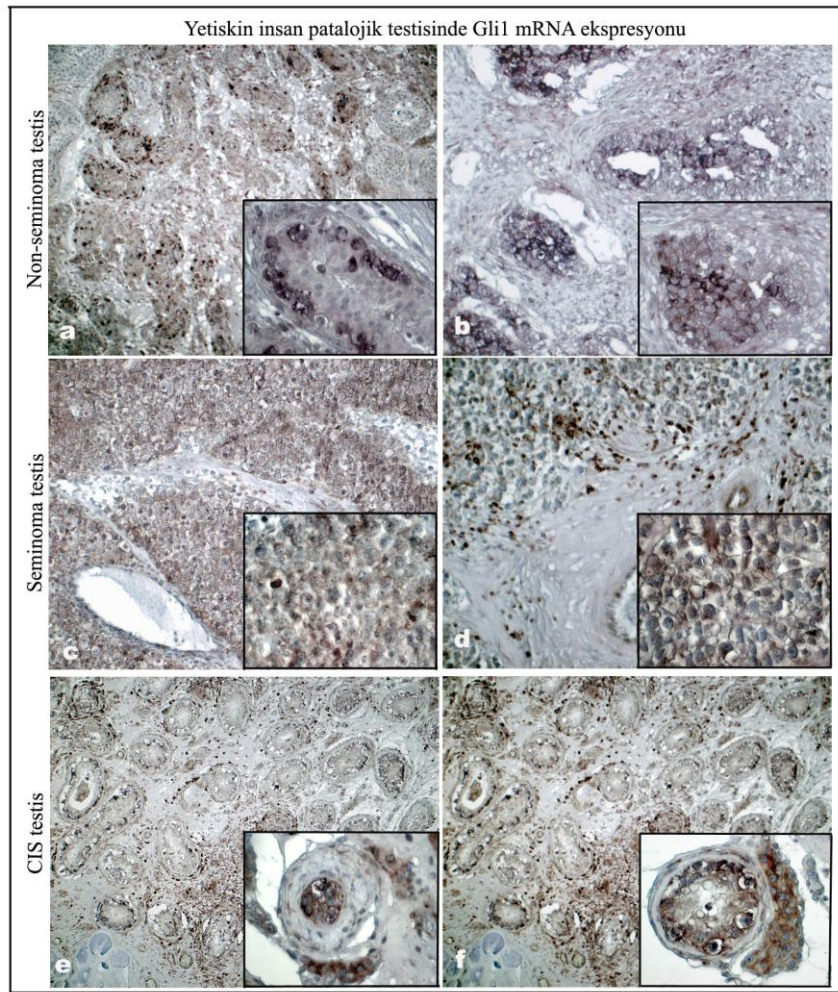


**Şekil 4.6.1.** qRT-PCR sonuçları. Postnatal 1. gün fare testisinde, damla kültürü yöntemiyle Hh yolağı, cyclopamine ile inhibe edildiğinde Gli1 (a), SCYP3 (b) ve Stra8 (c) ekspresyonları qRT-PCR ile ölçüldü. Cyclopamine'nin Hh sinyal yolağının inhibe ettiği, Gli1'in anlamlı bir şekilde azalmasıyla ortaya kondu ( $p < 0.05$ ). Hh sinyal yolağı inhibisyonuyla beraber, SCYP3 ekspresyonu anlamlı derecede arttı ( $p < 0.05$ ). Stra8 ekspresyonu, cyclopamine grubunda, kontrole göre artış gösterdi ancak, bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p > 0.05$ ). Farklı harfler, gruplar arasındaki anlamlı farklılığı ortaya koymaktadır ( $p < 0.05$ ).

#### 4.7. Yetişkin İnsan Testisi, Non-seminoma, Seminoma ve CIS Örneklerinde *Gli1* mRNA Ekspresyonu

Bu bölümde, Dhh sinyal yolağı transkripsiyon faktörü olan *Gli1* mRNA ekspresyonunun non-seminoma, seminoma ve CIS'i içeren testiküler neoplazma örneklerinde sonuçları gösterildi.

*Gli1* mRNA ekspresyonu, in situ hibridizasyon analizi sonuçlarına göre, morfolojik olarak heterojen hücre tipleri içeren non-seminoma (Şekil 4.7.1.a,b), seminoma (Şekil 4.7.1.c,d) ve CIS hücrelerde (Şekil 4.7.1.e,f) pozitif olarak gözlemlendi. CIS testiste, *Gli1* mRNA ekspresyonu CIS hücrelerinin sitoplazmasında, peritübüler myoid hücrelerde, CIS tübüllerini çevreleyen bazı interstisiyel hücrelerde gözlemlendi.



**Şekil 4.7.1.** Yetişkin insan neoplazma örneklerinde *Gli1* mRNA ekspresyonu. Yetişkin insan testisi, non-seminoma (sırasıyla, **a**, **b**), seminoma (sırasıyla, **c**,**d**) ve CIS (sırasıyla, **e**,**f**) örneklerinde *Gli1* mRNA ekspresyonunun pozitif olduğu gözlemlendi. Büyütmeler, x40; küçük kareler x66.

## TARTIŞMA

Spermatogenez, karmaşık ve eşsiz bir gelişim süreci olup testis içerisinde olgunlaşmakta ve erkek gamet hücresi oluşumu ile sonuçlanmaktadır. Normal testis gelişimi ve fonksiyonu sırasında, birçok hormon, büyüme faktörü ve sinyal molekülleri görev almaktadır.

Hh sinyal yolağı testis gelişiminde önemli bir role sahiptir. *Dhh*, testiste, *Sry* ekspresyonundan sonra başlayan ve ilk eksprese edilen genlerden birisidir. Farelerde *Dhh* ekspresyonu ilk olarak, E11.5'de öncü-Sertoli hücrelerinde görülür (126), yetişkinlik döneminde de ekspresyonu devam eder. XY embriyolarının gelişimi sırasında, *Dhh* sinyalinin eksik olması, en erken E13.5'den başlayarak, uterusda testiküler defektlerle ve yetişkinlik döneminde de matür sperm oluşumunun gerçekleşmemesi ile karakterizedir.

Bu tez çalışmamızda, Hh sinyal yolağının testiste daha başka rolleri de olduğunu hipotez ettik. Bu kapsamda, bu tez çalışmasında, Hh sinyal yolağı elemanlarının a) yetişkin kemirgen testisinde hangi hücrelerde eksprese olduğunu, b) gelişmekte olan kemirgen testisinde hangi hücrelerde eksprese olduğunu ve postnatal testiste Hh sinyalinin inhibe edilmesiyle, hangi gen ekspresyonlarının etkilendiğini c) yetişkin testiküler kök hücrelerdeki ekspresyonunu, d) testis gelişimini olumsuz yönde etkileyen deney modellerinde Hh ekspresyonunun nasıl etkilendiğini, ve son olarak da e) insan neoplazma örneklerinde bu yolağın eksprese olup olmadığını araştırdık.

Hh sinyal yolağı elemanlarının, yetişkin sıçan testisindeki ekspresyonları araştırıldığında, bu yolağa ait tüm elemanlarının yetişkin sıçan testisinde eksprese olduğu gözlemlendi. Bu tez çalışmasıyla beraber ilk defa olarak, Hh sinyal yolağının tüm elemanlarının yetişkin sıçan testisinde eksprese olduğu kanıtlanmış oldu. Yetişkin sıçan testisinde, *Dhh* mRNA ekspresyonu, sadece Sertoli hücrelerinde gözlenirken, Hh sinyalinin anahtar elemanlarından olan *Ptc2*, *Smo* ve *Fu*, en yoğun olarak spermatogoniyada, spermatositlerde ve daha az belirgin olarak da yuvarlak spermatidlerde eksprese oldu. *Gli*'ler birbirlerinden farklı ancak yine de örtüşen bir ekspresyon profili gösterdiler; her üçü de spermatogoniyada ve spermatositlerde gözlenirken *Gli2*, *Gli1* ve *Gli3* ile kıyaslandığında, *Gli2* yuvarlak spermatidlerde daha az düzeyde gözlemlendi. Diğer sinyal yolağı elemanlarının aksine, Hh sinyalinin negatif düzenleyicisi olan *SuFu*'yu kodlayan mRNA, yuvarlak spermatidlerde yoğun olarak bulundu ve *SuFu* proteini de yuvarlak ve uzamış spermatidlerde ortaya çıktı. Öyle anlaşılmaktadır ki, *SuFu* hariç Hh sinyalinin diğer elemanlarına ait mRNA'lar, tübül bazalinden başlayarak uzamış spermatidlere kadar olan bölgede (spermatogoniya, spermatosit ve yuvarlak spermatidler) eksprese olurken, Hh sinyalinin negatif düzenleyicisi olan *SuFu*'yu kodlayan mRNA'nın ekspresyonu ancak yuvarlak spermatidlerde başlamaktadır ve uzamış spermatidlerde devam etmektedir.

Dolayısıyla, SuFu'nun post-mayotik germ hücrelerinde, Hh sinyal yolağının down-regüle olmasını sağlayabileceği düşünülebilir.

İlginç olarak Hh sinyal yolağı elemanlarına ait mRNA ekspresyon profilleri, gelişmekte olan testis ile yetişkin testisinde farklılıklar göstermektedir. Hh elemanlarına ait mRNA'lar, gelişmekte olan sıçan testisinde E17.5'de, gonositlerde eksprese olurken, prenatal (E21.5) ve postnatal günde (PND4), Sertoli hücrelerinde eksprese oldu. Dolayısıyla, bu ekspresyon profili, Hh sinyaline ait tüm elemanların, embriyonik dönemde gonositlerde eksprese olduğunu ancak spermatogenezin ilk dalgasının başlamasıyla bu ekspresyonun Sertoli hücrelerine geçtiğini göstermektedir. Sıçanların embriyonik gelişiminde E17.5, gonositlerin çok yeni olarak sessizlik (dinlenme) dönemlerine girdiği ve bazı gonositlerin halen proliferatif aktivitelerini sürdürdüğü bir dönem olmasında dolayı, Hh'ların bu hücrelerde mRNA'larını eksprese etmeleri, bu hücrelerin proliferasyon olaylarına katılabileceklerini gösterebilir. E21.5'de ve PND4'de ise, gonositler tamamen sessizlik dönemlerinde bulunurken, Sertoli hücreleri proliferasyon aktivitelerini devam ettirmekte ve Hh'lar bu hücrelerde eksprese olması, bu dönemde Sertoli hücre proliferasyon olayını etkileyebileceğini gösterebilir. Şu anda, SuFu hariç tüm Hh sinyal yolağı elemanlarına (Dhh, Ptch2, Smo, Gli1, Gli2, Gli3 ve Fu) ait uygun antikolar henüz üretilmemiş olduğundan, biz bu çalışmamızda, Hh sinyal yolağına ait elemanların protein ekspresyon profillerini immunohistokimyasal tekniklerle belirleyemedik. Sözü ettiğimiz Hh sinyal yolağı elemanları ile ilgili uygun antikolar piyasa çıktığında, immunohistokimyasal yöntemler kullanılarak, hangi testiküler hücrelerin ilgili Hh sinyal yolağı proteinlerini içerdiğini belirlemek de mümkün olacaktır. Çalışmamızda, in situ hibridizasyon bulgularımız, postnatal testiste, Hh sinyal yolağının Sertoli hücrelerinde eksprese olduğunu göstermesine rağmen, damla kültür yöntemi kullanarak postnatal testiste Hh aktivitesini inhibe ettiğimizde, mayotik genlerin ekspresyonlarının da değiştiği gözlenmiştir. Damla kültürlerde (Bölüm 3.5.'de anlatıldı), PND1'deki fare gonadı seminifer tübülleri 24 saat boyunca Hh inhibitörü olan cyclopamine'nin varlığında ve yokluğunda kültüre edilmiştir. Cyclopamine uygulanan grupta, kültür sisteminin çalışarak, Hh yolağının inhibe edildiği, *Gli1* ekspresyonundaki anlamlı azalma ile belirlenmiştir. Cyclopamine uygulanan grupta, *Gli1*'in anlamlı derecede azalması, Hh sinyal aktivitesinin inhibe edildiğini göstermektedir. Erken postnatal dönemde, Hh'ların ortamda bulunmamasıyla beraber, *Stra8* ve *SCYP3* gibi mayotik belirteçlerin ekspresyonlarının arttığı gözlenmiştir. Bu durum, postnatal testiste, *Stra8* ve *SCYP3* genlerinin, Sertoli hücrelerinde eksprese olan Dhh yolağı tarafından parakrin olarak regüle edildiğini ve ortamda Hh'ların azalmasıyla beraber, bu hücrelerin erken olgunlaşmaya gidebileceklerini gösterebilir. *Stra8* ve *SCYP3*, memeli testisinde germ hücrelerinin mitozdan mayoz dönüşümünden hemen önce eksprese olmakta ve bu belirteçleri eksprese eden hücreler, mayoz bölünmeye girebilmektedir. Postnatal testiste, *Stra8* ve *SCYP3* genlerinin aktiviteleri Hh sinyalinin inhibe edildiği durumda artış göstermiştir. Bu durum, postnatal testiste Sertoli hücrelerinde eksprese olan Hh sinyalinin, germ hücrelerinin mitotik bölünmelerini parakrin yoldan pozitif yönde etkilediğini ve bu genlerin ekspresyonlarının düzenlenmesinde Hh'ların da rol oynadığını göstermektedir.

Bu tezde, Hh sinyal yolağına ait mRNA'ların, embriyonik, postnatal ve yetişkin sıçan testisindeki hücrel ekspresyonu ile ilgili sunulan veriler göstermektedir ki, Hh sinyali, erken embriyonik dönemdeki gonositlerde eksprese olmakta ve muhtemelen bu hücrelerin proliferasyonlarına katılmakta, spermatogenezin ilk dalgasında, gonositlerin sessiz ancak Sertoli hücre proliferasyonunu devam ettiği dönemde, Sertoli hücrelerinde eksprese olarak muhtemelen bu hücrelerin proliferasyonunu otokrin olarak, germ hücrelerinin proliferasyonunu ise parakrin olarak desteklemektedir. Prenatal ve postnatal dönemdeki gonositlerde, Hh sinyal aktivitesi kaybolmasına rağmen, yetişkin testisinde spermatogenezin spesifik basamaklarında tekrar aktif olmakta, spermatogenezin düzenlenmesinde rol oynamakta ve germ hücrelerinin son farklılaşma basamağına girmesiyle (spermiyogenez) birlikte aktivasyonunu kaybetmektedir. Yine, uygun Gli antikollarının piyasada bulunmaması nedeniyle, hangi hücrelerde kesin olarak Gli proteinlerinin sentezlendiğı ya da hangi hücrelerde Gli'lerin uzun ya da yarıklanmış formlarının olduğu henüz tam olarak bilinmemektedir. Hh sinyal yolağı elemanlarının yetişkin sıçan testisi germ hücrelerindeki varlığı, daha önce yapılan transgenik fare çalışmalarıyla da uyumluluk göstermektedir. *Gli1*'i aşırı eksprese eden transgenik fare modelinde, pakiten spermatositler gelişimsel tutulum (arrest) göstermekte ve apoptoza gitmektedir (7).

Bu tez çalışmasının diğeri önemli bir bulgusu da, Hh sinyal yolağı elemanlarını kodlayan mRNA'ların dinlenmekte olan spermatogoniyal kök hücrelerde eksprese olduğunun bulunmasıdır. Radyasyona maruz kalan yetişkin sıçan testisi modelinde, radyasyon uygulamasından 15 hafta sonra, testis tübüllerinde kalan yegâne germ hücre tipi Tip A<sub>s</sub> spermatogoniyalar olup bu hücreler, proliferasyon kapasitelerini devam ettirmelerine rağmen farklılaşmadıkları için spermatogenezin devamlılığını sağlayamamaktadır. Bu modelde, GnRH antagonisti tedavisine yanıt olarak, azalan intratestiküler testosteron seviyesiyle beraber, spermatogoniyal kök hücrelerin farklılaşma yeteneklerini tekrar kazandığı ve tedaviden sonraki 4. haftayla beraber spermatogenezin iyileştiğı görülmüştür (153). Bu model, bizlere iki tane avantaj sağlamaktadır; normal yetişkin testisinde, sayısal olarak son derece az olmasından dolayı, kolaylıkla gözlenemeyen farklılaşmamış Tip A<sub>s</sub> kök hücre popülasyonunda, Hh'ların ekspresyonlarını araştırabilmek ve tedavi sonrası farklılaşmış olan spermatogoniyal kök hücrelerde (Tip B spermatogoniya) Hh'ların ekspresyonlarını araştırabilmek. Bu modeli kullanarak yaptığımız *in situ* hibridizasyon analizleri sonucunda, farklılaşmamış Tip A<sub>s</sub> kök hücre popülasyonunda, Hh sinyal yolağı elemanlarının eksprese olduğu, bu transkriptlerin ekspresyonunun tedaviden sonraki 1-2 hafta boyunca da sürmesine rağmen, tedaviden sonraki 4. haftada, yani spermatogoniyaların farklılaşmasıyla beraber kaybolduğı ortaya konmaktadır. Bu bulgularımız orijinal olup, bu bulgularla beraber, ilk defa olarak, Hh sinyalinin proliferasyon için kök hücrelerde aktif olduğunu ancak, kök hücrelerin farklılaşmaya başlamasıyla beraber sinyalin kapandığı gösterilmektedir.

Radyasyona uğramış sıçan testis modelinde, *Dhh* mRNA'sının da diğeri sinyal elemanları ile aynı hücrelerde (spermatogoniyal kök hücreler) eksprese olduğu gösterilmiştir. Bu durum, Hh sinyal yolağı ligandının özel durumlarda yolak aktivitesinin devamlılığını sağlamak için otokrin olarak da görev yapabileceğini



göstermektedir. Hh sinyal yolağının normal ve kanserli dokularda projenitör ve kök hücrelerin proliferasyon ve farklılaşma olaylarını düzenlediği düşünüldüğünde, anormal olarak hücrelerin sürekli proliferasyon olduğu durumda, Hh sinyal yolağı kontrolsüz aktivitesini sürdürebilmek için plastisite özelliği göstererek otokrin görev de yapabileceğini düşünülebilir. Kanser kök hücrelerine bakıldığında, Peacock ve ark., Hh ligandının Multiple Myeloma hücrelerinde farklılaşma olmaksızın büyümelerini indüklediğini gösterirken, bu hücrelerde Hh sinyalinin inhibe edilmesiyle birlikte terminal farklılaşmanın gerçekleştiğini belirtmiştir (68). Bizim çalışmamızda radyasyon modelinde gösterildiği gibi, Hh sinyal yolağına ait transkriptlerin ekspresyonları, değişen hormonal çevreyle beraber spermatogoniyal kök hücrelerin farklılaşmasıyla kaybolduğundan, bu yolağın spesifik hormonlar tarafından nasıl etkilendiği ileride çalışılmayı bekleyen konular arasındadır.

