

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

**FETAL, NEONATAL, PUBERTE VE ERİŞKİN**  
**FARE TESTİSİNDE**  
**PARP-1, PARP-2 VE PAR EKSPRESYONLARININ**  
**ARAŞTIRILMASI**

**Nazlı Ece GÜNGÖR**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Antalya, 2010**

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

**FETAL, NEONATAL, PUBERTE VE ERİŞKİN**  
**FARE TESTİSİNDE**  
**PARP-1, PARP-2 VE PAR EKSPRESYONLARININ**  
**ARAŞTIRILMASI**

**Nazlı Ece GÜNGÖR**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı**

**Doç. Dr. Çiler ÇELİK ÖZENCİ**

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi  
Tarafından Desteklenmiştir (Proje No:2009.02.122.006)

**“Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir”**

**Antalya,2010**

**Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;**

Bu alışma jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Üreme Biyolojisi Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. . . / . . / 2010

**Tez Danışmanı:** Doç. Dr. iler ÇELİK ÖZENCİ  
Akdeniz Ünivesitesi Tıp Fakültesi  
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

**Üye** : Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

**Üye** : Prof. Dr. Necdet DEMİR  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

**Üye** : Doç. Dr. Arda TAŐATARGİL  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Farmakoloji Anabilim Dalı

**Üye** : Doç. Dr. Gökhan AKKOYUNLU  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

**ONAY:**

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun . . . / . . . / 2010 tarih ve . . . / . . . sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

**Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL**  
**Enstitü Müdürü**

## ÖZET

İnsanda ve farede oldukça benzer olan testis gelişimi, somatik hücrelerin etkisiyle gerçekleşen ve hücre farklılaşması, apoptoz, mitoz ve mayoz bölünmeler gibi önemli biyolojik olayları içeren bir süreçtir. Germ hücrelerinin ve onların destek hücreleri olan Sertoli hücrelerinin fetal ve neonatal dönemlerdeki normal gelişimleri, yetişkin erkek üreme fonksiyonlarını belirlemektedir. Diğer bir deyişle, testis gelişimindeki morfolojik ve hücresel olayların düzenlenmesi, yetişkin testis özelliklerinin kazanılması için gereklidir. Poli ADP-ribozilasyon (PARlasyon), Poli ADP-riboz Polimeraz (PARP)'lar tarafından katalizlenen ve DNA zincir kırıklarıyla aktive olan hücresel bir cevaptır. PARP-1, PARP ailesinin en iyi tanımlanmış üyesidir. Erişkin testiste; PARP-1'in ve Poli ADP-riboz (PAR) polimerlerinin spermatogenik hücrelerdeki dağılımı ve germ hücre farklılaşmasında PARlasyonun rolü gösterilmiştir. PARlasyon, hedef proteinlere PAR polimerleri ekleyip onların aktivitesini düzenleyen bir postranslasyonel modifikasyondur. Ayrıca, PARP-2'nin spermatosit mayoz bölünmeleri ve spermiyogenezdeki anahtar rolü, PARP-2 geni silinmiş farelerin hipofertil olmaları ile kanıtlanmıştır. Bu çalışmada, erişkin testisteki rollerinden yola çıkarak, PARP-1, PARP-2 ve onların ürünü olan PAR polimerlerinin; fetal, neonatal, pubertal testislerdeki ekspresyonları değerlendirilmiştir.

Embriyonik (E) 15.5, E17.5, doğum sonrası (DS) 0, DS3, DS5, DS9, DS15, DS20 ve erişkin testis dokuları parafin bloklarından alınan seri kesitlere; PARP-1, PARP-2 ve PAR'ın dağılımlarını incelemek amacıyla immünohistokimya uygulanmıştır. Bunlara ek olarak; germ hücrelerin belirtilmesi için VASA (MVH), puberte öncesinde henüz farklılaşmamış pre-Sertoli hücrelerini göstermek için Anti-Müllerian Hormon (AMH) antikoru kullanılmıştır.

PARP-1; E15.5, E17.5 ve PP0 günlerinde gonositlerde gözlenmiştir. PP3.günde; seminifer tübülün bazaline göç eden gonositlerde ekspresyonu devam etmektedir. PP5.günde; tübülün bazaline göç ederek spermatogonyumlara farklılaşan gonositlerde ekspre olmaktadır. PP9, PP15 ve PP20.günlerde spermatogonyumlarda, erişkin testis dokusunda ise; spermatogonyumların yanı sıra intersitisyel alandaki hücrelerin nükleuslarında varlığı gösterilmiştir. PAR ekspresyonu, E15.5, E17.5, DS0, DS3, DS5, DS15, DS20. günlerde pre-Sertoli hücrelerinde gözlenirken, DS9. günde testiste PAR ekspresyonu görülmemiştir. Erişkinde ise; spermatogonyumlarda ve intersitisyel alandaki hücrelerin nükleuslarında PAR ekspresyonu gözlenmiştir. PARP-2 ekspresyonu; E15.5, E17.5, DS0, DS3. günlerde gonositlerde izlenirken DS5.günde spermatogonyumlarda görülmemiştir. DS9, DS15 ve DS20. günlerde PARP-2 ekspresyonu, spermatogonyumlarda ve spermatositlerde izlenmiştir. E15.5, E17.5 ve DS0-DS20. günlerde, Sertoli hücrelerinde ekspresyonu devam eden PARP-2, erişkinde ise; Sertoli sitoplazmasında, spermatositlerde ve uzayan spermatidlerde gözlenmiştir.

Bu çalışmada; PARP-1, PARP-2 ve PAR'ın testis gelişim sürecinde somatik ve germ hücrelerindeki ekspresyonları ilk defa gösterilmiştir. Sonuçlarımız, erişkinde erkek fertilitesi için önemli olduğu bildirilen bu moleküllerin, embriyonik ve pre-pubertal testis gelişiminde de rolleri olabileceğini ortaya koymaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Fare testis gelişimi, PARP-1, PARP-2, PAR, immünohistokimya

## ABSTRACT

Development of testis, a process that is highly similar between humans and mice, occurs under the influence of somatic cells and involves important biological events such as; differentiation, apoptosis, and meiotic/mitotic cell divisions. Thus, processes during the fetal and neonatal periods contributing to the development of germ cells and Sertoli cells that constitute the major supportive matrix, determine adult male reproductive function. In other words, regulation of morphologic and cellular events is required for acquiring the characteristic properties of mature testis. It has been demonstrated that in the adult testis, within the spermatogenic cells, PARP-1 protein and PAR polymers are expressed and play an important role in differentiation of germ cells. In addition, it is thought that PARP proteins might be involved in maintenance of genomic integrity in adult spermatogenic cells. Furthermore, PARP-2 has been implicated in abnormal spermatogenesis. In a recent study, PARP-2 deficient male mice were found to have hypofertility and the decrease in fertility seen in these PARP-2- null mice could be related to both defective meiosis I and spermiogenesis. Taken above into account, we evaluated the expressions of PARP-1 and PARP-2, together with their end-product PAR polymers during mouse testis development.