Normal dokularda, Hh-indüklü projenitör hücre proliferasyonu, devamlı yenilenmeyi (rejenerasyon) önlemek için, çok sıkı bir şekilde düzenlenmektedir. Ancak, Hh sinyal yolağının kontrolsüz olarak sürekli aktivasyonu birçok kanser türünün gelişimi ilişkilendirilmekte ve projenitör hücrelerin kontrolsüz bir şekilde kendi-kendilerini yenilemeleri söz konusu olmaktadır (133, 134, 137, 164-167). Örneğin, *Ptc* mutasyonundan dolayı Hh sinyalinin aşırı aktive olduğu durum, basal cell carcinoma, medullablastoma ve rhabdomyosarcoma ile karakterize Gorlin's sendromuna neden olmaktadır (135, 136). Hh sinyal yolağının diğer elemanları da birçok kanser türünün başlamasında ve devamlılığında rol oynamaktadır. Bunlardan en dikkat çekicisi, *Gli1*'in human glioma'da amplifiye olduğunun bulunmasıdır (168). Hh sinyal yolağının *Smo* ve *Gli2* mutasyonu ile anormal aktive gösterdiği durumlarda da basal cell carcinoma bildirilmiştir (137, 138, 147). Ayrıca, yolağın negatif regülatörü olan *SuFu*'nun mutasyona uğrayarak fonksiyonunu yitirdiği durumda, birçok tümör gelişimi ile ilişkilendirilmektedir (139, 140, 169, 170). Hh sinyal yolağı, hücre proliferasyon ve farklılaşmasını düzenlemesinden dolayı, bu yolağın elemanlarında meydana gelebilecek herhangi bir mutasyonun çeşitli tümör oluşumlarıyla karakterize edilmesi şaşırtıcı değildir.

Testiküler kanser, en fazla 15-35 yaş aralığındaki erkeklerde yaygındır (171). Testiküler germ hücre tümörleri (TGCTs), Carcinoma İn Situ (CIS) olarak bilinen prekürsör hücrelerden köken alır. CIS ilk olarak, Skakkebaek tarafından erkek hastaların testis biyopsilerinde, atipik spermatogoniya olarak tanımlanmış ve bu hastalarda daha sonra testiküler kanser geliştiği rapor edilmiştir (172). CIS hücreleri ile insan fetal germ hücreleri arasındaki morfolojik benzerlikler ve protein ekspresyonlarının karşılaştırılması sonucunda, CIS hücrelerinin fetal yaşamın erken dönemlerinde bulunan gonositlerden köken aldığı sonucuna varılmıştır (173). CIS hücreleri ile gonositler arasındaki benzerlikler, her iki hücrede de placentallike alkaline fosfatase (PLAP), OCT-3/4, Nanog ve C-KIT gibi gelişimsel olarak düzenlenen proteinleri eksprese etmeleriyle de desteklenmiştir (174, 175). TGCT'ler genellikle puberte sonrası dönemde gelişmekte, bu dönemdeki hormonal değişikliklerle (androjenlerin sentezinde artış) ilişkilendirilmektedir. Histolojik ve klinik olarak, TGCT'ler, seminoma ve nonseminoma alt gruplarına ayrılmaktadır (176). Seminomalar, CIS hücrelerine benzer hücreler içerir. Nonseminomalar, erken embriyonik gelişimi taklit ederler ve embriyonal karsinoma olarak adlandırılan ve

birçok çeşit somatik hücre tipine (teratoma) ve ekstra embriyonik yapılara (vitellus kesesi tümörleri ve karyokarsinoma) farklılaşabilen kök hücreler içerirler (175).

Bu tez çalışmasında kullanılan seminoma, non-seminoma ve CIS gibi insan neoplazma örneklerinde, Hh sinyal yolağı transkripsiyon faktörü olan *Gli1* aktivitesinin pozitif olduğu gösterilmiştir. Yukarıda bahsedildiği gibi, TGCT'lerin gelişimindeki en kritik zaman aralığı, puberte olup puberte sonrası dönemde, bu tümörlerin gelişimleri çok söz konusu değildir. Pubertede hormonal etkinin artmasıyla beraber, CIS transformasyonun olabileceği düşünülmektedir. Bu tezde, embriyonik germ hücrelerinde (gonositlerde) Hh yolağı aktivitesinin pozitif olduğu ve neoplazmalı hasta gruplarında da bu sinyal yolağının aktivite gösterdiği göz önüne alındığında, embriyonik dönemde herhangi bir hasardan dolayı normal olarak farklılaşamayan ve yetişkinlik döneminde varlığını sürdüren Hh pozitif gonositler, belki de spermatogenezin ilk dalgasında, puberteden hemen önce, hormonların upregüle olduğu zaman aralığında, CIS transformasyonuna katkı sağlayabilirler.

Fötal gonositlerin CIS hücrelerine dönüşüm mekanizması ve bunun daha sonra TGCT'ye ilerlemesiyle ilgili mekanizma henüz çok az olarak anlaşılmış olmasına rağmen CIS ve TGCT'lerin gen ekspresyon profillerinin, fötal germ hücreleri ile karşılaştırılması, testiküler neoplazma biyolojisinin anlaşılmasına katkı sağlamaktadır. Gelişmekte olan sıçan testis dokularında, Hh sinyalinin sıkı bir şekilde kontrol edilerek embriyonik dönemde gonositlerde ve spermatogenezin ilk dalgasında Sertoli hücrelerinde eksprese edildiğinin, insan testis kanserli dokularda *Gli1* mRNA aktivitesinin olduğunun anlaşılmasıyla, testiküler gelişimin hasara uğradığı durumda, Hh sinyal yolağı ekspresyonunun araştırılması gerektiğini düşündürmüştür.

Erkek sıçanların fötal dönemde, DBP gibi fitalat esterlerine maruziyetiyle, insanlarda testisküler disgenез sendromuna benzer üreme bozukluklarını indüklediği bilinmektedir. Fötal dönemde DBP maruziyetiyle, erkek sıçanlarda, Sertoli ve Leydig hücrelerinin yetersiz olgunlaştığı ve prenatal dönemde Sertoli hücre sayısının azaldığı, gonositlerinin anormal yapıda olduğu (çoklu-çekirdeğe sahip gonositler, MNG) ve kontrollerle kıyaslandığında embriyonik gelişim ile ilgili gen ekspresyonlarının (örneğin, Oct-4) DBP grubunda, daha uzun bir zaman aralığında eksprese olduğu belirlenmiştir (162). Fötal dönemde DBP'ye maruz kalan hayvanların yetişkinlik dönemlerinde de Leydig hücrelerine tübül içerisinde rastlanması, immatür Sertoli hücreleri gibi testiküler kanserli hastlardakine benzer üreme bozuklukları gözlenmiştir (163). Sıçanlarda DBP'den kaynaklı bozukluklar ile insanlardaki testiküler kanseri de içeren testiküler disgenез sendrom arasındaki benzerliklerden dolayı, bu model, testiküler kanser oluşumuna neden olan CIS hücrelerinin oluşumlarının altında yatan moleküler mekanizmaların araştırılmasını olası kılabilir. Ancak, insan fötal testisindeki CIS hücrelerinin başlangıcının, DBP modeli sıçanlarında gösterilen semptomlarla benzerlik gösterip-göstermediği bilinmemektedir (64).

Tez çalışmamızda kullandığımız DBP modelinde, daha önce aynı modelin kullanılmasıyla varılan sonuçlara benzer şekilde (162, 163, 177), kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, MNG'ler hem DBP maruziyetinin devam ettiği E21.5'de hemde

DBP maruziyetinin kesildiği PND4'de yoğun olarak gözlenmiştir. PND4'de halen MNG'lerin gözlenmesi, DBP maruziyetinin kesilmesine rağmen etkisinin halen sürdüğünü ifade etmektedir. MNG'lerin oluşum mekanizması bilinmemesine rağmen, bunların anormal/tamamlanmamış hücre bölünmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (162). Ancak, MNG'ler ile testiküler disgenez sendromu arasında direkt ilişki olduğu düşünülmemektedir. Çünkü normal olarak gelişen seminifer kordonlarda da MNG'lerin varlığına rastlanmaktadır (64). Ancak, fetal dönemde DBP maruziyeti ile artan MNG oluşumunun, fetal dönemdeki Sertoli hücre disfonksiyonunu ve sayısındaki değişimi yansıttığı düşünülmektedir (162). Azalan Sertoli hücre sayısı ve fonksiyonuyla beraber, yetişkinlik döneminde sperm sayısı ve fertilitenin azalması, MNG'lerin indirekt bir etkisi olarak kabul edilmektedir (163). Bulgularımızda, PCNA boyanmalarının sonuçlarına göre ise, kontrol grubu ile DBP grubu karşılaştırıldığında, Sertoli hücrelerinde PCNA boyanmasını şiddeti DBP grubunda azalma göstermektedir. Sertoli hücre fonksiyonunun azalmasıyla, ortamdaki germ hücrelerini destekleyebilecek sayıda Sertoli hücresinin bulunmamasından dolayı, bazı germ hücrelerinin anormal olarak gelişmesine olanak sağlayabileceği düşünülebilir. In situ hibridizasyon yöntemiyle DBP'ye maruz kalan hayvanlarda, Hh sinyal yolağı elemanlarının ekspresyonlarına bakıldığında, bu hayvanlarda bu yolağın sinyal aktivitesinin kontrollerde olduğu gibi Sertoli hücrelerinde aktif olduğu ancak kontrollere oranla ekspresyon şiddetinin arttığı gözlenmiştir. Bu bulgular, DBP maruziyetinde, Hh sinyal aktivitesinin kontrollere göre daha aktif olduğunu gösterir. Daha önceden gösterildiği gibi (162), DBP grubunda, embriyonik gelişimde görev alan genlerin ekspresyonlarının daha uzun bir zaman aralığına yayıldığı bilindiğinden, embriyonik gelişimi düzenleyen genlerden olan Hh'ların da ekspresyonlarının kontrollere göre daha şiddetli olması dikkat çekicidir. Aynı zamanda, DBP maruziyeti ile indüklenen Sertoli hücresi yetersiz fonksiyonunda da Hh'lar görev alabilir. Henüz, fetal dönemde Hh sinyal yolağının etkilediği alt sinyal yolakları bilinmediğinden, Hh ekspresyonunun artmasıyla, bu yolağın regüle ettiği downstream genlerin, Sertoli hücre fonksiyonunun bozulmasına katkı sağlayabileceği düşünülebilir.

Embriyonik dönemde testiküler gelişimin hasara uğradığı durumda, Hh sinyal yolağı elemanlarının ekspresyon durumlarına devam edecek olursak, aktivinlere değinmemiz gerekecektir. Aktivinler, TGF- $\beta$  süperaillesinin bir üyesi olup  $\beta$ A,  $\beta$ B,  $\beta$ C olarak adlandırılan inhibin  $\beta$  altbirimlerinin homodimer ya da heterodimerleridir. *Inhba*, *Inhbb*, *Inhbc* genleri tarafından kodlanırlar. Aktivin A (*Inhba*), ilk olarak, hipotalamus-hipofiz-gonad aksında görev yapan bir üreme hormonu olarak tanımlanmıştır (178). Günümüzde Aktivin A'nın, normal memeli gelişimi sırasında rol oynayan bir multifonksiyonel büyüme faktörü olduğu da anlaşılmıştır. Ayrıca, birçok hastalığın aktivin sinyalindeki bozukluktan ya da aktivinle ilişkili moleküllerin hasarından kaynaklandığı bilinmektedir (179, 180).

Aktivin A, kemirgenlerde özellikle juvenil testiste önemli fonksiyonlar görür. Bu ligandın üretimi spermatogenezin ilk adımlarının atıldığı dönemde dinamiklik göstermektedir (154, 181-184). Doğum öncesi gonositlerde, *Inhba* mRNA'sı ve proteini eksprese olur; aktivin A mRNA'sı değil ancak, aktivin A proteini, doğumdan hemen sonra da bu germ hücrelerinde depolanır. Yenidoğan ve juvenil testiste, Sertoli hücreleri, Leydig hücreleri ve germ hücreleri, aktivin A proteininin sentez alanlarıdır

(182, 184). Aktivin A proteini en yüksek düzeyine, sıçanlarda (184) ve farelerde (154), spermatogoniyal kök hücrelerin ilk defa görülmeye başladığı ve Sertoli hücre proliferasyonunun bitmesine yakın bir zaman dilimi olan testis gelişiminin postnatal birinci haftasında ulaşır; postnatal birinci haftada, gonositlerin spermatogoniyaya dönüşümü anında, aktivin miktarı keskin bir şekilde azalır (154, 182, 184, 185). Spermatogenik matürasyon zamanı ile uyumlu olacak biçimde, bu dönemde, germ hücreleri aktivin A proteini sentezlemezler ancak, aktivin sinyal inhibitörleri olan follistatin ve Bambi (BMP ve aktivin membran-bağımlı inhibitör) mRNA'sı sentezlerler (182, 183). Farede testiküler follistatin üretimi PND4'den itibaren artmaya başlar (154). Farelerde *in vivo* aktivin sinyalinin kronik artışı, doğumdan sonraki 4. hafta içerisinde Sertoli hücre-kaynaklı tümörlerin oluşumu ile ilişkilendirilmektedir (186-188). Erken embriyonik dönemde gonositlerde eksprese olan aktivin A mRNA'sının, bu dönemdeki gonositlerin sessizlik döneminde kalmalarını ve aşırı proliferasyon olmalarını engelledikleri düşünülmektedir. Bu bilgi ile uyumlu olarak *Inhba*<sup>-/-</sup> hayvanlarda, D0'da germ hücre sayısı, vahşi tiplerle karşılaştırıldığında anlamlı derecede artış göstermektedir. Doğumla beraber, azalan aktivin biyoaktivitesi ile Sertoli hücre sayısı da azalmaktadır (155). Bu bilgiler, *in vivo* aktivin sinyalinin, testis gelişimi sırasında, germ hücre proliferasyon ve farklılaşmasında ve Sertoli hücre proliferasyonunda rol oynadığını ve bu büyüme faktörünün, otokrin veya parakrin mekanizmalarla sıkı bir şekilde denetlendiğini gösterir.

Bu tez çalışmasında *Inhba*<sup>-/-</sup> fare testisi kullanılarak, vahşi tip ve aktivin A knock-out embriyonik testislerde, Hh sinyal yolağı transkripsiyon faktörü *Gli1*'in ekspresyonuna bakılmıştır. Hem vahşi tipte hem *Inhba*<sup>-/-</sup>'de *Gli1* mRNA'sı embriyonik dönemde (E13.5 ve E17.5) gonositlerde eksprese olmuştur. D0'da ise bu ekspresyon her iki grupta da Sertoli hücrelerinde gözlenmiştir. Ancak, *Gli1* mRNA ekspresyon şiddeti vahşi tipe göre gonositlerde artış göstermiştir. *Inhba*<sup>-/-</sup> farelerde, D0'da germ hücre sayısı, vahşi tipe göre artış gösterdiğinden, aktivin'in yokluğunda Hh sinyal yolağı aktivitesinin artış göstererek, gonosit proliferasyonundaki artışa katkı sağlayabileceği düşünülebilir. Ancak, gelişim zamanının ilerlemesiyle birlikte, ortamda aktivin olmadığında, Sertoli hücre sitoplazmasında eksprese olan *Gli1*'in kontrole göre sinyal aktivitesi de azalmıştır. Azalan aktivin sinyal aktivitesi ile birlikte Sertoli hücre sayısı da azalmaktadır. Bu hayvanlara Hh aktivitesinin de azalması, Hh'ların aktivin ile etkileşerek Sertoli hücre proliferasyon olayına katıldıklarını gösterebilir. Artan germ hücre sayısına karşılık, azalan Sertoli hücre sayısı, Sertoli hücrelerinin belirli sayıda germ hücrelerini destekleyebileceği düşünüldüğünde, olgunlaşmasını tamamlayamayan germ hücrelerinin ortamda bulunabileceğini de düşündürülebilir. Tüm bu durumlar, embriyonik gelişim döneminde, aktivinlerin, Hh sinyal aktivitesini regüle edebileceğini gösterebilir.

Burada sunulan tez çalışmasıyla, Hh sinyal yolağının, testisin gelişim döneminde bağlı olarak eksprese edildiğini ve sıkı bir şekilde kontrol edilerek, spermatogenezin özel basamaklarında fonksiyon gördüğünü göstermektedir. Buradaki bilgiler, Hh sinyalinin yalnızca normal spermatogenezde değil, yetişkin testiküler kök hücrelerinde de rol oynadığını göstermektedir. Hh sinyalinin, embriyonik dönemdeki

gonositlerde eksprese olduğunun bulunması, ayrıca, germ hücre gelişiminin bozulmasıyla bu sinyal yolağı aktivitesinde değişim gözlenmesi, bu yolağın anormal spermatogenezle ilişkilendirilebileceğini gösterebilir. İleride, gelişmekte olan testiste, Hh sinyalinin hangi alt yolakları çalıştırdığının araştırılması önem kazanmaktadır. Hh sinyalinindeki artışla ilişkilendirilen birçok kanser türünde, Hh sinyal aktivitesinin nasıl düzenlendiğinin belirlenmesi, özellikle testisteki aktivitesinin nasıl düzenlendiğinin bulunması, ileride testis kanser hastaları için bulunacak olan potansiyel ilaç tedavilerinde büyük önem taşımaktadır.

## SONUÇLAR

Bu tezde, Hedgehog sinyal yolağının spermatogenezdeki fonksiyonuna yönelik elde ettiğimiz sonuçlar maddeler halinde aşağıda özetlenmiştir.