Immunohistochemistry was performed for PARP-1, PARP-2 and PAR antibodies that were applied to paraffin sections of embryonic (E) 15.5, E17.5, doğum sonrası (PP) 0, PP3, PP9, PP15, PP20 and adult testis tissues. In addition, VASA (MVH) and Anti-Müllerian hormone (AMH) antibodies were used for defining germ cells and for determining undifferentiated pre-Sertoli cells, respectively.

PARP-1 was seen in gonocytes at E15.5, E17.5, and PP0 days. At day PP3, the expression was present in gonocytes that migrate to the basal membrane of tubules and also in pre-Sertoli cells. At day PP5, PARP-1 expression was observed in differentiated spermatogonia. At day PP9, PP15, PP20 PARP-1 was seen in spermatogonia and in adult testis tissue the expression was in spermatogonia and interstitial area cells. PAR expression on days E15.5, E17.5, PP0, PP3, PP5, PP15 and PP20 was present in pre-Sertoli cells. On days PP9, there was no PAR expression. In adult testis tissue, PAR expression was observed in spermatogonia and interstitial area cells. PARP-2 expression was present in gonocytes at days E15.5, E17.5, PP0, and PP3. On day PP5 it wasn't seen in spermatogonia. PARP-2 immunolocalization was seen in spermatocytes at days PP9, PP15, and PP20. On days E15.5, E17.5, and PP0-PP20, PARP-2 was localized to Sertoli cells. In adult testis tissue, PARP-2 expression was present in spermatogonia, spermatocytes and in elongated spermatids.

Our study for the first time has demonstrated the distributions of PARP-1 and PARP-2 during testicular development in mice. Our findings provide evidence that PARP proteins may have roles during both embryonic and prepubertal testis development, in addition to their key roles in adult male fertility.

**Key Words:** Mouse testis development, PARP-1, PARP-2, PAR, immunohistochemistry

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın planlanması, projelendirilmesi ve sonuçlarının değerlendirilmesinde önemli katkılarda bulunan danışman hocam Sayın Doç. Dr. Çiler ÇELİK ÖZENCİ'ye,

Tezimin gerçekleşmesi için her türlü imkan ve desteği sağlayan Sayın hocam Prof. Dr. Mevlüt ASAR'a,

İhtiyacım olduğunda yardımlarını esirgemeyerek her zaman destek olan Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nın tüm hocalarına ve çalışanlarına,

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

Son olarak, beni yalnız bırakmayan ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili ailemin tüm üyelerine en içten saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunuyorum.

Nazlı Ece GÜNGÖR

## İÇİNDEKİLER DİZİNİ

|  | Sayfa      |
|--|------------|
| <b>ÖZET</b>  | <b>iv</b>  |
| <b>ABSTRACT</b>  | <b>v</b>   |
| <b>TEŞEKKÜR</b>  | <b>vi</b>  |
| <b>İÇİNDEKİLER DİZİNİ</b>                                | <b>vii</b> |
| <b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b>                    | <b>x</b>   |
| <b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>                                   | <b>xii</b> |
| <b>GİRİŞ</b>   | <b>1</b>   |
| <b>1.1. Hipotezin Temeli ve Amaç</b>                     | <b>1</b>   |
| <b>GENEL BİLGİLER</b>                                    | <b>3</b>   |
| <b>2.1. İnsanda Prenatal Testis Gelişimi</b>             | <b>3</b>   |
| <b>2.1.1. İnsan Primordiyal Germ Hücrelerinin Göçü</b>   | <b>3</b>   |
| <b>2.1.2. İnsanda Farklılaşmamış Gonadların Gelişimi</b> | <b>4</b>   |
| <b>2.2. Farede Gonad Gelişimi</b>                        | <b>5</b>   |
| <b>2.2.1. Cinsiyet Belirleyici Anahtar</b>               | <b>5</b>   |
| <b>2.2.2. Destek Hücre Soyu</b>                          | <b>6</b>   |
| <b>2.2.3. Steroidogenik Hücre Soyu</b>                   | <b>6</b>   |
| <b>2.2.4. Bağlayıcı Hücre Soyu</b>                       | <b>7</b>   |
| <b>2.2.5. Germ Hücreleri</b>                             | <b>7</b>   |
| <b>2.3. Erkek Cinsiyet Farklılaşması</b>                 | <b>8</b>   |
| <b>2.3.1. Testis Farklılaşması</b>                       | <b>9</b>   |
| <b>2.3.1.1. Germ Hücre Gelişimi</b>                      | <b>9</b>   |
| <b>2.5. Farelerde Spermatogenezin Evreleri</b>           | <b>11</b>  |
| <b>2.5.1. Mitoz Evresi</b>                               | <b>11</b>  |
| <b>2.5.2. Mayoz Evresi</b>                               | <b>12</b>  |
| <b>2.5.3. Spermiyogenez</b>                              | <b>12</b>  |
| <b>2.5.3.1. Golgi Evresi</b>                             | <b>12</b>  |
| <b>2.5.3.2. Kep Evresi</b>                               | <b>12</b>  |
| <b>2.5.3.3. Akrozomal Evre</b>                           | <b>13</b>  |
| <b>2.5.3.4. Olgunlaşma Evresi</b>                        | <b>13</b>  |