- 1) Hh sinyal yolağına ait mRNA'lar, gelişmekte olan sıçan testisinde ve yetişkin sıçan testisinde dinamik bir şekilde eksprese olmaktadır.
- 2) Radyasyona maruz kalmış sıçan testisi modeline göre, Hh sinyal yolağına ait mRNA'lar, farklılaşmamış Tip A spermatogoniyalarda eksprese olmaktadır. Ancak, bu yolağına ait elemanların ekspresyonu, hücrelerin farklılaşmasıyla birlikte gözlenmemektedir.
- 3) Hh sinyal yolağına ait mRNA'lar, gelişmekte olan fare testisinde de, sıçan testisiyle benzer ekspresyon profili göstermektedir. Embriyonik gelişimleri sırasında DBP'ye maruz kalan farelerin testislerinde, Hh sinyal yolağına ait elemanların aktivitesi artmaktadır.
- 4) Aktinin geni knock-out edilen farelerin testislerinde, Hh sinyal yolağına ait elemanların aktivitesi artmaktadır. Bu durum, Hh sinyal yolağının embriyonik dönemde, germ hücre proliferasyonunda rol oynayabileceğini düşündürür.
- 5) Gelişmekte olan postnatal 1 günlük fare testislerinde, Cyclopamine ile Hh sinyal yolağını inhibe edildiğinde, *Stra8* ve *SCYP3* gibi mayoz ilişkili genlerin ekspresyonları artmaktadır. Bu durum, Hh sinyal yolağının, postnatal testiste mitotik aktiviteyi indüklediğini belirtebilir.
- 6) İnsan non-seminoma, seminoma ve CIS testislerinde, Hh sinyal yolağı aktivite göstermektedir. Testis kanserli dokularda, Hh sinyal yolağı inhibitörleri, tedavi geliştirilmesi amacıyla araştırılabilir.

## KAYNAKLAR

1. Rajpert-De Meyts E, Bartkova J, Samson M, Hoei-Hansen CE, Frydelund-Larsen L, Bartek J, Skakkebaek NE. The emerging phenotype of the testicular carcinoma in situ germ cell. *Apmis* 2003; 111: 267-278; discussion 278-269.
2. Nusslein-Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 1980; 287: 795-801.
3. McMahon AP, Ingham PW, Tabin CJ. Developmental roles and clinical significance of hedgehog signaling. *Curr Top Dev Biol* 2003; 53: 1-114.
4. Echelard Y, Epstein DJ, St-Jacques B, Shen L, Mohler J, McMahon JA, McMahon AP. Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* 1993; 75: 1417-1430.
5. Lanske B, Karaplis AC, Lee K, Luz A, Vortkamp A, Pirro A, Karperien M, Defize LH, Ho C, Mulligan RC, Abou-Samra AB, Juppner H, Segre GV, Kronenberg HM. PTH/PTHrP receptor in early development and Indian hedgehog-regulated bone growth. *Science* 1996; 273: 663-666.
6. Bitgood MJ, Shen L, McMahon AP. Sertoli cell signaling by Desert hedgehog regulates the male germline. *Curr Biol* 1996; 6: 298-304.
7. Kroft TL, Patterson J, Won Yoon J, Doglio L, Walterhouse DO, Iannaccone PM, Goldberg E. GLI1 localization in the germinal epithelial cells alternates between cytoplasm and nucleus: upregulation in transgenic mice blocks spermatogenesis in pachytene. *Biol Reprod* 2001; 65: 1663-1671.
8. de Kretser D, Kerr J. *Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press Ltd; 1994.
9. Russell L, Ettl R, Sinha Hikim A, Clegg E. *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*. Cache River Press; 1990.

10. Skinner M, Griswold M. Sertoli Cell Biology. San Diego: Elsevier Academic Press; 2005.
11. Byskov AG. Differentiation of mammalian embryonic gonad. *Physiol Rev* 1986; 66: 71-117.
12. Albrecht KH, Eicher EM. Evidence that Sry is expressed in pre-Sertoli cells and Sertoli and granulosa cells have a common precursor. *Dev Biol* 2001; 240: 92-107.
13. Bullejos M, Koopman P. Spatially dynamic expression of Sry in mouse genital ridges. *Dev Dyn* 2001; 221: 201-205.
14. Sekido R, Bar I, Narvaez V, Penny G, Lovell-Badge R. SOX9 is up-regulated by the transient expression of SRY specifically in Sertoli cell precursors. *Dev Biol* 2004; 274: 271-279.
15. Wilhelm D, Martinson F, Bradford S, Wilson MJ, Combes AN, Beverdam A, Bowles J, Mizusaki H, Koopman P. Sertoli cell differentiation is induced both cell-autonomously and through prostaglandin signaling during mammalian sex determination. *Dev Biol* 2005; 287: 111-124.
16. Lovell-Badge R, Hacker A. The molecular genetics of Sry and its role in mammalian sex determination. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1995; 350: 205-214.
17. De Santa Barbara P, Bonneaud N, Boizet B, Desclozeaux M, Moniot B, Sudbeck P, Scherer G, Poulat F, Berta P. Direct interaction of SRY-related protein SOX9 and steroidogenic factor 1 regulates transcription of the human anti-Mullerian hormone gene. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 6653-6665.
18. Xavier F, Allard S. Anti-Mullerian hormone, beta-catenin and Mullerian duct regression. *Mol Cell Endocrinol* 2003; 211: 115-121.
19. Lawson K, Pederson R. Clonal analysis of cell fate during gastrulation and early neurulation in the mouse. In: CIBA foundation symposium; 1992.
20. Chiquoine AD. The identification, origin, and migration of the primordial germ cells in the mouse embryo. *Anat Rec* 1954; 118: 135-146.
21. Ginsburg M, Snow MH, McLaren A. Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development* 1990; 110: 521-528.



22. McCarrey J. Cell and Molecular Biology of the Testis. New York: Oxford University Press; 1993.
23. Yoshinaga K, Nishikawa S, Ogawa M, Hayashi S, Kunisada T, Fujimoto T, Nishikawa S. Role of c-kit in mouse spermatogenesis: identification of spermatogonia as a specific site of c-kit expression and function. *Development* 1991; 113: 689-699.
24. Mintz B, Russell ES. Gene-induced embryological modifications of primordial germ cells in the mouse. *J Exp Zool* 1957; 134: 207-237.
25. Loveland KL, Schlatt S. Stem cell factor and c-kit in the mammalian testis: lessons originating from Mother Nature's gene knockouts. *J Endocrinol* 1997; 153: 337-344.
26. Adams IR, McLaren A. Sexually dimorphic development of mouse primordial germ cells: switching from oogenesis to spermatogenesis. *Development* 2002; 129: 1155-1164.
27. Bowles J, Knight D, Smith C, Wilhelm D, Richman J, Mamiya S, Yashiro K, Chawengsaksophak K, Wilson MJ, Rossant J, Hamada H, Koopman P. Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. *Science* 2006; 312: 596-600.
28. Koubova J, Menke DB, Zhou Q, Capel B, Griswold MD, Page DC. Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 2474-2479.
29. Borum K. Oogenesis in the mouse. A study of the meiotic prophase. *Exp Cell Res* 1961; 24: 495-507.
30. Hilscher B, Hilscher W, Bulthoff-Ohnolz B, Kramer U, Birke A, Pelzer H, Gauss G. Kinetics of gametogenesis. I. Comparative histological and autoradiographic studies of oocytes and transitional prospermatogonia during oogenesis and prespermatogenesis. *Cell Tissue Res* 1974; 154: 443-470.
31. Kluin PM, de Rooij DG. A comparison between the morphology and cell kinetics of gonocytes and adult type undifferentiated spermatogonia in the mouse. *Int J Androl* 1981; 4: 475-493.
32. de Rooij DG, Russell LD. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J Androl* 2000; 21: 776-798.

33. Kerr JB, Loveland, K.L., O'Bryan, M.K. and de Kretser, D.M. Cytology of the testis and intrinsic control mechanisms. 2006.
34. Kerr J, Loveland K, O'Bryan M, de Kretser D. Cytology of the Testis and Intrinsic Control Mechanisms. USA: Elsevier Science; 2006.
35. Yoshida S, Sukeno M, Nakagawa T, Ohbo K, Nagamatsu G, Suda T, Nabeshima Y. The first round of mouse spermatogenesis is a distinctive program that lacks the self-renewing spermatogonia stage. *Development* 2006; 133: 1495-1505.
36. Hakovirta H, Yan W, Kaleva M, Zhang F, Vanttinen K, Morris PL, Soder M, Parvinen M, Toppari J. Function of stem cell factor as a survival factor of spermatogonia and localization of messenger ribonucleic acid in the rat seminiferous epithelium. *Endocrinology* 1999; 140: 1492-1498.
37. Tajima Y, Sawada K, Morimoto T, Nishimune Y. Switching of mouse spermatogonial proliferation from the c-kit receptor-independent type to the receptor-dependent type during differentiation. *J Reprod Fertil* 1994; 102: 117-122.
38. Packer AI, Besmer P, Bachvarova RF. Kit ligand mediates survival of type A spermatogonia and dividing spermatocytes in postnatal mouse testes. *Mol Reprod Dev* 1995; 42: 303-310.
39. van Pelt AM, van Dissel-Emiliani FM, Gaemers IC, van der Burg MJ, Tanke HJ, de Rooij DG. Characteristics of A spermatogonia and preleptotene spermatocytes in the vitamin A-deficient rat testis. *Biol Reprod* 1995; 53: 570-578.
40. Huang HF, Nieschlag E. Suppression of the intratesticular testosterone is associated with quantitative changes in spermatogonial populations in intact adult rats. *Endocrinology* 1986; 118: 619-627.
41. Meachem SJ, McLachlan RI, Stanton PG, Robertson DM, Wreford NG. FSH immunoneutralization acutely impairs spermatogonial development in normal adult rats. *J Androl* 1999; 20: 756-762; discussion 755.
42. Meistrich ML, Shetty G. Inhibition of spermatogonial differentiation by testosterone. *J Androl* 2003; 24: 135-148.

43. Meistrich ML, Kangasniemi M. Hormone treatment after irradiation stimulates recovery of rat spermatogenesis from surviving spermatogonia. *J Androl* 1997; 18: 80-87.
44. Morelli MA, Cohen PE. Not all germ cells are created equal: aspects of sexual dimorphism in mammalian meiosis. *Reproduction* 2005; 130: 761-781.
45. Kerr JB, Loveland, KL., O'Bryan, MK. and de Kretser, DM Cytology of the testis and intrinsic control mechanisms. In: Neill, JD (ed) *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Elsevier Science, USA; 2006 pp.827-947.
46. Tarsounas M, Moens PB. Checkpoint and DNA-repair proteins are associated with the cores of mammalian meiotic chromosomes. *Curr Top Dev Biol* 2001; 51: 109-134.
47. Heyting C. Synaptonemal complexes: structure and function. *Curr Opin Cell Biol* 1996; 8: 389-396.
48. Handel MA. The XY body: a specialized meiotic chromatin domain. *Exp Cell Res* 2004; 296: 57-63.
49. Celeste A, Petersen S, Romanienko PJ, Fernandez-Capetillo O, Chen HT, Sedelnikova OA, Reina-San-Martin B, Coppola V, Meffre E, Difilippantonio MJ, Redon C, Pilch DR, Oлару A, Eckhaus M, Camerini-Otero RD, Tessarollo L, Livak F, Manova K, Bonner WM, Nussenzweig MC, Nussenzweig A. Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science* 2002; 296: 922-927.
50. Ross M, Romrell L, Kaye G. *Histology: A text and Atlas*. Baltimore: Williams and Wilkins.; 1995.
51. Ortega S, Prieto I, Odajima J, Martin A, Dubus P, Sotillo R, Barbero JL, Malumbres M, Barbacid M. Cyclin-dependent kinase 2 is essential for meiosis but not for mitotic cell division in mice. *Nat Genet* 2003; 35: 25-31.
52. Wolgemuth DJ, Laurion E, Lele KM. Regulation of the mitotic and meiotic cell cycles in the male germ line. *Recent Prog Horm Res* 2002; 57: 75-101.
53. Balhorn C, Thornton K, Krishnan V, Corzett M, Bench G, Kramer C, Lee J, IV A, Hud N, Priety M, Meyer-Ilse W, Brown J, Kirz J, ZHANG X, Bradbury E, Maki B, Breen W. *Protamine mediated condensation of DNA in mammalian sperm*. Vienna: Cache River Press; 1999.

54. Cho C, Willis WD, Goulding EH, Jung-Ha H, Choi YC, Hecht NB, Eddy EM. Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. *Nat Genet* 2001; 28: 82-86.
55. Wu JY, Ribar TJ, Cummings DE, Burton KA, McKnight GS, Means AR. Spermiogenesis and exchange of basic nuclear proteins are impaired in male germ cells lacking Camk4. *Nat Genet* 2000; 25: 448-452.
56. Kleene KC. Patterns of translational regulation in the mammalian testis. *Mol Reprod Dev* 1996; 43: 268-281.
57. Fawcett DW. The mammalian spermatozoon. *Dev Biol* 1975; 44: 394-436.
58. Sprando RL, Russell LD. Comparative study of cytoplasmic elimination in spermatids of selected mammalian species. *Am J Anat* 1987; 178: 72-80.
59. Russell LD, Malone JP. A study of Sertoli-spermatid tubulobulbar complexes in selected mammals. *Tissue Cell* 1980; 12: 263-285.
60. De Kretser DM. Ultrastructural features of human spermiogenesis. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 1969; 98: 477-505.
61. Karl J, Capel B. Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. *Dev Biol* 1998; 203: 323-333.
62. Chemes HE. Infancy is not a quiescent period of testicular development. *Int J Androl* 2001; 24: 2-7.
63. Vitale R, Fawcett DW, Dym M. The normal development of the blood-testis barrier and the effects of clomiphene and estrogen treatment. *Anat Rec* 1973; 176: 331-344.
64. Fisher JS, Macpherson S, Marchetti N, Sharpe RM. Human 'testicular dysgenesis syndrome': a possible model using in-utero exposure of the rat to dibutyl phthalate. *Hum Reprod* 2003; 18: 1383-1394.
65. Hess RA, Cooke PS, Hofmann MC, Murphy KM. Mechanistic insights into the regulation of the spermatogonial stem cell niche. *Cell Cycle* 2006; 5: 1164-1170.
66. Griswold MD. Interactions between germ cells and Sertoli cells in the testis. *Biol Reprod* 1995; 52: 211-216.

67. Russell LD, Clermont Y. Degeneration of germ cells in normal, hypophysectomized and hormone treated hypophysectomized rats. *Anat Rec* 1977; 187: 347-366.
68. Peacock CD, Wang Q, Gesell GS, Corcoran-Schwartz IM, Jones E, Kim J, Devereux WL, Rhodes JT, Huff CA, Beachy PA, Watkins DN, Matsui W. Hedgehog signaling maintains a tumor stem cell compartment in multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 4048-4053.
69. Li MW, Xia W, Mruk DD, Wang CQ, Yan HH, Siu MK, Lui WY, Lee WM, Cheng CY. 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* 2006; 190: 313-329.
70. de Kretser DM, Loveland KL, Meinhardt A, Simorangkir D, Wreford N. Spermatogenesis. *Hum Reprod* 1998; 13 Suppl 1: 1-8.
71. Cooke PS, Hess RA, Porcelli J, Meisami E. Increased sperm production in adult rats after transient neonatal hypothyroidism. *Endocrinology* 1991; 129: 244-248.
72. Jutte NH, Jansen R, Grootegoed JA, Rommerts FF, van der Molen HJ. FSH stimulation of the production of pyruvate and lactate by rat Sertoli cells may be involved in hormonal regulation of spermatogenesis. *J Reprod Fertil* 1983; 68: 219-226.
73. Jutte NH, Grootegoed JA, Rommerts FF, van der Molen HJ. Exogenous lactate is essential for metabolic activities in isolated rat spermatocytes and spermatids. *J Reprod Fertil* 1981; 62: 399-405.
74. Djakiew D, Dym M. Pachytene spermatocyte proteins influence Sertoli cell function. *Biol Reprod* 1988; 39: 1193-1205.
75. Morales C, Sylvester SR, Griswold MD. Transport of iron and transferrin synthesis by the seminiferous epithelium of the rat in vivo. *Biol Reprod* 1987; 37: 995-1005.
76. Holmes SD, Bucci LR, Lipshultz LI, Smith RG. Transferrin binds specifically to pachytene spermatocytes. *Endocrinology* 1983; 113: 1916-1918.
77. Skinner MK, Griswold MD. Sertoli cells synthesize and secrete a ceruloplasmin-like protein. *Biol Reprod* 1983; 28: 1225-1229.

78. Mendis-Handagama SM, Risbridger GP, de Kretser DM. Morphometric analysis of the components of the neonatal and the adult rat testis interstitium. *Int J Androl* 1987; 10: 525-534.
79. Martineau J, Nordqvist K, Tilmann C, Lovell-Badge R, Capel B. Male-specific cell migration into the developing gonad. *Curr Biol* 1997; 7: 958-968.
80. Merchant-Larios H, Moreno-Mendoza N, Buehr M. The role of the mesonephros in cell differentiation and morphogenesis of the mouse fetal testis. *Int J Dev Biol* 1993; 37: 407-415.
81. Hardy MP, Sharma RS, Arambepola NK, Sottas CM, Russell LD, Bunick D, Hess RA, Cooke PS. Increased proliferation of Leydig cells induced by neonatal hypothyroidism in the rat. *J Androl* 1996; 17: 231-238.
82. Brennan J, Tilmann C, Capel B. Pdgfr-alpha mediates testis cord organization and fetal Leydig cell development in the XY gonad. *Genes Dev* 2003; 17: 800-810.
83. Yao HH, Whoriskey W, Capel B. Desert Hedgehog/Patched 1 signaling specifies fetal Leydig cell fate in testis organogenesis. *Genes Dev* 2002; 16: 1433-1440.
84. Habert R, Lejeune H, Saez JM. Origin, differentiation and regulation of fetal and adult Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 179: 47-74.
85. Vergouwen RP, Jacobs SG, Huiskamp R, Davids JA, de Rooij DG. Proliferative activity of gonocytes, Sertoli cells and interstitial cells during testicular development in mice. *J Reprod Fertil* 1991; 93: 233-243.
86. Waterman MR, Simpson ER. Regulation of steroid hydroxylase gene expression is multifactorial in nature. *Recent Prog Horm Res* 1989; 45: 533-563; discussion 563-536.
87. Shan LX, Zhu LJ, Bardin CW, Hardy MP. Quantitative analysis of androgen receptor messenger ribonucleic acid in developing Leydig cells and Sertoli cells by in situ hybridization. *Endocrinology* 1995; 136: 3856-3862.
88. McLaren A. Gonad development: assembling the mammalian testis. *Curr Biol* 1998; 8: R175-177.