|                        |   |    |
|------------------------|---|----|
| 2.6.                   | Poli ADP Ribozilasyon Mekanizması   | 13 |
| 2.7.                   | PARP Ailesi   | 14 |
| 2.7.1.                 | PARP-1  | 15 |
| 2.7.2.                 | PARP-2  | 16 |
| 2.7.2.1.               | Genom Bütünlüğü Korunması PARP-1 ve PARP-2  | 17 |
| 2.7.2.2.               | PARP-2 ve Erkek Germ Hücre Farklılaşması  | 19 |
| 2.7.3.1.               | Poli ADP-Riboz Glikohidrolaz (PARG) ve PARP Etkileşimi                                  | 19 |
| 2.8.                   | PARP Aktivasyonu  | 20 |
| 2.8.2.                 | Sentromer Fonksiyonu  | 21 |
| 2.8.3.                 | PARP-2 ve Telomer Uzunluğu  | 21 |
| 2.8.4.                 | Sentrozomal Fonksiyon   | 22 |
| 2.8.4.                 | PARP ve Apoptoz   | 22 |
| 2.9.                   | Erkek Gametlerde PARP aktivasyonun rolü   | 22 |
| 2.9.2.                 | PARP' ın Germ Hücre Ölümündeki Rolü   | 23 |
| 2.9.1.                 | PARP ve Spermatogenez   | 24 |
| <b>GEREÇ VE YÖNTEM</b> |   | 27 |
| 3.1.                   | Deney Hayvanları  | 27 |
| 3.2.                   | Dokuların Elde Edilmesi ve Hazırlanması   | 28 |
| 3.3.                   | İmmünohistokimyasal Protokol  | 29 |
| <b>BULGULAR</b>        |   | 30 |
| 4.1.                   | Embriyonik dönem fare testis dokularında<br>immünohistokimyasal bulgular                | 30 |
| 4.1.1.                 | Embriyonik 15.5. günde (E15.5) PARP-1, PARP-2 ve PAR<br>ekspresyonları                  | 30 |
| 4.1.2.                 | Embriyonik 17.5. günde (E17.5) PARP-1, PARP-2 ve PAR<br>ekspresyonları                  | 33 |
| 4.2.                   | Neonatal ve Postnatal günlere ait fare testis dokusunda<br>immünohistokimyasal bulgular | 33 |
| 4.2.2.                 | Doğum sonrası 0. Günde (PP0) PARP-1, PARP-2 ve PAR<br>ekspresyonları                    | 33 |
| 4.2.3.                 | Doğum sonrası 3. Günde (PP3) PARP-1, PARP-2 ve PAR<br>ekspresyonları                    | 38 |



|  |                                   |
|--|-----------------------------------|
| 4.2.4. Doğum sonrası 5. günde (PP5) PARP-1, PARP-2 ve PAR ekspresyonları   | 38                                |
| 4.2.5. Doğum sonrası 9. Günde (PP9) PARP-1, PARP-2 ve PAR ekspresyonları   | 43                                |
| 4.2.6. Doğum sonrası 15. günde PARP-1, PARP-2 ve PAR ekspresyonları        | 43                                |
| 4.2.7. Doğum sonrası 20. günde (PP20) PARP-1, PARP-2 ve PAR ekspresyonları | 48                                |
| 4.3. Erişkin fare testisinde immünohistokimyasal bulgular                  | 48                                |
| 4.3.1. Erişkin dönemde PARP-1, PARP-2 ve PAR ekspresyonları                | 48                                |
| <b>TARTIŞMA VE SONUÇLAR</b>  | Hata! Yer işareti tanımlanmamış.3 |
| <b>KAYNAKLAR</b>   | 56                                |
| <b>ÖZGEÇMİŞ</b>  | 67                                |

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

|                                   |   |                                 |
|-----------------------------------|---|---------------------------------|
| <b>ADP</b>                        | : | Adenozin Di Fosfat              |
| <b>AIF</b>                        | : | Apoptoz indükleyici faktör      |
| <b>AMH</b>                        | : | Anti müllerian hormon           |
| <b>BRCA-1</b>                     | : | Breast Cancer-1                 |
| <b>BER</b>                        | : | Baz kesip çıkarma               |
| <b>cPARP</b>                      | : | Yarıklanmış PARP                |
| <b>DAB</b>                        | : | 3,3' Diaminobenzidine           |
| <b>DNA</b>                        | : | Deoksiribonükleik asit          |
| <b>DS</b>                         | : | Doğum Sonrası                   |
| <b>E</b>                          | : | Embriyonik dönem                |
| <b>EGF</b>                        | : | Epidermal Büyüme Faktörü        |
| <b>FasL</b>                       | : | Fas ligandı                     |
| <b>FSH</b>                        | : | Folikül Stimüle Edici Hormon    |
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> | : | Hidrojen peroksit               |
| <b>KDa</b>                        | : | Kilo dalton ağırlık             |
| <b>MIS</b>                        | : | Müllerian inhibe edici madde    |
| <b>MNU</b>                        | : | N-metil N-nitrozüre             |
| <b>mRNA</b>                       | : | Mesajcı ribo nükleik asit       |
| <b>NAD</b>                        | : | Nikotinamid adenin dinükleotid  |
| <b>NF-κB</b>                      | : | Nükleer faktör-κB               |
| <b>NLS</b>                        | : | Nükleer lokalizasyon sinyalleri |
| <b>NO</b>                         | : | Nitrik oksit                    |
| <b>NoLS</b>                       | : | Nükleer Lokalizasyon Sinyali    |
| <b>NuMa</b>                       | : | Nükleer mitotik aparat proteini |
| <b>PAR</b>                        | : | Poli ADP Riboz                  |
| <b>PARG</b>                       | : | Poli ADP Riboz Glikohidrolaz    |
| <b>PARP -1</b>                    | : | Poli ADP Riboz Polimeraz-1      |
| <b>PARP -2</b>                    | : | Poli ADP Riboz Polimeraz-2      |