89. Capel B, Albrecht KH, Washburn LL, Eicher EM. Migration of mesonephric cells into the mammalian gonad depends on Sry. *Mech Dev* 1999; 84: 127-131.
90. Clark AM, Garland KK, Russell LD. Desert hedgehog (Dhh) gene is required in the mouse testis for formation of adult-type Leydig cells and normal development of peritubular cells and seminiferous tubules. *Biol Reprod* 2000; 63: 1825-1838.
91. Maekawa M, Kamimura K, Nagano T. Peritubular myoid cells in the testis: their structure and function. *Arch Histol Cytol* 1996; 59: 1-13.
92. de Kretser DM, Temple-Smith PD, Kerr JB. Anatomical and functional aspects of the male reproductive organs. In: Bandhauer K FJ (ed.) *Handbook of Urology, , Disturbances in Male Fertility.*, vol. XVI. Berlin: Springer-Verlag; 1982: 1-131.
93. Yoshida S, Sukeno M, Nabeshima Y. A vasculature-associated niche for undifferentiated spermatogonia in the mouse testis. *Science* 2007; 317: 1722-1726.
94. Rannikki AS, Zhang FP, Huhtaniemi IT. Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in the rat testis and ovary. *Mol Cell Endocrinol* 1995; 107: 199-208.
95. Heckert LL, Griswold MD. The expression of the follicle-stimulating hormone receptor in spermatogenesis. *Recent Prog Horm Res* 2002; 57: 129-148.
96. Singh J, Handelsman DJ. Neonatal administration of FSH increases Sertoli cell numbers and spermatogenesis in gonadotropin-deficient (hpg) mice. *J Endocrinol* 1996; 151: 37-48.
97. Singh J, O'Neill C, Handelsman DJ. Induction of spermatogenesis by androgens in gonadotropin-deficient (hpg) mice. *Endocrinology* 1995; 136: 5311-5321.
98. Meachem SJ, McLachlan RI, de Kretser DM, Robertson DM, Wreford NG. Neonatal exposure of rats to recombinant follicle stimulating hormone increases adult Sertoli and spermatogenic cell numbers. *Biol Reprod* 1996; 54: 36-44.

99. Corrigan AZ, Bilezikjian LM, Carroll RS, Bald LN, Schmelzer CH, Fendly BM, Mason AJ, Chin WW, Schwall RH, Vale W. Evidence for an autocrine role of activin B within rat anterior pituitary cultures. *Endocrinology* 1991; 128: 1682-1684.
100. Carroll RS, Corrigan AZ, Vale W, Chin WW. Activin stabilizes follicle-stimulating hormone-beta messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology* 1991; 129: 1721-1726.
101. Carroll RS, Kowash PM, Lofgren JA, Schwall RH, Chin WW. In vivo regulation of FSH synthesis by inhibin and activin. *Endocrinology* 1991; 129: 3299-3304.
102. Carroll RS, Corrigan AZ, Gharib SD, Vale W, Chin WW. Inhibin, activin, and follistatin: regulation of follicle-stimulating hormone messenger ribonucleic acid levels. *Mol Endocrinol* 1989; 3: 1969-1976.
103. Attardi B, Winters SJ. Decay of follicle-stimulating hormone-beta messenger RNA in the presence of transcriptional inhibitors and/or inhibin, activin, or follistatin. *Mol Endocrinol* 1993; 7: 668-680.
104. Gregory SJ, Kaiser UB. Regulation of gonadotropins by inhibin and activin. *Semin Reprod Med* 2004; 22: 253-267.
105. Eblen A, Bao S, Lei ZM, Nakajima ST, Rao CV. The presence of functional luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptors in human sperm. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 2643-2648.
106. Zhang FP, Pakarainen T, Zhu F, Poutanen M, Huhtaniemi I. Molecular characterization of postnatal development of testicular steroidogenesis in luteinizing hormone receptor knockout mice. *Endocrinology* 2004; 145: 1453-1463.
107. Zhang FP, Poutanen M, Wilbertz J, Huhtaniemi I. Normal prenatal but arrested postnatal sexual development of luteinizing hormone receptor knockout (LuRKO) mice. *Mol Endocrinol* 2001; 15: 172-183.
108. Mendis-Handagama SM. Luteinizing hormone on Leydig cell structure and function. *Histol Histopathol* 1997; 12: 869-882.



109. Lei ZM, Mishra S, Ponnuru P, Li X, Yang ZW, Rao Ch V. Testicular phenotype in luteinizing hormone receptor knockout animals and the effect of testosterone replacement therapy. *Biol Reprod* 2004; 71: 1605-1613.
110. Kerr JB, Maddocks S, Sharpe RM. Testosterone and FSH have independent, synergistic and stage-dependent effects upon spermatogenesis in the rat testis. *Cell Tissue Res* 1992; 268: 179-189.
111. Holdcraft RW, Braun RE. Hormonal regulation of spermatogenesis. *Int J Androl* 2004; 27: 335-342.
112. Kerr JB, Savage GN, Millar M, Sharpe RM. Response of the seminiferous epithelium of the rat testis to withdrawal of androgen: evidence for direct effect upon intercellular spaces associated with Sertoli cell junctional complexes. *Cell Tissue Res* 1993; 274: 153-161.
113. O'Donnell L, McLachlan RI, Wreford NG, de Kretser DM, Robertson DM. Testosterone withdrawal promotes stage-specific detachment of round spermatids from the rat seminiferous epithelium. *Biol Reprod* 1996; 55: 895-901.
114. Pepinsky RB, Zeng C, Wen D, Rayhorn P, Baker DP, Williams KP, Bixler SA, Ambrose CM, Garber EA, Miatkowski K, Taylor FR, Wang EA, Galdes A. Identification of a palmitic acid-modified form of human Sonic hedgehog. *J Biol Chem* 1998; 273: 14037-14045.
115. Porter JA, Young KE, Beachy PA. Cholesterol modification of hedgehog signaling proteins in animal development. *Science* 1996; 274: 255-259.
116. Carpenter D, Stone DM, Brush J, Ryan A, Armanini M, Frantz G, Rosenthal A, de Sauvage FJ. Characterization of two patched receptors for the vertebrate hedgehog protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 13630-13634.
117. Lee CS, Buttitta L, Fan CM. Evidence that the WNT-inducible growth arrest-specific gene 1 encodes an antagonist of sonic hedgehog signaling in the somite. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 11347-11352.
118. Deneff N, Neubuser D, Perez L, Cohen SM. Hedgehog induces opposite changes in turnover and subcellular localization of patched and smoothed. *Cell* 2000; 102: 521-531.

119. van den Heuvel M, Ingham PW. *smoothed* encodes a receptor-like serpentine protein required for hedgehog signalling. *Nature* 1996; 382: 547-551.
120. Taipale J, Cooper MK, Maiti T, Beachy PA. Patched acts catalytically to suppress the activity of Smoothed. *Nature* 2002; 418: 892-897.
121. Huangfu D, Anderson KV. Signaling from Smo to Ci/Gli: conservation and divergence of Hedgehog pathways from *Drosophila* to vertebrates. *Development* 2006; 133: 3-14.
122. Jia J, Jiang J. Decoding the Hedgehog signal in animal development. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63: 1249-1265.
123. Stone DM, Hynes M, Armanini M, Swanson TA, Gu Q, Johnson RL, Scott MP, Pennica D, Goddard A, Phillips H, Noll M, Hooper JE, de Sauvage F, Rosenthal A. The tumour-suppressor gene *patched* encodes a candidate receptor for Sonic hedgehog. *Nature* 1996; 384: 129-134.
124. Capdevila J, Johnson RL. Hedgehog signaling in vertebrate and invertebrate limb patterning. *Cell Mol Life Sci* 2000; 57: 1682-1694.
125. Chiang C, Litingtung Y, Lee E, Young KE, Corden JL, Westphal H, Beachy PA. Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* 1996; 383: 407-413.
126. Bitgood MJ, McMahon AP. Hedgehog and *Bmp* genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interaction in the mouse embryo. In: *Dev Biol*, vol. 172; 1995: 126-138.
127. Walterhouse DO, Lamm ML, Villavicencio E, Iannaccone PM. Emerging roles for hedgehog-patched-Gli signal transduction in reproduction. *Biol Reprod* 2003; 69: 8-14.
128. Pepicelli CV, Lewis PM, McMahon AP. Sonic hedgehog regulates branching morphogenesis in the mammalian lung. *Curr Biol* 1998; 8: 1083-1086.
129. Wijgerde M, Ooms M, Hoogerbrugge JW, Grootegoed JA. Hedgehog signaling in mouse ovary: Indian hedgehog and desert hedgehog from granulosa cells induce target gene expression in developing theca cells. *Endocrinology* 2005; 146: 3558-3566.

130. St-Jacques B, Hammerschmidt M, McMahon AP. Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev* 1999; 13: 2072-2086.
131. Parmantier E, Lynn B, Lawson D, Turmaine M, Namini SS, Chakrabarti L, McMahon AP, Jessen KR, Mirsky R. Schwann cell-derived Desert hedgehog controls the development of peripheral nerve sheaths. *Neuron* 1999; 23: 713-724.
132. Watkins DN, Berman DM, Burkholder SG, Wang B, Beachy PA, Baylin SB. Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. *Nature* 2003; 422: 313-317.
133. Thayer SP, di Magliano MP, Heiser PW, Nielsen CM, Roberts DJ, Lauwers GY, Qi YP, Gysin S, Fernandez-del Castillo C, Yajnik V, Antoniu B, McMahon M, Warshaw AL, Hebrok M. Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature* 2003; 425: 851-856.
134. Berman DM, Karhadkar SS, Maitra A, Montes De Oca R, Gerstenblith MR, Briggs K, Parker AR, Shimada Y, Eshleman JR, Watkins DN, Beachy PA. Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. *Nature* 2003; 425: 846-851.
135. Barnes EA, Heidtman KJ, Donoghue DJ. Constitutive activation of the shh-ptc1 pathway by a patched1 mutation identified in BCC. *Oncogene* 2005; 24: 902-915.
136. Johnson RL, Rothman AL, Xie J, Goodrich LV, Bare JW, Bonifas JM, Quinn AG, Myers RM, Cox DR, Epstein EH, Jr., Scott MP. Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. *Science* 1996; 272: 1668-1671.
137. Yang Y, Tian X, Xie X, Zhuang Y, Wu W, Wang W. Expression and regulation of hedgehog signaling pathway in pancreatic cancer. *Langenbecks Arch Surg* 2009.
138. Reifenberger J, Wolter M, Weber RG, Megahed M, Ruzicka T, Lichter P, Reifenberger G. Missense mutations in SMOH in sporadic basal cell carcinomas of the skin and primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. *Cancer Res* 1998; 58: 1798-1803.

139. Sheng T, Li C, Zhang X, Chi S, He N, Chen K, McCormick F, Gatalica Z, Xie J. Activation of the hedgehog pathway in advanced prostate cancer. *Mol Cancer* 2004; 3: 29.
140. Chi S, Huang S, Li C, Zhang X, He N, Bhutani MS, Jones D, Castro CY, Logrono R, Haque A, Zwischenberger J, Tying SK, Zhang H, Xie J. Activation of the hedgehog pathway in a subset of lung cancers. *Cancer Lett* 2006; 244: 53-60.
141. Long F, Zhang XM, Karp S, Yang Y, McMahon AP. Genetic manipulation of hedgehog signaling in the endochondral skeleton reveals a direct role in the regulation of chondrocyte proliferation. *Development* 2001; 128: 5099-5108.
142. Adolphe C, Narang M, Ellis T, Wicking C, Kaur P, Wainwright B. An in vivo comparative study of sonic, desert and Indian hedgehog reveals that hedgehog pathway activity regulates epidermal stem cell homeostasis. *Development* 2004; 131: 5009-5019.
143. Kenney AM, Rowitch DH. Sonic hedgehog promotes G(1) cyclin expression and sustained cell cycle progression in mammalian neuronal precursors. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 9055-9067.
144. Kenney AM, Cole MD, Rowitch DH. Nmyc upregulation by sonic hedgehog signaling promotes proliferation in developing cerebellar granule neuron precursors. *Development* 2003; 130: 15-28.
145. Henriksson M, Luscher B. Proteins of the Myc network: essential regulators of cell growth and differentiation. *Adv Cancer Res* 1996; 68: 109-182.
146. Bigelow RL, Chari NS, Uden AB, Spurgers KB, Lee S, Roop DR, Toftgard R, McDonnell TJ. Transcriptional regulation of bcl-2 mediated by the sonic hedgehog signaling pathway through gli-1. *J Biol Chem* 2004; 279: 1197-1205.
147. Regl G, Kasper M, Schnidar H, Eichberger T, Neill GW, Philpott MP, Esterbauer H, Hauser-Kronberger C, Frischauf AM, Aberger F. Activation of the BCL2 promoter in response to Hedgehog/GLI signal transduction is predominantly mediated by GLI2. *Cancer Res* 2004; 64: 7724-7731.
148. Pierucci-Alves F, Clark AM, Russell LD. A developmental study of the Desert hedgehog-null mouse testis. *Biol Reprod* 2001; 65: 1392-1402.

149. Yao HH, Capel B. Disruption of testis cords by cyclopamine or forskolin reveals independent cellular pathways in testis organogenesis. *Dev Biol* 2002; 246: 356-365.
150. Canto P, Soderlund D, Reyes E, Mendez JP. Mutations in the desert hedgehog (DHH) gene in patients with 46,XY complete pure gonadal dysgenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 4480-4483.
151. Persengiev SP, Kondova, II, Millette CF, Kilpatrick DL. Gli family members are differentially expressed during the mitotic phase of spermatogenesis. *Oncogene* 1997; 14: 2259-2264.
152. Kangasniemi M, Dodge K, Pemberton AE, Huhtaniemi I, Meistrich ML. Suppression of mouse spermatogenesis by a gonadotropin-releasing hormone antagonist and antiandrogen: failure to protect against radiation-induced gonadal damage. *Endocrinology* 1996; 137: 949-955.
153. Shuttlesworth GA, de Rooij DG, Huhtaniemi I, Reissmann T, Russell LD, Shetty G, Wilson G, Meistrich ML. Enhancement of A spermatogonial proliferation and differentiation in irradiated rats by gonadotropin-releasing hormone antagonist administration. *Endocrinology* 2000; 141: 37-49.
154. Barakat B, O'Connor AE, Gold E, de Kretser DM, Loveland KL. Inhibin, activin, follistatin and FSH serum levels and testicular production are highly modulated during the first spermatogenic wave in mice. *Reproduction* 2008; 136: 345-359.
155. Mithraprabhu S, Mendis S, Meachem SJ, Tubino L, Matzuk MM, Brown CW, Loveland KL. Activin bioactivity affects germ cell differentiation in the postnatal mouse testis in vivo. *Biol Reprod*; 82: 980-990.
156. Brown CW, Houston-Hawkins DE, Woodruff TK, Matzuk MM. Insertion of *Inhbb* into the *Inhba* locus rescues the *Inhba*-null phenotype and reveals new activin functions. *Nat Genet* 2000; 25: 453-457.
157. Matzuk MM, Kumar TR, Vassalli A, Bickenbach JR, Roop DR, Jaenisch R, Bradley A. Functional analysis of activins during mammalian development. *Nature* 1995; 374: 354-356.

158. Dias V, Meachem S, Rajpert-De Meyts E, McLachlan R, Manuelpillai U, Loveland KL. Activin receptor subunits in normal and dysfunctional adult human testis. *Hum Reprod* 2008; 23: 412-420.
159. Loveland KL, Herszfeld D, Chu B, Rames E, Christy E, Briggs LJ, Shakri R, de Kretser DM, Jans DA. Novel low molecular weight microtubule-associated protein-2 isoforms contain a functional nuclear localization sequence. *J Biol Chem* 1999; 274: 19261-19268.
160. Small CL, Shima JE, Uzumcu M, Skinner MK, Griswold MD. Profiling gene expression during the differentiation and development of the murine embryonic gonad. *Biol Reprod* 2005; 72: 492-501.
161. Szczepny A, Hime GR, Loveland KL. Expression of hedgehog signalling components in adult mouse testis. *Dev Dyn* 2006; 235: 3063-3070.
162. Ferrara D, Hallmark N, Scott H, Brown R, McKinnell C, Mahood IK, Sharpe RM. Acute and long-term effects of in utero exposure of rats to di(n-butyl) phthalate on testicular germ cell development and proliferation. *Endocrinology* 2006; 147: 5352-5362.
163. Mahood IK, Scott HM, Brown R, Hallmark N, Walker M, Sharpe RM. In utero exposure to di(n-butyl) phthalate and testicular dysgenesis: comparison of fetal and adult end points and their dose sensitivity. *Environ Health Perspect* 2007; 115 Suppl 1: 55-61.
164. Chen X, Horiuchi A, Kikuchi N, Osada R, Yoshida J, Shiozawa T, Konishi I. Hedgehog signal pathway is activated in ovarian carcinomas, correlating with cell proliferation: its inhibition leads to growth suppression and apoptosis. *Cancer Sci* 2007; 98: 68-76.
165. Zhao C, Chen A, Jamieson CH, Fereshteh M, Abrahamsson A, Blum J, Kwon HY, Kim J, Chute JP, Rizzieri D, Munchhof M, VanArsdale T, Beachy PA, Reya T. Hedgehog signalling is essential for maintenance of cancer stem cells in myeloid leukaemia. *Nature* 2009; 458: 776-779.
166. Liao X, Siu MK, Au CW, Chan QK, Chan HY, Wong ES, Ip PP, Ngan HY, Cheung AN. Aberrant activation of hedgehog signaling pathway contributes to endometrial carcinogenesis through beta-catenin. *Mod Pathol* 2009; 22: 839-847.

167. Fiaschi M, Rozell B, Bergstrom A, Toftgard R. Development of mammary tumors by conditional expression of GLI1. *Cancer Res* 2009; 69: 4810-4817.
168. Kinzler KW, Bigner SH, Bigner DD, Trent JM, Law ML, O'Brien SJ, Wong AJ, Vogelstein B. Identification of an amplified, highly expressed gene in a human glioma. *Science* 1987; 236: 70-73.
169. Tostar U, Malm CJ, Meis-Kindblom JM, Kindblom LG, Toftgard R, Unden AB. Deregulation of the hedgehog signalling pathway: a possible role for the PTCH and SUFU genes in human rhabdomyoma and rhabdomyosarcoma development. *J Pathol* 2006; 208: 17-25.
170. Taylor MD, Liu L, Raffel C, Hui CC, Mainprize TG, Zhang X, Agatep R, Chiappa S, Gao L, Lowrance A, Hao A, Goldstein AM, Stavrou T, Scherer SW, Dura WT, Wainwright B, Squire JA, Rutka JT, Hogg D. Mutations in SUFU predispose to medulloblastoma. *Nat Genet* 2002; 31: 306-310.
171. Bergstrom R, Adami HO, Mohner M, Zatonski W, Storm H, Ekblom A, Tretli S, Teppo L, Akre O, Hakulinen T. Increase in testicular cancer incidence in six European countries: a birth cohort phenomenon. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 727-733.
172. Skakkebaek NE. Abnormal morphology of germ cells in two infertile men. *Acta Pathol Microbiol Scand A* 1972; 80: 374-378.
173. Almstrup K, Hoei-Hansen CE, Wirkner U, Blake J, Schwager C, Ansorge W, Nielsen JE, Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Leffers H. Embryonic stem cell-like features of testicular carcinoma in situ revealed by genome-wide gene expression profiling. *Cancer Res* 2004; 64: 4736-4743.
174. Jorgensen N, Rajpert-De Meyts E, Graem N, Muller J, Giwercman A, Skakkebaek NE. Expression of immunohistochemical markers for testicular carcinoma in situ by normal human fetal germ cells. *Lab Invest* 1995; 72: 223-231.
175. Rajpert-De Meyts E. Developmental model for the pathogenesis of testicular carcinoma in situ: genetic and environmental aspects. *Hum Reprod Update* 2006; 12: 303-323.
176. Ulbright TM. Germ cell neoplasms of the testis. *Am J Surg Pathol* 1993; 17: 1075-1091.

177. Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Main KM. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum Reprod* 2001; 16: 972-978.
178. de Kretser DM, Buzzard JJ, Okuma Y, O'Connor AE, Hayashi T, Lin SY, Morrison JR, Loveland KL, Hedger MP. The role of activin, follistatin and inhibin in testicular physiology. *Mol Cell Endocrinol* 2004; 225: 57-64.
179. Harradine KA, Akhurst RJ. Mutations of TGFbeta signaling molecules in human disease. *Ann Med* 2006; 38: 403-414.
180. Massague J. TGFbeta in Cancer. *Cell* 2008; 134: 215-230.
181. Meinhardt A, O'Bryan MK, McFarlane JR, Loveland KL, Mallidis C, Foulds LM, Phillips DJ, de Kretser DM. Localization of follistatin in the rat testis. *J Reprod Fertil* 1998; 112: 233-241.
182. Meehan T, Schlatt S, O'Bryan MK, de Kretser DM, Loveland KL. Regulation of germ cell and Sertoli cell development by activin, follistatin, and FSH. *Dev Biol* 2000; 220: 225-237.
183. Loveland KL, Bakker M, Meehan T, Christy E, von Schonfeldt V, Drummond A, de Kretser D. Expression of Bambi is widespread in juvenile and adult rat tissues and is regulated in male germ cells. *Endocrinology* 2003; 144: 4180-4186.
184. Buzzard JJ, Loveland KL, O'Bryan MK, O'Connor AE, Bakker M, Hayashi T, Wreford NG, Morrison JR, de Kretser DM. Changes in circulating and testicular levels of inhibin A and B and activin A during postnatal development in the rat. *Endocrinology* 2004; 145: 3532-3541.
185. de Kretser DM, Loveland KL, Meehan T, O'Bryan MK, Phillips DJ, Wreford NG. Inhibins, activins and follistatin: actions on the testis. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 180: 87-92.
186. Matzuk MM, Finegold MJ, Su JG, Hsueh AJ, Bradley A. Alpha-inhibin is a tumour-suppressor gene with gonadal specificity in mice. *Nature* 1992; 360: 313-319.
187. Cipriano SC, Chen L, Kumar TR, Matzuk MM. Follistatin is a modulator of gonadal tumor progression and the activin-induced wasting syndrome in inhibin-deficient mice. *Endocrinology* 2000; 141: 2319-2327.



- 188.** Cipriano SC, Chen L, Burns KH, Koff A, Matzuk MM. Inhibin and p27 interact to regulate gonadal tumorigenesis. *Mol Endocrinol* 2001; 15: 985-996.

## ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Belçika’da doğdu. İlköğrenimini 1989.yılında Faik Erbağı İlkokulunda, Ortaöğrenimini 1993 yılında Yükseliş Kolejinde, Lise öğrenimini 1996 yılında Büyük Kolej’de, Ankara’da tamamladı. Lisans eğitimini 1996-2000 yılları arasında Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde bitirdi. 2004 yılında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Üreme Biyolojisi Yüksek Lisansından mezun oldu. Sonrasında, Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Doktora programına başladı ve bu program içerisinde doktora tezini Monash Üniversitesi Tıbbi Araştırma Enstitüsü Testis Gelişimi ve Farklılaşması laboratuvarında Dr. Kate LOVELAND’ın ikinci danışmanlığında tamamladı. Science Citation Index’e kayıtlı 13 makale, ulusal ve uluslararası kongreler olmak üzere 37 kongre bildirisi bulunmaktadır. Çeşitli kongrelerde en iyi bilimsel çalışma ödülü almıştır. 2001 yılından beri Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır. Zeliha ŞAHİN 25 Haziran 2010 tarihinde, Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında Doktora Tez Savunmasını yapacaktır.

# **EKLER**

# Regulated Production of SnoN2 is a Feature of Testicular Differentiation

CATHERINE ITMAN,<sup>1,2</sup> PENNY A.F. WHILEY,<sup>1,2</sup> WEI ZHOU,<sup>3</sup> MARVIN MEISTRICH,<sup>3</sup> ZELIHA SAHIN,<sup>1,4</sup> AND KATE LAKOSKI LOVELAND<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Monash Institute of Medical Research, Monash University, Melbourne, Victoria 3168, Australia

<sup>2</sup>The Australian Research Council Centre of Excellence in Biotechnology and Development, Callaghan, NSW, Australia

<sup>3</sup>Experimental Radiation Oncology Unit, M.D. Anderson Cancer Center, University of Texas, Houston, Texas

<sup>4</sup>Department of Histology and Embryology, Medicine Faculty, Akdeniz University, 07070 Antalya, Turkey

**KEY WORDS** testis; spermatogenesis; development; SMAD; activin; TGF $\beta$ ; Skil

**ABSTRACT** Transforming growth factor betas (TGF $\beta$ s) and activins are key regulators of male fertility, affecting somatic and germ cell proliferation and differentiation in the developing and adult testis. Several studies have shown that these ligands influence discrete developmental stages, suggesting that temporal expression of modifying factors may determine their specific signaling outcomes. Upon binding to cell surface receptors, TGF $\beta$  and activin signals are transduced intracellularly by the phosphorylation and nuclear accumulation of SMAD2 and SMAD3 transcription factors. The objective of this study was to determine the cellular localization of phosphorylated SMAD2/3 and the transcriptional repressor SnoN (Ski-like), a modifier of SMAD2/3 transcriptional activity, in mouse testes. Western blot established that only the smaller SnoN isoform, SnoN2, is produced in the testis. By immunohistochemistry, widespread phospho-SMAD2/3 distribution was observed in somatic and germ cells at all ages. In contrast, SnoN2 production was highly regulated, being detected only in gonocytes and interstitial cells at birth and in pachytene spermatocytes at puberty. In the adult, SnoN2 expression differed to that during the first wave, being ubiquitously expressed but exhibiting regulated nuclear localization. In another model of spermatogenic differentiation, the irradiated rat testis, widespread phospho-SMAD2/3 contrasted with restricted SnoN2 expression. SnoN2 was limited to interstitial cells, with reduced staining intensity observed associated with the timing of spermatogenesis resumption. We conclude that somatic and germ cells at all differentiation stages are actively transducing TGF $\beta$  superfamily signals but that responses to these ligands may be selectively modulated by controlled production and nuclear localization of SnoN2. *Microsc. Res. Tech.* 72:833–844, 2009. © 2009 Wiley-Liss, Inc.

## INTRODUCTION

The proliferation and differentiation of testicular cell populations during fetal and postnatal life, regulated by intrinsic factors as well as circulating hormones, are required for adult fertility. Many of these events, occurring in both somatic and germ cell populations, are governed by ligands of the transforming growth factor-beta (TGF $\beta$ ) superfamily, including the prototypical TGF $\beta$ s, activins, bone morphogenetic proteins (BMPs), and glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) (reviewed in Itman et al., 2006; Jorgez et al., 2005; Loveland and Hime, 2005). In some of these events, developmentally regulated cellular responses have been observed. For example, activin A and TGF $\beta$ s negatively regulate the *in vitro* survival and proliferation of fetal rat gonocytes (Olaso et al., 1998; Richards et al., 1999), whereas the proliferation of immature spermatogonia, when cocultured with Sertoli cells, is enhanced by activin (Mather et al., 1990). Activin responsiveness of germ cells at the time the spermatogonial stem cell population is being established appears to be highly regulated, with the expression of negative regulators of activin signaling coincident with the transition of gonocytes into spermatogonia (Meehan et al., 2000) and transplantation assays impli-

cating activin A in downregulating spermatogonial stem cell capacity (Nagano et al., 2003). Documented effects on somatic cells *in vitro* include activin A enhancement of immature, but not terminally differentiated, Sertoli cell proliferation (Boitani et al., 1995; Buzzard et al., 2003; Puglisi et al., 2004). TGF $\beta$  inhibits TGF $\alpha$ -induced proliferation of peritubular cells (Mullaney and Skinner, 1993), reduces the proliferation of immature Leydig cells (Kan et al., 1999) and downregulates the expression of genes encoding steroidogenic enzymes (Le Roy et al., 1999 and references therein).

The analysis of genetically modified mice has been particularly valuable in highlighting the consequences

\*Correspondence to: Associate Professor Kate Loveland, Department of Biochemistry and Molecular Biology; Bldg 77, Level 1, Monash University; Wellington Road, Clayton, Victoria 3800, Australia.  
E-mail: kate.loveland@med.monash.edu.au

Received 24 December 2008; accepted in revised form 20 April 2009

Contract grant sponsor: NHMRC of Australia; Contract grant numbers: 384108, 334011; Contract grant sponsor: Australian Research Council; Contract grant number: 348239; Contract grant sponsor: NIH; Contract grant numbers: R01 ES08075, CCSG CA 16672.

DOI 10.1002/jemt.20739

Published online 12 June 2009 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

of altered activin synthesis on testis development in vivo. Reduced activin bioactivity results in smaller testes and delays the onset of fertility (*Inhba*<sup>BK/BK</sup>, Brown et al., 2000), as does the impaired ability to respond to activin due to absence of receptors (*ActRII*<sup>-/-</sup>, Matzuk et al., 1995). Overexpression of the activin inhibitors, *follistatin* and *follistatin-like 3*, causes Leydig cell hyperplasia and germ cell degeneration, resulting in infertility (Guo et al., 1988; Xia et al., 2004). Excessive activin signaling, due to the absence of the inhibitory molecule inhibin (in *Inha*<sup>-/-</sup> mice, Matzuk et al., 1992), leads to the development of tumors of Sertoli cell origin, the number and size of which are reduced in *Inha*<sup>-/-</sup> mice treated with an activin antagonist (Li et al., 2007b) or mice lacking the downstream signaling molecule SMAD3 (Li et al., 2007a). Thus, TGF $\beta$  and activin responsiveness within the developing and adult testis must be precisely regulated to ensure appropriate organ development and optimal fertility in the adult.

TGF $\beta$  superfamily signals are transduced within cells by the SMAD family of transcription factors. Signaling is initiated upon binding of a dimeric TGF $\beta$  superfamily ligand to two type II and two type I receptors and proceeds by the C-terminal phosphorylation (activation) of receptor-activated R-SMAD proteins. These are SMAD2 and SMAD3 in the case of activins, nodal, TGF $\beta$ s and the growth and differentiation factors (GDFs) GDF3 and GDF9 whereas SMAD1, SMAD5 and SMAD8 transduce signals from BMPs, GDF6 and GDF7 (Feng and Derynck, 2005). In association with Co-SMAD4, phosphorylated R-SMAD proteins accumulate in the nucleus and associate with other transcriptional regulators to induce or repress gene transcription (Derynck and Zhang, 2003; Massague et al., 2005; Shi and Massague, 2003; ten Dijke et al., 2002). The Inhibitory (I)-SMADs, SMAD6 and SMAD7, restrict TGF $\beta$  superfamily signaling at several levels, including prevention of R-SMAD phosphorylation (Kavsak et al., 2000), and/or blocking complex formation between R-SMADs and Co-SMAD4 (Hata et al., 1997) or other transcriptional regulators (Bai et al., 2000).

R-SMAD transcriptional activity and DNA-binding specificity is determined by the nature of the other transcriptional regulators present within the DNA-binding complex, a multitude of which have been identified to date (reviewed in Massague and Wotton, 2000; Moustakas et al., 2001). One well characterized SMAD2/3 interactor is the transcriptional repressor, SnoN, which is also referred to as Ski-like (Nomura et al., 1989). A member of the ski (sloan kettering virus) family of proteins (Nomura et al., 1989), the potency of SnoN in the regulation of TGF $\beta$  signaling has been established by measuring myogenic differentiation in quail embryo cells and oncogenic transformation of chicken embryo fibroblasts when overexpressed (Boyer et al., 1993), consistent with the observation that SnoN is highly expressed in a range of human tumors (reviewed in Luo, 2004). The *sno* knockout mouse is embryonic lethal (Shinagawa et al., 2000) with SnoN hypomorphs displaying a phenotype consistent with altered TGF $\beta$  signaling (Pearson-White and McDuffie, 2003). Two alternatively spliced transcripts are produced from murine *sno* gene, a longer

product termed *snon* (U36293, www.ncbi.nlm.nih.gov) and the alternatively spliced *snon2* (U14655, also referred to as *sno-dE3*) which lacks 138 base pairs within exon 3 (Pearson-White and Crittenden, 1997; Pelzer et al., 1996).

SnoN interacts directly with SMAD2, SMAD3, and SMAD4, but not the BMP-responsive R-SMADs, and it represses TGF $\beta$ -induced SMAD2/3 transcriptional activity (He et al., 2003; Stroschein et al., 1999). This repression is context dependent; knockdown of endogenous SnoN results in inhibition, rather than augmentation, of TGF $\beta$  responsiveness in Mv1Lu (mink lung epithelial) cells, an effect not observed in HeLa (cervical cancer) or HaCaT (human keratinocytes) cells (Sarker et al., 2005). Cellular responses to TGF $\beta$  are regulated by the controlled production, subcellular localization and degradation of SnoN. TGF $\beta$  itself can induce SnoN degradation in a SMAD3-dependent manner (Stroschein et al., 1999), permitting the transcription of SMAD/TGF $\beta$  target genes. Interestingly, this same study identified SnoN as an early-response TGF $\beta$  target gene, with SnoN upregulation observed within 2 h of TGF $\beta$  stimulation. This cycle of TGF $\beta$ -induced degradation followed by upregulation is thought to confer tight control over cellular responsiveness to TGF $\beta$ .

We have previously shown that the production of the inhibitory SMAD6 protein is regulated in mouse testicular germ cells at the time when the spermatogonial population is being established and the first spermatogonia enter the differentiation pathway (Itman and Loveland, 2008). As TGF $\beta$ s and activins are key regulators of testicular development, we set out to document SMAD2/3 activation and SnoN production in the rodent testis to assess the potential for regulated SnoN production to drive specific outcomes of TGF $\beta$  superfamily signaling. Using two models of germ cell differentiation in which testicular function changes, we show that phosphorylated SMAD2/3 is widespread, whereas highly regulated production of the smaller SnoN isoform, SnoN2, is a feature of testicular differentiation.

## MATERIALS AND METHODS

### Experimental Animals and Tissues

Mice (CBAx57Bl6 F1) and rats (Sprague Dawley) were obtained from Monash University Central Animal Services and killed by decapitation (immature mice) or cervical dislocation (adult mice and rats) before tissue removal. Sample collection for immunohistochemistry and Western blot analyses conformed to the NHMRC/CSIRO/AAC Code of Practice for the Care and Use of Animals for Experimental Purposes and were approved by the Monash University Standing Committee on Ethics in Animal Experimentation. For studies on irradiated testes, adult LBNF<sub>1</sub> male rats (hybrids between Lewis and Brown-Norway) were purchased from Harlan Sprague-Dawley, Inc. (Indianapolis, IN). Animals were acclimatized for 1 week before initiation of the experiment. All procedures involving irradiation and hormone treatment of rats were approved by the M. D. Anderson Cancer Institutional Animal Care and Use Committee.

Tissue samples for RNA and protein extraction were snap-frozen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use. Intact tissue samples for immunohistochemistry were placed in

Bouin's fixative for 5 h immediately after collection, then dehydrated through a graded ethanol series and embedded in paraffin. Sections of 3–5  $\mu\text{m}$  were placed on Superfrost Plus II slides (Lomb Scientific, Sydney Australia).

### Irradiation and Hormone Treatment

Rats were anesthetized with 0.72 mg ketamine/kg and 0.022 mg acepromazine/kg (i.m.), and then a single 6 Gy dose was delivered to the lower part of the abdomen by a  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ -ray unit (Eldorado 8; Atomic Energy of Canada, Ltd, Ottawa, Canada) as described previously (Shuttlesworth et al., 2000). GnRH antagonist treatment was also performed as previously described (Shuttlesworth et al., 2000). Briefly, 15 weeks after irradiation, animals were given simultaneous injections of 1.5 mg Cetrorelix pamoate and 1.5 mg Cetrorelix acetate (ASTA Medica, AG Frankfurt, Germany), each at a different site in the upper portion of the dorsal region. A second dose of Cetrorelix pamoate injection was given 3.3 weeks after the first to maintain suppression of intratesticular testosterone levels by at least 80% for 5 weeks (Shuttlesworth et al., 2000). Animals were killed and testes collected at 1, 2, and 4 weeks following the start of hormone treatment. Three animals were used for each timepoint.

### Activin Treatment of Immature Testis Cells

Cord fragments consisting predominantly of Sertoli cells and spermatogonia were isolated from two 5 dpp mouse testes by a two-step digestion process as described (Itman and Loveland, 2008). Cord fragments were seeded into 6 well plates (2.5 mL per well) pre-coated with 0.1  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  laminin (Sigma, St. Louis, MO) and incubated at 37° 5%  $\text{CO}_2$  for 24 h, in DMEM supplemented with penicillin/streptomycin (Life Technologies, Inc), nonessential amino acids (Life Technologies, Inc), L-glutamine (Life Technologies, Inc). Medium was changed after 24 h of culture and again 1 h later to remove any factors secreted by the cells themselves. Next the cells were exposed to media or to media supplemented with 5 ng/mL activin A (R&D Systems, Minneapolis, MN) for 30 min. Following activin stimulation, cells were collected by scraping and centrifugation at maximum speed for 1 min then snap frozen on dry ice and stored at  $-80^\circ\text{C}$  until protein isolation. Each culture experiment was performed five times using different mice.