|                                |   |  |
|--------------------------------|---|--|
| <b>PAS</b>                     | : | Periyodik asit Schiff                              |
| <b>PCNA</b>                    | : | Çoğalan hücre çekirdek antijeni                    |
| <b>PGH</b>                     | : | Primordiyal Germ Hücreleri                         |
| <b>P-Mod-S</b>                 | : | Peritübüler modifies Sertoli                       |
| <b>PP</b>                      | : | Doğum sonrası                                      |
| <b>RNA</b>                     | : | Ribonükleik asit                                   |
| <b>SCO</b>                     | : | Sertoli Cell Only “Sadece Sertoli hücresi bulunan” |
| <b>SCF</b>                     | : | Stem Cell Factor                                   |
| <b>SKH</b>                     | : | Spermatogonyal Kök Hücre                           |
| <b>SRY</b>                     | : | Y kromozomunun cinsiyet belirleyici bölgesi        |
| <b>SSBR</b>                    | : | Tek zincir baz tamiri                              |
| <b>TBS</b>                     | : | Tris Tamponlu Tuz Çözeltisi                        |
| <b>TBS-T</b>                   | : | Tween-20’li Tris Tamponlu Tuz Çözeltisi            |
| <b>TDF</b>                     | : | Testis belirleyici faktör                          |
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b> | : | Tümör nekroz faktör-alfa                           |
| <b>TRF-1</b>                   | : | Telomerik protein-1                                |
| <b>TRF-2</b>                   | : | Telomerik protein-2                                |
| <b>XRCC1</b>                   | : | X-ray repair cross-complementing I                 |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

| Şekil No |  | Sayfa No |
|----------|--|----------|
| 2.1.2.   | İnsan gonadlarının gelişimi  | 4        |
| 2.2.     | Fare embriyonik primordiyal germ hücre gelişimi  | 5        |
| 2.3.     | Dorsal mezenterde dorsal aort ve nöral tüp tarafında bulunan farklılaşmamış gonad  | 8        |
| 2.4.     | Farede seminifer epitelyum boyunca görülen germ hücre dağılımını gösteren tek bir Sertoli hücresinin şematize resmi                  | 10       |
| 2.5.     | Farede seminifer epitelyum evrelendirmesi  | 11       |
| 2.6.     | DNA zincir kırıkları ile aktive olan Poli ADP ribozilasyon   | 14       |
| 2.7.1.   | PARP-1 proteinin yapısı  | 15       |
| 2.7.2.   | Fare PARP-1 ve fare PARP-2'nin yapısı  | 16       |
| 2.7.2.1. | DNA hasar/tamir mekanizmasında PARP etkileşimi   | 18       |
| 2.9.2.   | PARP'ın ROS, gonotoksin ya da PARP hedefleri nedeni ile oluşan DNA hasarı sonucu gerçekleşen hücre ölümündeki olası rolleri          | 24       |
| 3.1.     | Doğum sonrası 0.günden yetişkine kadar olan süreçte testiste seminifer tübüllerde görülen hücre tipleri                              | 28       |
| 3.2.     | Fare embriyolarının steriomikroskoptaki görüntüleri  | 28       |
| 4.1.1a.  | Embriyonik 15.5. güne ait fare testisinde PARP-1, PARP-2 ve PAR ekspresyonları   | 31       |
| 4.1.1b.  | Farede embriyonik dönem 15.5. günde seri kesitlerde PARP-1, PARP- 2 ve PAR ekspresyonlarının immünohistokimyasal olarak gösterilmesi | 32       |
| 4.1.2a.  | Embriyonik 17.5. güne ait fare testisinde PARP-1, PARP-2 ve PAR ekspresyonları   | 34       |

| <b>Şekil No</b> |   | <b>Sayfa No</b> |
|-----------------|---|-----------------|
| <b>4.1.2b.</b>  | Farede embriyonik dönem 17.5. günde seri kesitlerde PARP-1, PARP-2 ve PAR ekspresyonlarının immünohistokimyasal olarak gösterilmesi | <b>35</b>       |
| <b>4.2.2a.</b>  | Doğum sonrası 0. güne ait fare testisinde PARP-1, PARP-2 ve PAR ekspresyonları  | <b>36</b>       |
| <b>4.2.2b.</b>  | Doğum sonrası 0.günde seri kesitlerde PARP-1, PARP-2 ve PAR ekspresyonlarının immünohistokimyasal olarak gösterilmesi               | <b>37</b>       |
| <b>4.2.3a.</b>  | Doğum sonrası 3. güne ait fare testisinde PARP-1, PARP-2 ve PAR ekspresyonları  | <b>39</b>       |
| <b>4.2.3b.</b>  | Farede doğum sonrası 3. günde seri kesitlerde PARP-1, PARP-2 ve PAR ekspresyonlarının immünohistokimyasal olarak gösterilmesi       | <b>40</b>       |
| <b>4.2.4a.</b>  | Doğum sonrası 5. güne ait fare testisinde PARP-1, PARP-2 ve PAR ekspresyonları  | <b>41</b>       |
| <b>4.2.4b.</b>  | Farede doğum sonrası 5. günde seri kesitlerde PARP-1, PARP-2 ve PAR ekspresyonlarının immünohistokimyasal olarak gösterilmesi       | <b>42</b>       |
| <b>4.2.5a.</b>  | Doğum sonrası 9. güne ait fare testisinde PARP-1, PARP-2 ve PAR ekspresyonları  | <b>44</b>       |
| <b>4.2.5b.</b>  | Farede doğum sonrası 9. günde seri kesitlerde PARP-1, PARP-2 ve PAR ekspresyonlarının immünohistokimyasal olarak gösterilmesi       | <b>45</b>       |
| <b>4.2.6a.</b>  | Doğum sonrası 15. güne ait fare testisinde PARP-1, PARP-2 ve PAR ekspresyonları   | <b>46</b>       |
| <b>4.2.6b.</b>  | Farede doğum sonrası 15. günde seri kesitlerde PARP-1, PARP-2 ve PAR ekspresyonlarının immünohistokimyasal olarak gösterilmesi      | <b>47</b>       |
| <b>4.2.7a.</b>  | Doğum sonrası 20. güne ait fare testisinde PARP-1, PARP-2 ve PAR ekspresyonları   | <b>49</b>       |
| <b>4.2.7b.</b>  | Farede doğum sonrası 20. günde seri kesitlerde PARP-1, PARP-2 ve PAR ekspresyonlarının immünohistokimyasal olarak gösterilmesi      | <b>50</b>       |
| <b>4.3.1a.</b>  | Erişkin fare testisinde PARP-1, PARP-2 ve PAR ekspresyonları  | <b>51</b>       |
| <b>4.3.1b.</b>  | Erişkin fare testisinde seri kesitlerde PARP-1, PARP-2 ve PAR ekspresyonlarının immünohistokimyasal olarak gösterilmesi             | <b>52</b>       |

# GİRİŞ

## 1.1. Hipotezin Temeli ve Amaç

Testis farklılaşması, Sertoli hücrelerine dönüşecek olan somatik hücrelerde ekspresyon olan SRY geni ile indüklenir. Sertoli hücreleri erkek gonadların düzenleyici merkezidir ve diğer bütün hücre tiplerinin farklılaşmasını yönetir (1-3). Kök hücreden itibaren sağlıklı sperm üretilmesi için, embriyonik dönemde hem apoptozu indükleyen hem de hücre devamlılığını ve canlılığını sağlayan faktörlerin doğru zamanda ve dengeli bir şekilde ortamda bulunması gerekmektedir. Yetişkinlik döneminde, bir erkeğin fertilité kriteri spermatogonyumlardan üretilen spermelerdir ve bunun temelleri embriyonik dönemde atılmaktadır (4-7). Örneğin: testiküler disgenéz sendromu, kriptorşidizm gibi düşük sperm sayısı ile karakterize patolojilerin ortak orijini fetal hayat olarak gösterilmiştir (8). Erişkinde ortaya çıkan bu hastalıklar testiküler gelişim sırasında Sertoli hücrelerinin anormal gelişim göstermesi ile açıklanmaktadır (8). Testiküler kanser türleri olan seminoma veya non-seminoma gibi germ hücre tümörlerinin ortaya çıkış mekanizmasının da fetal ve neonatal hayatta gonosit proliferasyonundaki ve farklılaşmasındaki bozukluklardan kaynaklandığı düşünülmektedir (9). Sonuç olarak, testis gelişimi sırasında somatik ve germ hücrelerin proliferasyon ve farklılaşmalarının doğru şekilde gerçekleşmesi normal testis gelişimi açısından önemlidir.

PARP-1 birçok dokuda farklı düzeylerde bulunmakla birlikte; testis, dalak ve timusta mRNA'sının yüksek düzeylerdeki varlığı bildirilmiştir (10, 11). Erişkin, testiküler dokudaki PARP-1 ekspresyonuyla ilişkili rodentlerde yapılan çalışmaların sonuçlarına göre; PARP mRNA aktivitesi ve proteini esasen spermatogonyum ve pakiten evredeki spermatositlerde mevcuttur (12, 13). 1992 yılında yapılan bir çalışmada, erişkin testislerde yüksek seviyelerde PARP mRNA ekspresyonu; pakiten spermatositlerde, azalan ekspresyon şiddeti ile yuvarlak spermatidlerde ve uzayan spermatidlerde gösterilmiştir (14). İlginç olarak; PARP-1 fetal gonadlarda cinsiyet belirlenmesi sırasında (fare embriyonik 11.5'uncu gün (E 11.5)) Sertoli hücresi nükleuslarında Sry ile birlikte lokalize olmaktadır ve Sry geninin aktivitesini düzenlemektedir (15). Ancak, embriyonik 11.5'uncu günden sonra bu hücrelerin PARP-1 ekspresyonlarını devam ettirip ettirmediği hakkında literatürde bir bilgi bulunmamaktadır.

PARP-2 tarafından düzenlenen PAR oluşumunun, spermatidlerde kromatin kondenzasyonu sırasında meydana geldiği gösterilmiştir (13). Uzayan spermatidlerde; kromatin paketlenmesi sırasında histon-protamin değişiminin olduğu evrelerde, PAR'ın yüksek düzeyde ekspresyonu belirtilmiştir (13). PARP-2'nin DNA tamirindeki rolüne ek olarak, yetişkin testiste 1. mayoz bölünmeler sırasında ve haploid spermatid farklılaşmasında da önemli bir rolü olduğu ilk defa 2006 yılında ortaya konmuştur (16). Bu çalışmada, PARP-2 geni silinmiş farelerin testis hacimlerinin yaklaşık %50 oranında azaldığı ve hasarlı spermatogenez gösterdikleri bildirilmiştir.

Bu farelerin testislerinde, metilasyon ve histon asetilasyonu gibi epigenetik düzenlenmelerin bozulduğu ve kromozom ayrılması gibi olayların düzgün şekilde yapılamadığı görülmüştür. Ayrıca bu hayvanlarda, spermatogenezin yuvarlak spermatidlerden uzamış spermatidlere geçiş aşamasını (spermiyogenezi) geciktirdiği hatta başaramadığı da gösterilmiştir. Sonuç olarak, PARP-2 geni silinmiş fareler I. mayoz bölünmeler ve spermiyogenezdeki anormallikler nedeniyle hipofertildir (16).

Erişkin dönemde önemli rolleri olduğu bildirilen PARP ailesinin bu üyelerinin, testis gelişimindeki rollerinin ortaya konması önem taşımaktadır. Testiste erişkin dönemde hangi hücre tiplerinde ekspre oldukları tanımlanmış olan bu proteinlerin, erkek gonad fonksiyonu ile ilgili fizyolojik ve patolojik olası rolleri hakkındaki araştırmalar devam etmektedir. Fakat bu proteinlerin fetal, neonatal ve puberte dönemlerinde testiste hangi hücrelerde ekspre oldukları hakkında literatürde bilgi bulunmamaktadır.

Bu çalışmanın amacı; fetal dönemde (E15.5 ve E17.5 günler), neonatal dönemde (doğum sonrası 0.gün (PP0), PP3, PP5, PP9, PP15. günler), pubertede (PP20. gün) ve yetişkin testis dokularında PARP-1, PARP-2 ve PAR ekspresyonlarının hücresel lokalizasyonunun immünohistokimya ile göstermek ve PARP ailesi üyeleri olan PARP-1, PARP-2 ve onların ürünü olan PAR polimerlerinin testis gelişimini içeren bu süreçteki varlığını araştırmaktır.

## GENEL BİLGİLER

### 2.1. İnsanda Prenatal Testis Gelişimi

Primordiyal germ hücreleri (PGH) ilk kez 4 haftalık fetüste vitellüs kesesi duvarının endoderminde ortaya çıkar. Dördüncü ve 6.haftalar arasında, yaklaşık olarak 10-100 adet PGH ameboid hareketlerle vitellüs kesesinden bağırsak tüpüne, oradan da mezenter boyunca arka vücut duvarının sağ ve sol yanlarına göç ederler. Bu hareket rotası, göç eden ve çoğalan PGH'lerinin plazma membranı alkalin fosfataz enziminden zengin olmalarından dolayı, sitokimya aracılığı ile izlenebilir (17).