### Culture of HeLa Cells

HeLa cells were maintained in DMEM (Invitrogen, Carlsbad CA) supplemented with penicillin/streptomycin (Life Technologies, Inc.) and 10% fetal calf serum (Invitrogen). Once cells reached 70% confluence, they were collected by scraping and pelleted by centrifugation at 13,000 rpm for 1 min. Medium was removed and cells were snap frozen on dry ice and maintained at  $-80^\circ\text{C}$  until protein isolation.

### Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed on tissue sections as per Meehan et al. (2000) using antiphosphory-

lated-SMAD2 (Cell Signaling, diluted 1:500 in TBS/0.5% BSA) and anti-SnoN (Santa Cruz, Santa Cruz, CA, diluted to 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in TBS/0.5% BSA) antibodies. Manufacturer's specifications indicate that the anti-phosphorylated-SMAD2 antibody will detect both phosphorylated SMAD2 and phosphorylated SMAD3 due to sequence similarity between the two proteins. Endogenous peroxidases were quenched using 3% hydrogen peroxide for 5 min. Antigen retrieval was carried out at  $\sim 90^\circ\text{C}$  maintained for 8 min in 50 mM glycine (pH 3.5) for phosphorylated SMAD2/3 and in T-EG buffer (10 mM Tris-HCl, 0.5 mM EGTA pH 9) for SnoN. Tissue sections were blocked with 0.5% BSA plus 5% normal sheep serum in 1 $\times$  TBS at room temperature for 30 min then incubated with primary antibody diluted in 0.1% bovine serum albumin/TBS (TB). Washes were performed in 1 $\times$  TBS at room temperature. Bound primary antibody was detected using biotinylated anti-rabbit antibody (Chemicon, Temecula, CA, diluted 1:500 in TB, 1 h at room temperature) and the signal amplified using Vectastain Elite ABC kit according to the manufacturer's instructions (Vector Laboratories, Burlingame, CA) followed by detection with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, DAKO Corp.) resulting in a brown precipitate. Sections were counterstained with Harris Hematoxylin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) to enable visualization of nuclei, dehydrated and mounted under glass coverslips in DPX (BDH Laboratories, Poole, UK). Immunohistochemistry was performed on three independent samples with identical results. Control sections for each antibody were incubated without primary antibody for all samples; in all cases no signal was observed. Images were captured on a Leica DMR microscope with a Leica DC200 digital camera. Immunohistochemistry on mouse testis sections was performed from three different animals at each age; immunohistochemistry on normal adult rat testis sections was performed on two different animals.

### Quantitative Real Time PCR

Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Applied Sciences, IN, USA) was used to generate template cDNA from 3  $\mu\text{g}$  total RNA and quantitative real-time PCR was subsequently performed using the Rotor-Gene 3000 thermocycler (Corbett Research, Sydney, Australia). The PCR reaction contained 5  $\mu\text{L}$  SYBR Green JumpStart Taq Mix (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 4.6  $\mu\text{L}$  of 1:100 dilution first strand cDNA product and 0.2  $\mu\text{M}$  each of specific forward and reverse primers (Sigma Genosys, Houston, TX). Cycling conditions consisted of incubation at  $95^\circ\text{C}$  for 2 min followed by 40 cycles of 15 s at  $95^\circ\text{C}$ , 1 min at  $60^\circ\text{C}$ , and 1 min at  $72^\circ\text{C}$ . Fluorescence was measured and acquired at  $72^\circ\text{C}$ . Relative levels of gene expression were calculated using Rotor-Gene 6.0 software. *Skil* (XM\_001058480) was amplified using the forward primer 5'-ATGACAAGGGGAAGATCGTG-3' and the reverse primer 5'-TCCTTCATCGCCTTT-GAACT-3' and expression was normalized to the ribosomal protein S2 housekeeping gene (forward: 5'-TGTTCTCCCTGCCCATTAAG-3', reverse: 5'-CAAGACCAACGTGACCATTG-3'). Three independent animals were used for each treatment with each sample run in triplicate.

### Western Blot

Western blots were performed using lysates from 4 dpp, 15 dpp and adult mouse testes, 12.5 days post coitum whole fetuses without gonad, adult male mouse kidneys, adult rat testes, cultured HeLa cells and cultured 6 dpp mouse testis cells. Samples were homogenized at 4°C in RIPA buffer (1% Nonidet P-40, 0.5% Sodium deoxycholate, 0.1% Sodium dodecyl sulfate in

PBS) in the presence of protease inhibitors (Protease Inhibitor Cocktail Set III, Calbiochem, San Diego CA) incubated at 4°C with gentle rocking for 15 min followed by centrifugation at 13,000 rpm for 10 min after which supernatant was recovered. Protein lysate concentration was determined using the BioRad direct current (DC) protein assay (BioRad, Hercules CA). Protein was diluted 1:1 in SDS reducing buffer (0.17 M Tris HCl pH 6.8, 34% glycerol, 0.1%  $\beta$ -mercaptoethanol, 2% SDS, 0.01% bromophenol blue) and heated at 95°C for 5 min then placed on ice prior to loading onto a 10% SDS-PAGE gel alongside protein size standards (PageRuler Prestained Protein Ladder, Fermentas, Paddington, Australia). The proteins were electrophoresed under 35 mA for 2.5 h in running buffer (20 mM Tris base, 0.2 M glycine, 0.1% SDS, pH 8.3) then transferred to Hybond C nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences, UK) according to the manufacturer's specifications. Transfer was carried out for 2.5 h at 90V in transfer buffer (20 mM Tris base, 0.2 M glycine, 10% methanol). Membranes were air dried then blocked for 1 h with Odyssey buffer:TBS (1:2) (LI-COR Biosciences, NE). Primary antibody incubation was carried out at 4°C in blocking buffer plus 0–0.2% Tween. Anti-SnoN and phospho-SMAD2/3 were used at dilutions of 1:1000 in TBS/0.1% Tween. Washes were performed with four changes of 1× TBS/0.1% Tween for 5 min each. Bound primary antibody was detected using donkey anti-rabbit Alexa Fluor 680 (Invitrogen) at a 1:10,000 dilution in blocking solution with 0.1% Tween and 0.01% SDS, for 1 h at room temperature and visualized with the Li-Cor Odyssey System (Li-Cor). Westerns for total SnoN were performed in duplicate on separate protein preparations from different animals with similar results. Western blots for phosphorylated SMAD2 were performed five times on separate protein preparations from cells isolated from different animals with identical results. Negative control blots were performed for every experiment using identical samples with the anti-rabbit secondary antibody in the absence of primary antibody.

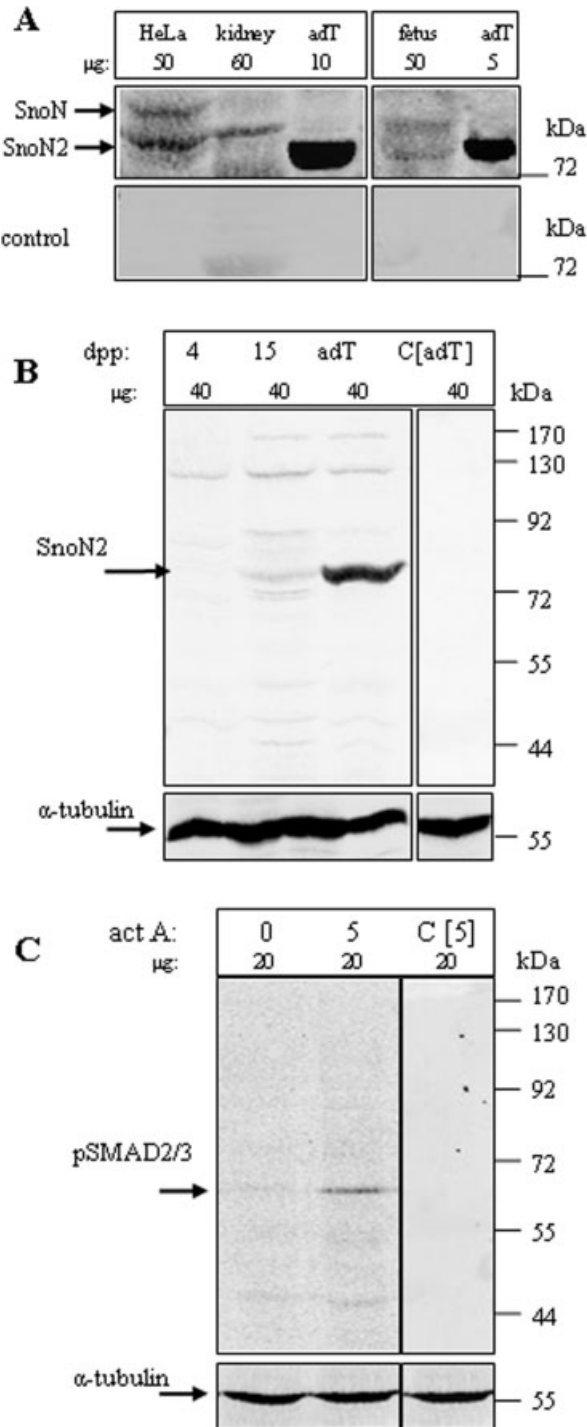


Fig. 1. Western blot analysis of SnoN2 production in immature and adult mouse testes and of phospho-SMAD2/3 in activin treated Sertoli cells. **A:** Anti-SnoN Western blot analysis identified two bands in HeLa cell lysates, consistent with published data that HeLa cells express the full length SnoN protein and the smaller SnoN2 isoform (Zhang et al., 2006). Both proteins were also detected in adult male mouse kidney lysates as previously described (Tan et al., 2006) although detection of SnoN was much fainter than SnoN2 and in fetal lysates (Pelzer et al., 1996). In adult mouse testis lysates (adT), the only isoform detected was the 77 kDa SnoN2. No band was detected in the absence of primary antibody (control). **B:** Western blot analysis identified a faint band of the expected size of 77 kDa for SnoN2 in pubertal (15 dpp) mouse testis lysates, a strong band in adult mouse testis (adT) but no signal in prepubertal (4 dpp) testis lysates. No band was detected in adult testis lysates in the absence of primary antibody (C[adT]). Detection of  $\alpha$ -tubulin confirmed equal loading of protein. **C:** Validation of the antiphosphorylated SMAD2/3 antibody was performed by Western blot analysis using lysates from immature mouse Sertoli cells treated with 0 or 5 ng/mL activin A. A faint signal at the expected size of 58 kDa for phospho-SMAD2 (Zhang et al., 2006) was detected in immature Sertoli cells with increased signal intensity observed following activin treatment. No band was detected in lysates from activin-treated cells in the absence of primary antibody (C[5]). Detection of  $\alpha$ -tubulin confirmed equal loading of protein.

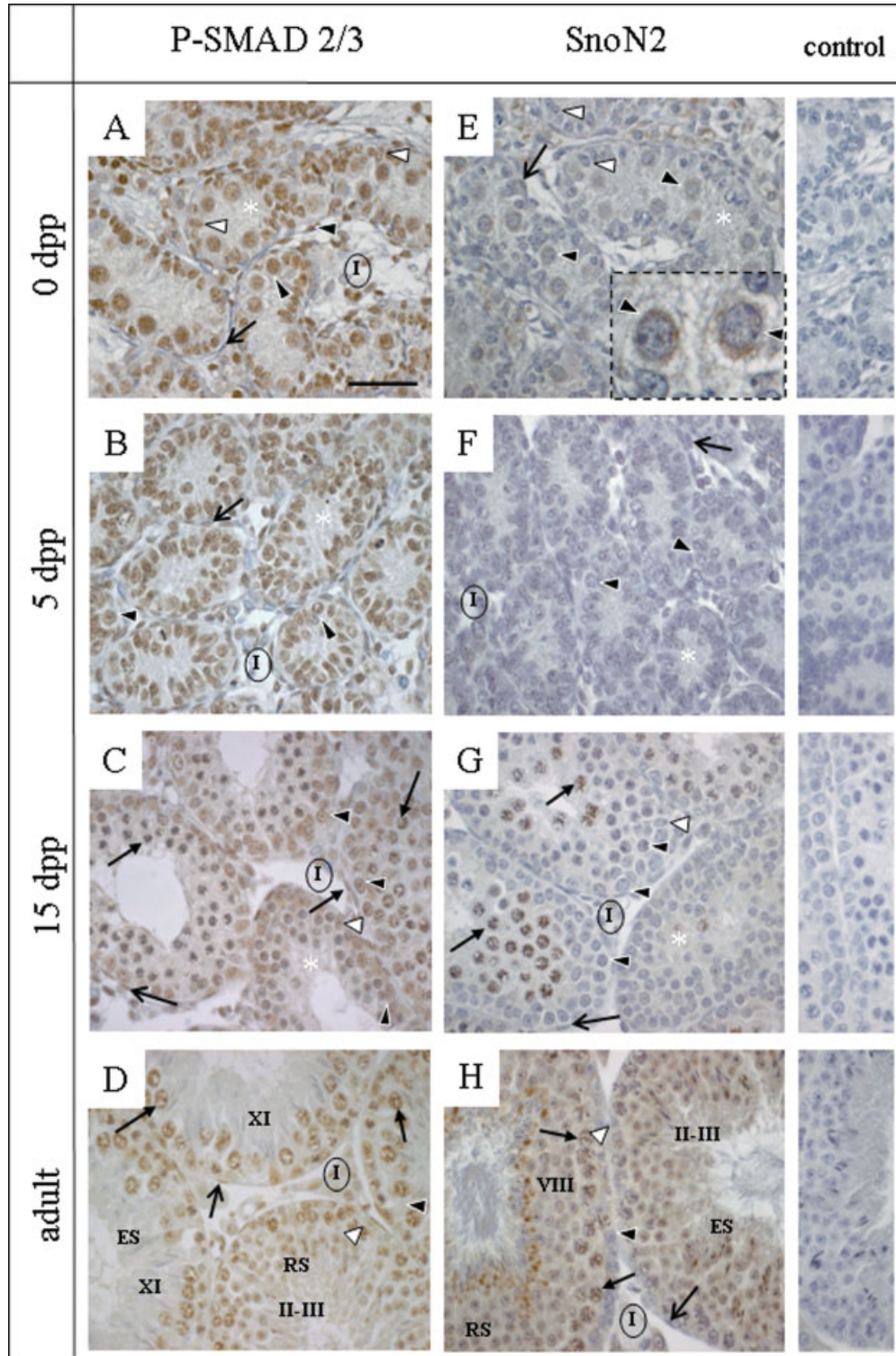


Fig. 2. Phospho-SMAD2/3 is widely detected in the developing and adult mouse testis but the expression of SnoN2 is regulated. Immunohistochemical detection of phosphorylated SMAD2/3 and SnoN2, visualized by brown staining, in newborn (A, E), 5 dpp (B, F), 15 dpp (C, G), and adult mouse testis sections (D, H). Nuclear localization of phospho-SMAD2/3, indicating active transduction of TGF $\beta$  signals, is seen in Sertoli, peritubular and interstitial cells at all ages examined. Phospho-SMAD2/3 is also detected in the nuclei of gonocytes in the newborn testis (A), in spermatogonia at 5 dpp (B), spermatogonia and pachytene spermatocytes in the 15 dpp testis (C) and in spermatogonia, spermatocytes and round spermatids in the adult testis with little to no staining observed in elongating spermatids (D).

SnoN2 protein is present in gonocytes (enlarged in inset) and interstitial cells at birth (E), is undetectable in the 5 dpp testis (F), is restricted to the nuclei of pachytene spermatocytes in the pubertal testis (G) and is expressed in all cells of the adult testis (H). Sections were counterstained with Harris Hematoxylin (blue) to enable visualization of nuclei. Sertoli cell cytoplasm: white asterisk. Sertoli cell nucleus: white arrowhead. Gonocytes and spermatogonia: black arrowheads. Spermatocytes: closed black arrows. Round spermatids, RS; elongating spermatids, ES; interstitial cells, I. Peritubular cells: open black arrow. Stages of the seminiferous epithelium are indicated in Roman numerals. No signal was observed in the absence of primary antibody (control). Scale bar represents 50  $\mu$ m.