#### 2.1.1. İnsan Primordiyal Germ Hücrelerinin Göçü

Primordiyal germ hücreleri son bağırsaktan geçerek gonadal kabartıya göç ederler ve gonadal kabartıda kolonize olurlar. Burada, seminifer kordonları oluşturmak amacıyla pre-Sertoli hücreleri ile etkileşime girerler. C-kit reseptörü ve onunla etkileşen kök hücre faktörü (stem cell factor (SCF) ya da Kit-ligand), hücre göçüne rehberlik eder ve aynı zamanda göç eden PGH'lerinin çoğalmasını da uyarır.

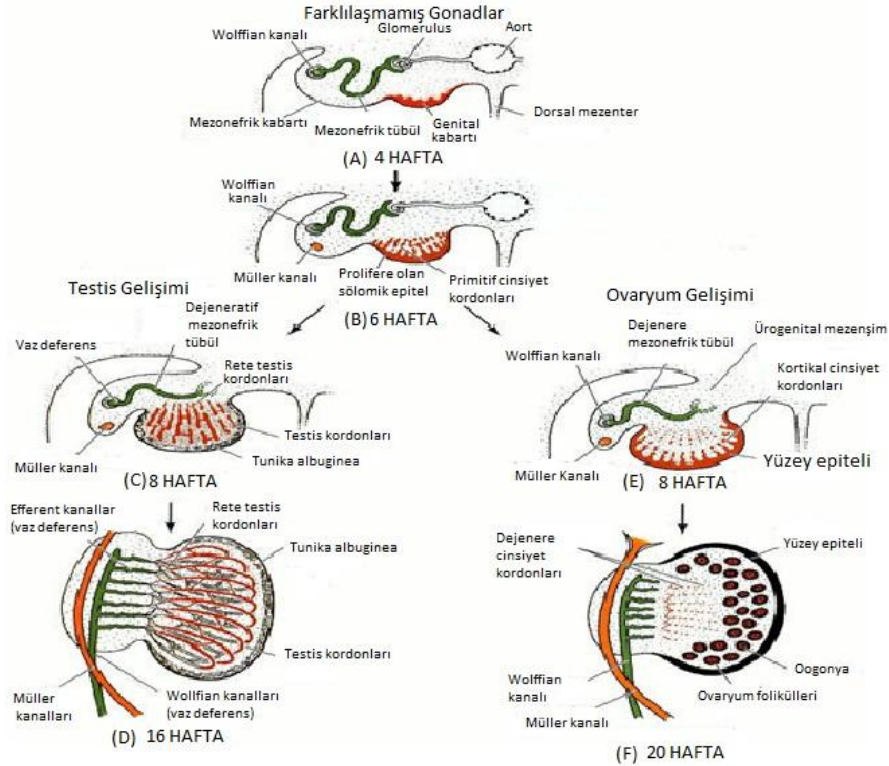
Fetal testis, tubuli rekti aracılığı ile rete testise bağlanmış seminifer kordonlardan oluşur. Bu kordonlar, sölomik epitelden köken alan Sertoli hücrelerinden ve primordiyal germ hücrelerinden köken alan spermatogonyumlardan oluşur. Seminifer kordonlar, mezonefrik mezenşimden köken alan fetal Leydig hücreleri tarafından birbirinden ayrılmıştır.

Fetal Sertoli hücreleri, Müller kanallarının gelişmesini engelleyen Müllerian inhibe edici madde (MIS) salgırlar. MIS yokluğunda, Müller kanalları varlığını sürdürür ve dişi iç genital organlar haline gelirler. Gebeliğin 8.haftasında, spermatogonya öncüleri, PGH'lerinden köken alıp, sölomik epitelden kaynaklanan Sertoli hücreleriyle kuşatılmış olan seminifer kordonlar içinde yer alır. Peritübüler miyoid hücreler ve kan damarları ise mezenşimden köken alır (17).



## 2.1.2. İnsanda Farklılaşmamış Gonadların Gelişimi

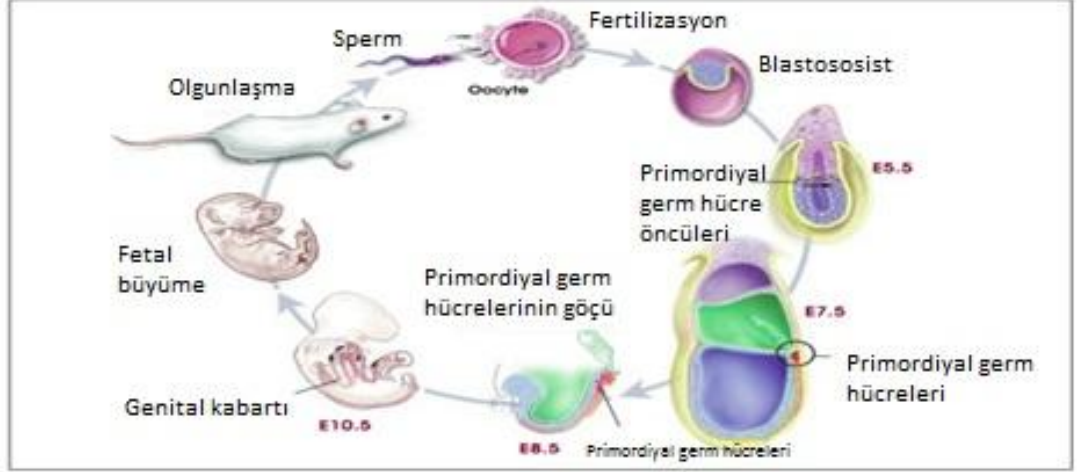
Farklılaşmamış gonadlar, ara mezodermden köken alan büyük ürogenital sistem içerisinde gelişirler. Gonad kabartısı, her bir mezonefrozun ventrolateral yüzeyinde sölomik epitelin kalınlaşması şeklinde ortaya çıkar ve embriyonik dönemin 4.haftasında belli olur (Şekil 2.1.2.). Henüz farklılaşmamış gonad 7.haftaya kadar bipotansiyeldir. Diğer bir deyişle, henüz morfolojik olarak ovaryum ya da testis olarak ayırt edilemez. Bu farklılaşmamış dönem sırasında embriyo, aynı zamanda erkek ya da dişi iç üreme organları için prekürsör olan çiftli genital kanal sistemine sahiptir. Erkek iç üreme organları (seminal vezikül, vas deferens ve epididimis) mezonefroz (Wolffian) kanallarından gelişirken, dişi üreme sistemi (fallop tüpleri, uterus ve üst vajina) paramezonefrik (Müller) kanallarından gelişir. Bu kanal sistemlerinden sadece bir tanesi, gonadın, ovaryum ya da testise farklılaşmasına bağlı olarak ileride normal olarak gelişecektir (18).



Şekil 2.1.2. İnsan gonadlarının gelişimi

- A) İnsanda gebeliğin 4.haftası, genital kabartıya göç eden primordiyal germ hücreleri.  
B) Gebeliğin 6.haftası, genital kabartıda gösterilen primitif cinsiyet kordonları. C) Testis gelişiminin 8.haftası. D) Testis gelişiminin 16. haftası. E) Ovaryum gelişiminin 8.haftası. F) Ovaryum gelişiminin 16.haftası (20).

Genital sistemin gelişimini düzenleyen moleküler mekanizmaların ortaya konmasında farelerde yapılan çalışmalar önemli katkılar sağlamıştır. Farelerin gebelik süreci yaklaşık 20 gün sürer. Cinsiyetin belirlenmesi ve gonadların farklılaşması fetal periyodun ikinci yarısında gerçekleşir. Farede, mezonefroz ilk kez embriyonik 9 ve 10. günlerde (E9, E10) görülür ve mezonefrozun proliferasyonu ile ortaya çıkan farklılaşmamış gonadlar E10. günde belirlemeye başlar. E11.5. günde PGH'leri gonadlarda görünür hale gelirler ve E12. günde gonadlar uzamaya ve büyümeye başlarlar. Bu sırada henüz cinsiyetler arasında görülebilir bir fark yoktur (Şekil 2.2.) (18).



Şekil 2.2. Fare embriyonik primordiyal germ hücre gelişimi (19).

## 2.2. Farede Gonad Gelişimi

### 2.2.1.Cinsiyet Belirleyici Anahtar

Bir gonad fonksiyonel olmak için bir gonad, gamet oluşturacak germ hücrelerine, üreme fonksiyonları için önemli olan hormonları salgılayan ve gametleri destekleyen matrisi sağlayan somatik hücrelere ihtiyaç duyar. Farklılaşmamış gonad 4 temel hücre tipi içerir: destekleyici hücreler, steroidogenik hücreler, bağlayıcı hücreler ve germ hücre soyları. İçinde buldukları organın cinsiyetine bağlı olarak her biri bipotansiyel kadere sahiptir (18).

### 2.2.2. Destek Hücre Soyu

Testiste destek hücre soyu Sertoli hücresi iken ovaryumda granüloza ya da folikül hücreleridir. Destek hücreleri germ hücrelerinin etrafını çevreler, gelişimleri ve farklılaşmaları için uygun ortamı sağlarlar. Sertoli hücreleri sölomik epitelden köken alırlar ve 14.5. günde fare gonadlarında yüksek düzeyde proliferasyon gösterirler. Erişkinlerde Sertoli hücreleri spermatogenezin parakrin düzenleyicisidirler ve sayıları spermatogenezi sınırlayan bir faktördür (19, 20).

Farelerde, Sex Determining Region Y (*Sry*) geni genital kabartıda 10.5 ve 12.5. günler arasında testis farklılaşmasından önce pre-Sertoli hücrelerinde ekspresyon olmaktadır (2). *Sry* ekspresyonu, testis farklılaşmasını başlatır, fakat gelişen testiste gen aktivitesinin sürekliliği için gerekli değildir. Genotipi XX olan farelere *Sry* geni transfeksiyonu yapıldığında, testis gelişimi indüklenir ve gonad belirgin şekilde erkek cinsiyet farklılaşmasına yönelir (21). Sertoli hücreleri ve spermatogonik hücreler arasındaki düzen, normal testiküler fonksiyon için önemlidir. Seminifer kordonların fetal dönemdeki dizilimi ileride seminifer tübül oluşumu için gerekli olacaktır. Farelerde seminifer kordonların bazal lamina ile çevrilmesi 24 saatten az bir sürede gerçekleşir. Bu sırada mezenşimal hücreler ile Sertoli hücreleri arasındaki etkileşim sayesinde seminifer epitel oluşmaya devam eder.

### 2.2.3. Steroidogenik Hücre Soyu

Steroidogenik hücreler, bireyin ikincil cinsiyet karakterlerinin gelişimini sağlayan cinsiyet hormonlarını üretir. Erkeklerde bu hücreler Leydig hücreleridir ve dişilerde ise teka interna ve granüloza hücreleridir. Androjen sekresyonu yapan Leydig hücreleri, aynı zamanda Sertoli ve peritübüler hücreleri sperm hücre farklılaşması için gerekli destekleyici çevreyi sağlamak üzere stimule ederler. Bu hücrelerin kökeni tam olarak bilinmemektedir fakat, E11.5. günde genotipi XY olan farklılaşmamış gonadların izolasyonu ve elektron mikroskopi çalışmaları ile birlikte yapılan bazı deneyler, mezonefrozdan elde edilen hücrelerin Leydig hücre prekürsörleri içerdiğini göstermiştir (22).

Memelilerde, Leydig hücrelerinin tam olarak fonksiyonel olmaları için hücrelerin en az iki nesil aktive olmaları gerekir. Fetal tip nesil, intersitisiyal alanda testiküler kordon oluşumundan sonra görünür hale gelir ve gonad dışındaki erkek genital organlarının gelişimini sürdürmek için androjen üretiminden sorumludur. İnsanlarda, fetal Leydig hücre öncülleri, gebeliğin 8. haftasında tanınabilir hale gelirler ve erkek genital sistemin düzenlenmesi ise 13. haftada tamamlanır.

Kemirgenlere zıt olarak, insanlar, doğumdan yaklaşık iki ay sonra testosteronunun en yüksek seviyeye çıkmasına neden olan ikinci bir Leydig hücre aktivasyonuna sahiptir. Fetal Leydig hücre neslini pubertal maskülenizasyondan sorumlu olan erişkin-tip populasyon takip eder. Fetal Leydig hücrelerinin ilk farklılaşmalarını tetikleyen sinyal henüz bilinmemektedir, ancak Sertoli hücre-bağımlı parakrin bir faktörün varlığı kabul edilmektedir (23).