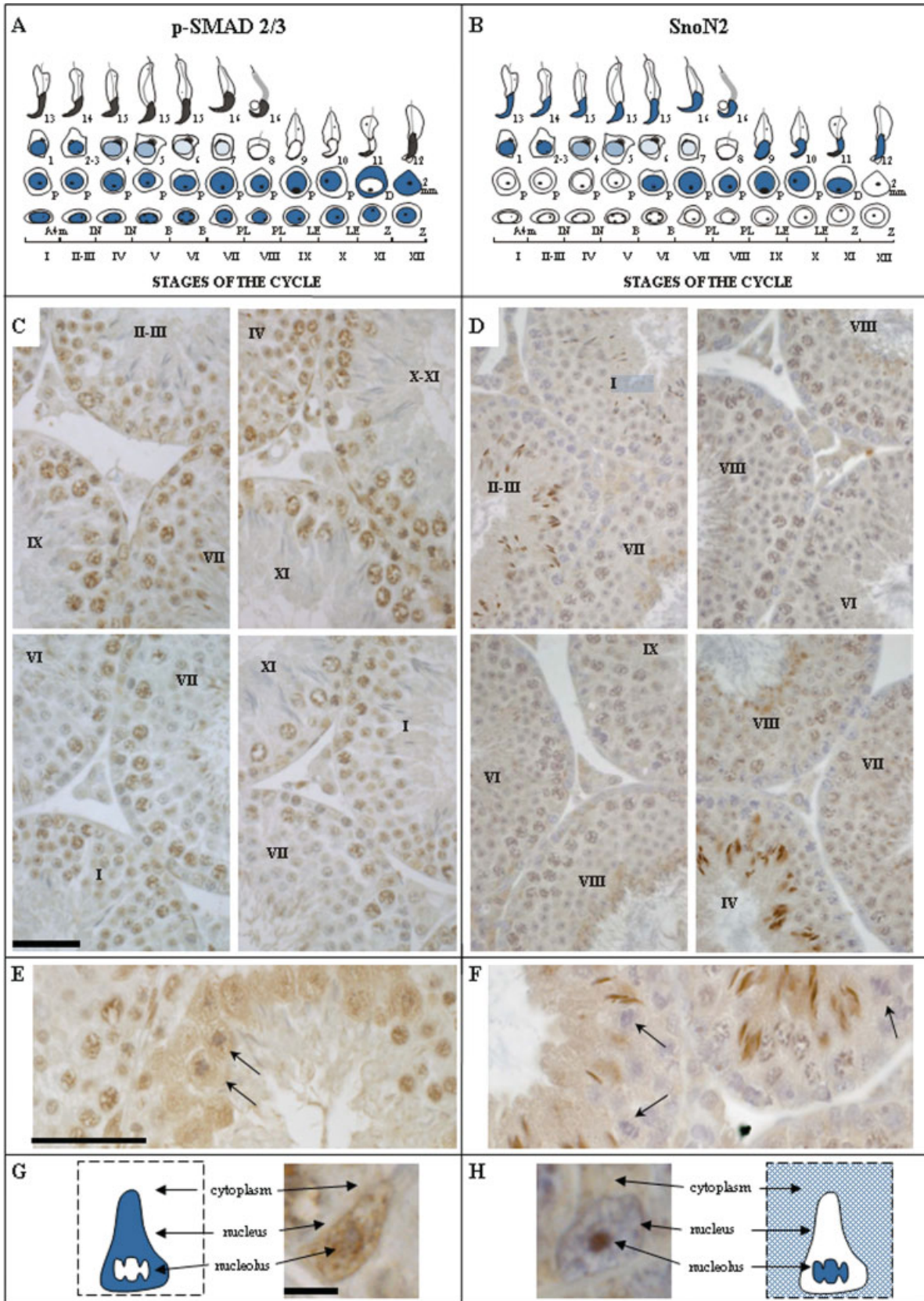


Figure 3

## RESULTS

### Only the Smaller Isoform of SnoN, SnoN2, is Detected in the Mouse Testis

To identify which SnoN isoforms are expressed in the mouse testis, Western blot analysis was performed on protein lysates prepared from adult mouse testes and compared to HeLa cells, adult male mouse kidneys and whole fetus which served as positive controls as each of these are reported to express the both full length SnoN and the smaller SnoN2 (Pelzer et al., 1996; Tan et al., 2006; Zhang et al., 2006). Both SnoN isoforms were detected at the expected size of 77–80 kDa in HeLa cell lysates, whole fetus lysates (without gonad) and kidney lysates (although detection of the larger SnoN was very faint in the kidney) whereas only SnoN2, at ~77 kDa, was detected in the adult mouse testis (Fig. 1A).

The presence of SnoN2 in immature testes was then investigated by Western blot (Fig. 1B). No band was detected in lysates from prepubertal (4 dpp) testes whereas in lysates from 15 dpp testes, a faint band was observed at 77 kDa, corresponding to that observed in adult testis lysates. Detection of  $\alpha$ -tubulin (Fig. 1B), indicates equal loading of samples.

The antiphosphorylated SMAD2/3 antibody was verified using lysates prepared from immature (6 dpp) mouse Sertoli cells which were either treated with activin or left untreated. Western blot detected a single band at the expected size of 58 kDa (Zhang et al., 2006) which was of greater intensity in activin-treated samples, indicating this antibody detects the phosphorylated form of SMAD2 (Fig. 1C). Manufacturer's specifications indicate that this antibody will detect both phosphorylated SMAD2 and phosphorylated SMAD3 in fixed tissues due to sequence similarity between these two proteins. Equal total protein loading is indicated by blotting for  $\alpha$ -tubulin (Fig. 1C).

### Detection of Phosphorylated SMAD2/3 is Widespread in the Immature and Adult Mouse Testis

To identify cells within the developing mouse testis that are responding to TGF $\beta$  superfamily ligands by activation of SMAD2 and SMAD3, we examined phospho-SMAD2/3 expression in mouse testis sections by immunohistochemistry (Fig. 2) at ages corresponding to germ cell population shifts [0 dpp (days post partum; only gonocytes present), 5 dpp (only spermatogonia present), 15 dpp (spermatogonia and spermatocytes present) and 60 dpp (adult; spermatogonia, spermatocytes, spermatids and mature spermatozoa present)]. Somatic cell responsiveness to ligand stimulation was widespread, as demonstrated by brown nuclear stain-

ing in Sertoli cells, peritubular cells and most interstitial cells at each age examined (Figs. 2A–2D). Signal transduction in germ cells was also apparent at each age, with nuclear staining evident in the gonocytes of the newborn testis (Fig. 2A), in spermatogonia at 5 dpp (Fig. 2B), in spermatogonia and pachytene spermatocytes (Fig. 2C) at 15 dpp and in spermatogonia to round spermatids in the adult testis, with signal faint to absent in elongating spermatids (Fig. 2D). These data indicate that SMAD2/SMAD3 are actively transducing TGF $\beta$  superfamily signals in somatic and germ cells at all stages of mouse testis development and in the adult testis. Signals were exclusively nuclear in all cell types.

### Production of SnoN2 is Highly Regulated During Mouse Testis Development

In contrast to the widespread activation of phosphorylated SMAD2/3, production of SnoN2 appears to be highly regulated. In the newborn testis, SnoN protein exhibits a faint but distinct perinuclear localization in gonocytes and cytoplasmic localization in some interstitial cells (Fig. 2E), but is not detectable in Sertoli cells or peritubular cells. Consistent with the Western blot data, SnoN2 is undetectable in the prepubertal testis (Fig. 2F). At 15 dpp, SnoN2 expression is germ cell-specific, restricted to the nuclei of pachytene spermatocytes (Fig. 2G). In the adult testis, faint cytoplasmic staining is evident in most cells within the seminiferous epithelium, with nuclear SnoN2 most apparent in spermatocytes and round spermatids; acrosomal staining is also evident in elongating spermatids (Fig. 2H). Cytoplasmic staining was also observed in interstitial cells (Fig. 2H).

### Phospho-SMAD2/3 and SnoN2 Exhibit Different Patterns of Nuclear Localization in Adult Germ Cells

As phospho-SMAD2/3 and SnoN2 were only colocalized in the nuclei of pachytene spermatocytes during mouse testis development, we carefully examined whether colocalization of these proteins was also regulated during germ cell differentiation throughout the twelve defined stages of the cycling adult seminiferous epithelium (Russell et al., 1990). Similar to observations of the prepubertal and pubertal mouse testis, phospho-SMAD2/3 was detected in the nuclei of germ cells from spermatogonia through to stage 7 round spermatids except for diplotene spermatocytes, which lack a nuclear membrane, where staining was observed throughout the entire cell (Figs. 3A, 3C, and 3E). SnoN2 protein was detected in the cytoplasm of all cell types but exhibited a distinct pattern of nuclear local-

Fig. 3. Phospho-SMAD2/3 and SnoN2 exhibit different patterns of nuclear localization in germ cells during the cycle the adult mouse seminiferous epithelium and within Sertoli cell nuclei. Staging diagrams and representative images specifically illustrating that the nuclear localization of phospho-SMAD2/3 (A) and SnoN2 (B) in germ cells is dynamic during the twelve stages of the seminiferous epithelium in the adult mouse testis (blue shading in diagram represents nuclear signal and relative signal intensity; diagram adapted from Russell et al., 1990). Representative images of immunohistochemical detection of phospho-SMAD2/3 (C, E) and SnoN (D, F) on adult mouse testis sections, visualized by brown staining, are also presented for comparison. Sections were counterstained with Harris

Hematoxylin (blue) to enable visualization of nuclei. Stages of the seminiferous epithelium are indicated with Roman numerals, and arrows in (E) and (F) indicate meiotic cells. Scale bar represent 50  $\mu$ m and is representative for all panels in (C) and (D). Comparison of phospho-SMAD2/3 (G) and SnoN2 (H) localization in Sertoli cell nuclei, visualized by brown staining. Phospho-SMAD2/3 is detected throughout the nucleoplasm with a slightly reduced signal within the nucleolus. SnoN2 exhibits strong immunoreactivity within the nucleolus but little to no signal within the nucleoplasm. Sections were counterstained with Harris Hematoxylin (blue) to enable visualization of nuclei. Scale bar in G represents 10  $\mu$ m for (G) and (H).

ization whereby it was not present in the nuclei of spermatogonia or early spermatocytes but was detected in the nucleus of pachytene spermatocytes (Stage VI) through to stage 7 round spermatids and in the nuclear region of elongating and elongated spermatids (Figs. 3B, 3D, and 3F).

Interestingly, in adult Sertoli cells throughout all stages examined, phospho-SMAD2/3 and SnoN2 exhibited different subnuclear localization patterns. Phospho-SMAD2/3 was detected throughout the nucleoplasm with considerably reduced signal within the nucleolus (Fig. 3G) whereas SnoN2 was restricted to the nucleolus with minimal to no immunoreactivity observed within the nucleoplasm (Fig. 3H).

### Downregulation of *Skil*, the Rat Homologue of SnoN2, Correlates With the Recovery of Spermatogenesis in the Irradiated Rat Testis

The homologue of *sno* in the rat is *skil* (*ski-like*), and similar to the mouse, two alternatively spliced transcripts have been detected, variant 1 (XM\_001058417, www.ncbi.nlm.nih.gov) which corresponds to the murine SnoN, and variant 2 (XM\_001058480) which corresponds to murine SnoN2. As in the mouse testis, only the *Skil* variant 2, the smaller isoform, is detected in the adult rat testis lysates (Fig. 4A). Immunohistochemical examination of phosphorylated SMAD2/3 and *Skil2* in the normal adult rat testis shows a similar localization to that observed in the mouse. Phosphorylated SMAD2/3 was detected within the nuclei of spermatogonia, spermatocytes, and round spermatids as well as in the nuclei of peritubular, Sertoli and Leydig cells (Fig. 4B). *Skil2* was detected in the cytoplasm of Sertoli cells, Leydig cells and spermatogonia, with cytoplasmic and faint nuclear staining evident in pachytene spermatocytes and round spermatids and cytoplasmic and acrosomal staining in elongating spermatids (Fig. 4C).

Regulated SnoN2 production is in distinct contrast to the widespread detection of phosphorylated SMAD2/3 observed during mouse testis development, so we proceeded to examine the expression of these proteins in the irradiated rat testis. In this established model of germ cell differentiation, testicular function changes

from one in which only spermatogonial stem cells are maintained to one where full spermatogenic activity is restored. Irradiation of adult rat testes results in the sustained ablation of spermatogenesis; the subsequent administration of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) antagonist, Centrorelax, enhances germ cell survival and stimulates the resumption of spermatogenesis. Increased germ cell survival and proliferation are observed by 3 weeks post treatment, whereas following 4 weeks of treatment, differentiating spermatogonia are detected (Prabhu et al., 2006; Shuttlesworth et al., 2000).

We first measured whether *Skil* mRNA levels were altered following irradiation. Quantitative real time PCR measurements of *Skil* expression in total RNA revealed that this mRNA in irradiated samples was downregulated to approximately one fifth of the level present in normal rat testes (Fig. 4D). Phosphorylated SMAD2/3 and *Skil2* were then localized in irradiated rat testis sections by immunohistochemistry. Phosphorylated SMAD2/3 was detected within the nuclei of all cells within the seminiferous epithelium in untreated irradiated (Fig. 4E) as well as GnRH repressed irradiated rats (Figs. 4F–4H). Nuclear staining was also observed in most cells of the interstitial compartment, with no qualitative difference observed between samples. *Skil2* protein exhibited a restricted expression profile, being detected only in the interstitial compartment in these samples. This restriction of *Skil2* protein expression relative to that observed in normal adult rat testes (Fig. 4I) was consistent with the reduction in mRNA measured by quantitative PCR (Fig. 4D). Furthermore, in contrast to phosphorylated SMAD2/3, there appeared to be downregulation of *Skil2* production as spermatogenesis recovered. In the arrested testis, strong cytoplasmic staining in interstitial cells (Fig. 4I) decreased in intensity concordant with the resumption of spermatogenesis (Figs. 4J–4L).

## DISCUSSION

By examining the cellular distribution of phospho-SMAD2/3 and SnoN, a SMAD2/3 cofactor and potent transcriptional repressor, in models of testicular differ-

Fig. 4. Phospho-SMAD2/3 is widely detected in the irradiated rat testis whereas *Skil2* (SnoN2) production is regulated. **A:** Western blot comparison of adult mouse (M) and rat (T) testis lysates confirmed the presence of the 77 kDa rat homologue of SnoN2, *Skil2*, in rat testis lysates (left panel). No band was detected in the absence of primary antibody (right panel). Alpha-tubulin detection (lower panel) confirmed equal protein loading. **B, C:** Immunohistochemical detection of phosphorylated SMAD2/3 (B) and *Skil2* (C) (brown staining) in adult rat testis. Nuclear localization of phospho-SMAD2/3, indicating active transduction of TGF $\beta$  signals, is seen in Sertoli, peritubular and interstitial cells, spermatogonia, spermatocytes and round spermatids. No staining was observed in elongated spermatid nuclei. *Skil2* protein was detected in the cytoplasm of Sertoli, Leydig, and germ cells at all differentiation stages, with faint nuclear staining in pachytene spermatocytes and round spermatids and nuclear/acrosomal staining in elongating spermatids. Sections were counterstained with Harris Hematoxylin (blue) for visualization of nuclei. Sertoli cell nucleus: white arrowhead. Spermatogonia: black arrowheads. Spermatocytes: closed black arrows. Round spermatids, RS; Elongating spermatids, ES; Interstitial cells, I; Peritubular cells, open black arrow. Stages of the seminiferous epithelium are indicated in Roman numerals. No signal was observed in the absence of primary antibody (not shown). Scale

bar represents 50  $\mu$ m. **D:** Quantitative real time PCR depicting *Skil2* mRNA levels in normal adult rat testes (black bar) and adult rat testes subjected to irradiation (white bar). Three independent animals were analyzed. Each sample was measured in triplicate with expression normalized to the housekeeping gene *S2*. *Skil2* expression was significantly reduced following irradiation ( $P < 0.01$ , unpaired *t*-test), to 20% of levels in normal adult rat testes. **E–L:** Immunohistochemical detection of phosphorylated SMAD2/3 and *Skil2* (brown staining) in the arrested irradiated rat testis (E, I) and in testes of rats treated with Centrorelax to promote spermatogenic resumption (F, J: 1 week post treatment; G, K: 2 weeks post treatment; H, L: 4 weeks post treatment). Phosphorylated SMAD2/3 was localized to the nucleus of all cells in all treatment groups, with no qualitative difference observed across treatments. In contrast, *Skil2* was absent from the seminiferous epithelium in all samples, but SnoN2 immunoreactivity was most intense in the interstitium of untreated rats. This signal was reduced in GnRH treated rats associated with resumption of spermatogenesis. Sections were counterstained with Harris Hematoxylin. No signal was observed in the absence of primary antibody (not shown). Sertoli cell nucleus: white arrowhead; spermatogonia: black arrowheads; interstitial cells: I; peritubular cells: open black arrow. Scale bar represents 50  $\mu$ m.

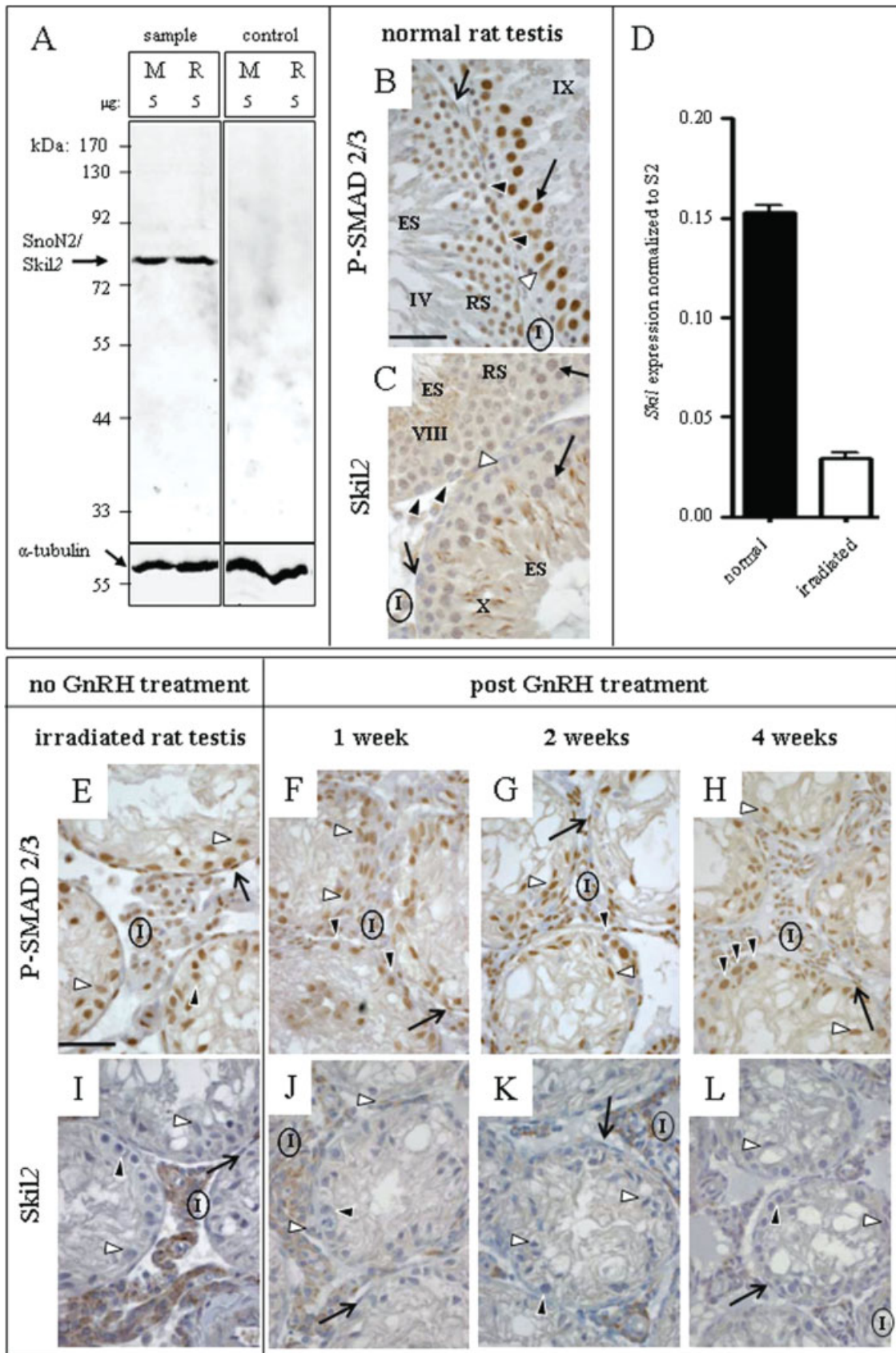


Figure 4

entiation through an immunohistochemical survey, we are led to propose that highly regulated SnoN2/Ski2 protein expression, in contrast to ubiquitous phospho-SMAD2/3, may be one means by which cellular responsiveness to TGF $\beta$  superfamily ligands in the testis may be regulated.

### **Germ Cell Production and Nuclear Localization of SnoN2 is Regulated in the Developing and Adult Mouse Testis**

During postnatal mouse testis development, SnoN2 production is germ cell-specific and highly regulated, contrasting with readily detectable phospho-SMAD2/3 in all neonatal, prepubertal and pubertal germ cells. Such regulated production of SnoN2 suggests that the expression of SMAD2/3 target genes proceeds through progressive repression in gonocytes, activation in spermatogonia and early spermatocytes, followed again by repression again in late pachytene spermatocytes. Importantly, these changes in SnoN2 expression are developmental transitions, occurring when germ cells are known to be sensitive to TGF $\beta$  superfamily signaling inputs. Similar to the regulated production of the inhibitory SMAD6 in neonatal spermatogonia that we have recently reported (Itman and Loveland, 2008), regulated production of SnoN2 may be another mechanism that contributes to directing appropriate responses by germ cells to local signals during the establishment of the spermatogonial stem cell population and the onset of the first wave of spermatogenesis.

In the pubertal testis, SnoN2 expression is detected only in pachytene spermatocytes, identifying it as an ideal maturational marker for pubertal testis development. Interestingly, this expression pattern correlates with high levels of SMAD6 protein expression previously observed in pachytene spermatocytes (Itman and Loveland, 2008), suggesting that rapid inhibition of TGF $\beta$  superfamily signaling may be required for particular stages of meiosis.

Testicular production of SnoN2 is substantially greater in the adult testis compared to other ages examined, appearing to be expressed in all cells. Despite this widespread expression, the pattern of SnoN2 nuclear localization of SnoN2 in germ cells is conserved between the first wave and the cycling of the adult seminiferous epithelium, suggesting a requirement for the repression of SMAD2/3 target genes in the later stages of meiosis in both the first wave and adult spermatogenesis.

### **SnoN2 is Selectively Expressed in Testicular Somatic Cells**

SnoN2 production within the somatic cells of the mouse testis is also regulated. Sertoli cell production of SnoN2 expression is observed only in the adult, exhibiting a striking nucleolar localization, the significance of which has not yet been described. This nucleolar localization SnoN2 suggests that the primary function of SnoN2 in these cells may not be the repression of SMAD2/3 transcriptional activity.

Within the interstitium, SnoN2 protein is detected in the newborn and adult mouse testis, but not the prepubertal or pubertal testis, indicating the potential for

these cells to exhibit different responses to ligand stimulation at successive developmental stages. Particularly interesting is the changing intensity of interstitial SnoN2 staining in the irradiated rat testis. This model utilizes the GnRH antagonist Cetrorelix to stimulate spermatogenesis and is associated with a substantial reduction in intratesticular testosterone. Concomitant with the onset of spermatogenesis and the reduction in intratesticular testosterone is the considerably reduced SnoN2 immunoreactivity in the interstitium. Given that TGF $\beta$  has previously been shown to downregulate the expression of genes encoding steroidogenic enzymes in Leydig cells (Le Roy et al., 1999), it is conceivable that the steroidogenic capacity of Leydig cells is influenced by the regulated production of SnoN2. It is also important to note that the block in differentiation in this model has been identified as a failure of the somatic compartment to support spermatogenesis following irradiation (Zhang et al., 2007), suggesting that the high levels of SnoN2 expression in the interstitium may be one factor inhibiting spermatogonial differentiation following irradiation.

### **The Complexities of Regulating Cellular Responses to TGF $\beta$ Superfamily Signals**

It is well established that activin A production during testis development is highly regulated (Barakat et al., 2008; Buzzard et al., 2004), a trend that is also observed for *Tgfb1*, *Tgfb2*, and *Tgfb3* mRNAs (Affymetrix microarray data publicly available via the gene expression omnibus (GEO) data repository, NCBI, available at [www.ncbi.gov/geo/](http://www.ncbi.gov/geo/) and Small et al., 2005). In addition, cellular responses to these ligands during testis development are influenced by differential production of the inhibitory molecules inhibin and follistatin (Barakat et al., 2008), follistatin-like 3 (Xia et al., 2004) and BAMBI (Loveland et al., 2003). However, an area that has received surprisingly little attention is how responses to TGF $\beta$  superfamily signals might be regulated intracellularly. Our previous findings of regulated production of the inhibitory SMAD6 in prepubertal and pubertal germ cells (Itman and Loveland, 2008) and the SnoN2 data presented here suggest that selectivity in cellular responses to activins and TGF $\beta$ s may also be achieved by the controlled production and nuclear localization of regulators of TGF $\beta$  superfamily signaling. A number of mechanisms have been characterized that enhance or downregulate SMAD2/3 signal transduction, each acting at distinct steps within the signal transduction pathway. These include facilitators of SMAD-receptor interactions that increase phospho-SMAD levels, such as SARA (the SMAD anchor for receptor activation) (Itoh et al., 2002) and HGS (hepatic growth factor-regulated tyrosine kinase substrate) (Miura et al., 2000) as well as factors which influence SMAD transcriptional activity within the nucleus, for example the inner nuclear protein MAN1, which sequesters SMAD3 away from DNA thus preventing transcriptional activity (Lin et al., 2005). Cellular responses may also be downregulated by the ubiquitination and subsequent degradation of phospho-SMAD2/3, by the E3 ubiquitin ligases SMURF1 and SMURF2 (Lin et al., 2000; Lo and Massague, 1999). The E3 ubiquitin ligase, Arkadia, targets SnoN for

degradation in response to TGF $\beta$  stimulation, thus enabling an enhanced transcriptional response to Smad3 activation (Levy et al., 2007). Thus, regulated synthesis of Arkadia would have a profound impact on the cell types identified in this study to contain SnoN protein. Our own preliminary and ongoing investigations have identified dynamic changes in the testicular expression of several of these signaling regulators that, in addition to our current and previous published data, signify that enabling or influencing the responsiveness of testicular cells to TGF $\beta$  superfamily ligands is fundamental for testis development and spermatogenesis.

## REFERENCES

- Bai S, Shi X, Yang X, Cao X. 2000. Smad6 as a transcriptional corepressor. *J Biol Chem* 275:8267–8270.
- Barakat B, O'Connor AE, Gold E, de Kretser DM, Loveland KL. 2008. Inhibin, activin, follistatin and follicle stimulating hormone serum levels and testicular production are highly modulated during the first spermatogenic wave in mice. *Reproduction* 136:345–359.
- Boitani C, Stefanini M, Fragale A, Morena AR. 1995. Activin stimulates Sertoli cell proliferation in a defined period of rat testis development. *Endocrinology* 136:4538–4544.
- Boyer PL, Colmenares C, Stavnezer E, Hughes SH. 1993. Sequence and biological activity of chicken snoN cDNA clones. *Oncogene* 8:457–466.
- Brown CW, Houston-Hawkins DE, Woodruff TK, Matzuk MM. 2000. Insertion of Inhbb into the Inhba locus rescues the Inhbanull phenotype and reveals new activin functions. *Nat Genet* 25:453–457.
- Buzzard JJ, Farnworth PG, de Kretser DM, E OCA, Wreford NG, Morrison JR. 2003. Proliferative phase Sertoli cells display a developmentally regulated response to activin *in vitro*. *Endocrinology* 144:474–483.
- Buzzard JJ, Loveland KL, O'Bryan MK, O'Connor AE, Bakker M, Hayashi T, Wreford NG, Morrison JR, de Kretser DM. 2004. Changes in circulating and testicular levels of inhibin A and B and activin A during postnatal development in the rat. *Endocrinology* 145:3532–3541.
- Derynck R, Zhang YE. 2003. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 425:577–584.
- Feng XH, Derynck R. 2005. Specificity and versatility in TGFbeta signaling through Smads. *Ann Rev Cell Dev Biol* 21:659–693.
- Guo Q, R K, Woodruff TK, Hadsell LA, DeMayo FJ, Matzuk MM. 1988. Overexpression of mouse follistatin causes reproductive defects in transgenic mice. *Mol Endocrinol* 12:96–106.
- Hata A, Lagna G, Massague J, Hemmati-Brivanlou A. 1997. Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumour suppressor. *Genes Dev* 12:186–197.
- He J, Tegen SB, Krawitz AR, Martin GS, Luo K. 2003. The transforming activity of Ski and SnoN is dependent upon their ability to repress the activity of Smad proteins. *J Biol Chem* 278:30540–30547.
- Itman C, Loveland KL. 2008. SMAD expression in the testis: An insight into BMP regulation of spermatogenesis. *Dev Dyn* 237:97–111.
- Itman C, Mendis S, Barakat B, Loveland KL. 2006. All in the family: Transforming growth factor beta family action in testis development. *Reproduction* 132:233–246.
- Itoh F, Divecha N, Brocks L, Oomen L, Janssen H, J C, Itoh S, ten Dijke P. 2002. The FYVE domain in Smad anchor for receptor activation (SARA) is sufficient for localization of SARA in early endosomes and regulates TGFbeta/Smad signalling. *Genes Cells* 7:321–331.
- Jorgez CJ, Lin YN, Matzuk MM. 2005. Genetic manipulations to study reproduction. *Mol Cell Endocrinol* 234:127–135.
- Kan SA, Mirsafian M, Howdeshell K, H DJ. 1999. Transforming growth factor-beta inhibits DNA synthesis in immature rat Leydig cells *in vitro*. *Mol Cell Biol* 148:21–28.
- Kavsak P, Rasmussen RK, Causng CG, Bonni S, Zhu H, Thomsen GH, Wrana JL. 2000. Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF-beta receptor for degradation. *Mol Cell* 6:1365–1375.
- Le Roy C, Lejeune H, Chuzel F, Saez JM, Langlois D. 1999. Autocrine regulation of Leydig cell differentiated function by insulin-like growth factor I and transforming growth factor beta. *J Steroid Biochem Mol Biol* 69:379–384.
- Levy L, Howell M, Das D, Harkin S, Episkopou V, Hill CS. 2007. Arkadia activates Smad3/Smad4-dependent transcription by triggering signal-induced SnoN degradation. *Mol Cell Biol* 27:6068–6083.
- Li Q, Graff JM, O'Connor AE, Loveland KL, Matzuk MM. 2007a. SMAD3 regulates gonadal tumorigenesis. *Mol Endocrinol* 21:2472–2486.
- Li Q, Kumar TR, Underwood K, O'Connor AE, Loveland KL, Seehra JS, Matzuk MM. 2007b. Prevention of cachexia-like syndrome development and reduction of tumor progression in inhibin-deficient mice following administration of a chimeric activin receptor type II-murine Fc protein. *Mol Hum Reprod* 13:675–683.
- Lin X, Liang M, Feng X-H. 2000. Smurf2 is a ubiquitin E3 ligase mediating proteasome-dependent degradation of Smad2 in TGF-beta signalling. *J Biol Chem* 275:36818–36822.
- Lin F, Morrison JM, Wu W, Worman HJ. 2005. MAN1, an integral protein of the inner nuclear membrane, binds Smad2 and Smad3 and antagonizes transforming growth factor-beta signalling. *Hum Mol Genet* 14:437–445.
- Lo RS, Massague J. 1999. Ubiquitin-dependent degradation of TGF-beta activated Smad2. *Nat Cell Biol* 1:472–478.
- Loveland KL, Hime GR. 2005. TGF-beta superfamily members in spermatogenesis: Setting the stage for fertility in the mouse and Drosophila. *Cell Tissue Res* 322:141–146.
- Loveland KL, Bakker M, Meehan T, Christy E, von Schonfeldt V, Drummond A, de Kretser DM. 2003. Expression of Bambi is widespread in juvenile and adult rat tissues and is regulated in male germ cells. *Endocrinology* 144:4180–4186.
- Luo K. 2004. Ski and SnoN: Negative regulators of TGF-beta signaling. *Curr Opin Genet Dev* 14:65–70.
- Massague J, Wotton D. 2000. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J* 19:1745–1754.
- Massague J, Seoane J, Wotton D. 2005. Smad transcription factors. *Genes Dev* 19:2783–2810.
- Mather JP, Attie KM, Woodruff TK, Rice GC, Phillips DM. 1990. Activin stimulates spermatogonial proliferation in germ-Sertoli cell cultures from immature rat testis. *Endocrinology* 127:3206–3214.
- Matzuk MM, Finegold MJ, Su JG, Hsueh AJ, Bradley A. 1992. Alpha-inhibin is a tumour-suppressor gene with gonadal specificity in mice. *Nature* 360:313–319.
- Matzuk MM, Kumar TR, Bradley A. 1995. Different phenotypes for mice deficient in either activins or activin receptor type II. *Nature* 374:356–360.
- Meehan T, Schlatt S, O'Bryan M, de Kretser DM, Loveland KL. 2000. Regulation of germ cell and Sertoli cell development by activin, follistatin and FSH. *Dev Biol* 220:225–237.
- Miura S, Takeshita T, Asao H, Kumura Y, Murata K, Sasaki Y, Hanai J-I, Beppu H, Tsukazaki T, Wrana JL, Miyazono K, Sugamura K. 2000. Hgs (Hrs), a FYVE domain protein, is involved in Smad signaling through cooperation with SARA. *Mol Cell Biol* 20:9346–9355.
- Moustakas A, Souchelnytskyi S, Heldin C-H. 2001. Smad regulation in TGF-beta signal transduction. *J Cell Sci* 114:4359–4369.
- Mullaney BP, Skinner MK. 1993. Transforming growth factor-beta (Beta1, Beta2 and Beta3) gene expression and action during pubertal development of the seminiferous tubule: Potential role at the onset of spermatogenesis. *Mol Endocrinol* 7:67–76.
- Nagano M, Ryu BY, Brinster CJ, Avarbock MR, Brinster RL. 2003. Maintenance of mouse male germ line stem cells *in vitro*. *Biology Reprod* 68:2207–2214.
- Nomura N, Sasamoto S, Ishii S, Date T, Matsui M, Ishizaki R. 1989. Isolation of human cDNA clones of ski and the ski-related gene, sno. *Nucleic Acids Res* 17:5489–5500.
- Olaso R, Pairault C, Boulogne B, Durand P, Habert R. 1998. Transforming growth factor beta1 and beta2 reduce the number of gonocytes by increasing apoptosis. *Endocrinology* 139:733–740.
- Pearson-White S, Crittenden R. 1997. Proto-oncogene Sno expression, alternative isoforms and immediate early serum response. *Nucleic Acids Res* 25:2930–2937.
- Pearson-White S, McDuffie M. 2003. Defective T-cell activation is associated with augmented transforming growth factor beta sensitivity in mice with mutations in the Sno gene. *Mol Cell Biol* 23:5446–5459.
- Pelzer T, Lyons GE, Kim S, Moreadith RW. 1996. Cloning and characterization of the murine homolog of the *sno proto-oncogene* reveals a novel splice variant. *Dev Dyn* 205:114–125.
- Prabhu SM, Meistrich ML, McLaughlin EA, Roman SD, Warne S, Mendis S, Itman C, Loveland KL. 2006. Expression of c-kit receptor mRNA and protein in the developing, adult and irradiated rodent testis. *Reproduction* 131:489–499.
- Puglisi R, Montanari M, Chiarella P, Stefanini M, Boitani C. 2004. Regulatory role of BMP2 and BMP4 in spermatogonia and Sertoli cell proliferation in the immature mouse. *Eur J Endocrinol* 151:511–520.

- Richards AJ, Enders GC, Resnick JL. 1999. Activin and TGF-beta limit murine primordial germ cell proliferation. *Dev Biol* 207:470-475.
- Russell LD, Ettl RA, Sinha Hikim AD, Clegg EP. 1990. Histological and histopathological evaluation of the testis. Clearwater: Cache River Press.
- Sarker KP, Wilson SM, Bonni S. 2005. SnoN is a cell type-specific mediator of transforming growth factor beta responses. *J Biol Chem* 280:13037-13046.
- Shi Y, Massague J. 2003. Mechanisms of TGF-beta signalling from cell membrane to the nucleus. *Cell Adhes Commun* 113:685-700.
- Shinagawa T, Dong HD, Xu M, Maekawa T, Ishii S. 2000. The sno gene, which encodes a component of the histone deacetylase complex, acts as a tumor suppressor in mice. *EMBO J* 19:2280-2291.
- Shuttlesworth GA, de Rooij DG, Huhtaniemi I, Reissmann T, Russell LD, Shetty G, Wilson G, Meistrich ML. 2000. Enhancement of a spermatogonial proliferation and differentiation in irradiated rats by gonadotropin-releasing hormone antagonist administration. *Endocrinology* 141:37-49.
- Small CL, Shima JE, Uzumcu M, Skinner MK, Griswold MD. 2005. Profiling gene expression during the differentiation and development of the murine embryonic gonad. *Biol Reprod* 72:492-501.
- Stroschein SL, Wang W, Zhou S, Zhou Q, Luo K. 1999. Negative feedback regulation of TGF-beta signaling by the SnoN oncoprotein. *Science* 286:771-774.
- Tan R, Zhang J, Tan X, Zhang X, Yang J, Liu Y. 2006. Downregulation of SnoN expression in obstructive nephropathy is mediated by an enhanced ubiquitin-dependent degradation. *J Am Soc Nephrol* 17:2781-2791.
- ten Dijke P, Goumans MJ, Itoh F, Itoh S. 2002. Regulation of cell proliferation by Smad proteins. *J Cell Physiol* 191:1-16.
- Xia Y, Sidis Y, Schneyer A. 2004. Overexpression of follistatin-like 3 in gonads causes defects in gonadal development and function in transgenic mice. *Mol Endocrinol* 18:979-994.
- Zhang L, Sato E, Amagasaki K, Nakao A, Naganuma H. 2006. Participation of an abnormality in the transforming growth factor-beta signaling pathway in resistance of malignant glioma cells to growth inhibition induced by that factor. *J Neurosurg* 105:119-128.
- Zhang Z, Shao S, Meistrich ML. 2007. The radiation-induced block in spermatogonial differentiation is due to damage to the somatic environment, not the germ cells. *J Cell Physiol* 211:149-158.