#### **2.2.4. Bağlayıcı Hücre Soyusu**

Bağlayıcı hücreler, erkeklerde, peritübüler miyoid hücreleri oluştururken dişilerde ise stromal hücreleri oluştururlar. Mezonefrozdan, organ düzenlenmesine katkıda bulunacağı, gelişen gonada doğru göç ettikleri düşünülse de, son yıllarda yapılan çalışmalar bu hücrelerin mezonefrozdan göç etmediğini ve büyük olasılıkla gonad mezenşiminden geliştiğini öne sürmektedir (24-26).

Peritübüler miyoid hücreler, hem kasılma hem de salgılama özelliklerine sahiptirler. Kasılmaları ısı değişimlerine ve hormonlarla uyarıma son derece duyarlıdır. Salgı ürünleri ise, P-Mod-S (peritübüler modifies Sertoli), fibronektin ve kollajen tip I'dir.

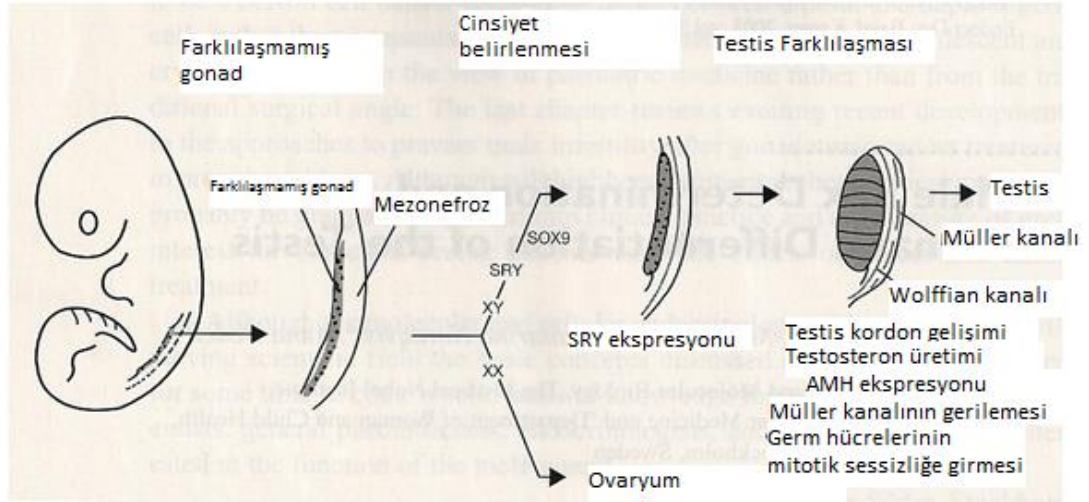
P-Mod-S, FSH tarafından uyarılır ve Sertoli hücrelerinin gelişmesi ve fonksiyonlarında önemlidir. Ayrıca testosteron sentezi, Sertoli hücrelerinin mezenşim ile etkileşimi ve Sertoli hücrelerinin sekresyonlarına etkili uyarıların iletilmesi gibi önemli fonksiyonlarının da olduğu bilinmektedir. Diğer çalışmalarda da, peritübüler hücrelerin spermatogenezde çok önemli rolleri bulunduğu vurgulanmaktadır (27).

#### **2.2.5. Germ Hücreleri**

Başlangıçta, gonad primordiyumu, germ hücrelerini içermez. Primordiyal germ hücreleri allantoyis invaginasyonunun yanında vitellüs kesesinin endoderminde yer alırlar. Farklılaşmamış gonadlara göçleri insanda gebeliğin 6. haftasında tamamlanır. PGH gelişimi, olgun sperm ya da oositi meydana getirecek şekilde gelişimsel süreçlerine devam eder (28). Farelerde, yaklaşık, 50 adet PGH popülasyonu E7-7.5. günde ekstraembriyonik mezodermin posteriyorundan primitif çizgiye kadar görülmektedir (29). Transforme edici büyüme faktörü  $\beta$  (TGF $\beta$ )'nin, PGH proliferasyonunu inhibe etmesi ve germ hücre kültüründe kemotropik etki oluşturması dolayısıyla, PGH göçünde gerekli olduğu düşünülmektedir (30). Germ hücrelerinin, her bir gonada toplam 20,000 adet germ hücresi ile sonuçlanan mitotik proliferasyonu, gonadlara giriş yaptıktan sonra 2-3 gün daha devam eder (31).

### 2.3. Erkek Cinsiyet Farklılaşması

Gonadlar, gelişen embriyoda farklılaşmamış dokudan köken alan özel organ yapılarıdır. Embriyonun genetik cinsiyeti, fertilizasyon sırasında babadan gelen X ya da Y kromozomunun kalıtımı ile belirlenir. Y kromozomu testis-belirleyici gen *Sry* aracılığıyla farklılaşmamış gonadların, testis yönünde farklılaşmasını sağlar (32, 33). Bir kere gonadlar farklılaşmaya başladığında, salgı faktörleri embriyonun ilerdeki cinsiyet gelişiminin tamamını belirler. Bu gelişimsel organizasyonun sonucu olarak, farklılaşmamış gonadları testis gelişimine yönlendiren başlangıç anahtarındaki bir bozuklukla birlikte görülen anormallikler, 46, XY bireylerde tamamlanmamış cinsiyet gelişimine neden olacaktır. Testis farklılaşması, testis kordonlarının düzenlenmesi ve Anti-Müllerian Hormon (AMH) sekresyonunun neden olduğu Müller kanallarının gerilemesi ile belirgin hale gelir. Gonad dışındaki cinsiyet karakterlerin gelişimi ise testisten üretilen testosterona bağlıdır (Şekil 2. 3).



Şekil 2. 3. Dorsal mezenterde dorsal aort ve nöral tüp tarafında bulunan farklılaşmamış gonad (18).

Gonadın önemli bir özelliği, böbrek, akciğer ya da kalp gibi diğer organlardan farklı olarak bireyin canlılığı için temel oluşturulmasıdır. Bu nedenle, gonad gelişimiyle ilişkili gen merkezlerinde mutasyon taşıyan bireyler hayatta kalır ancak; cinsiyet değişimi, genital malformasyonlar ya da infertilite gibi bazı semptomlar ortaya çıkar. Bu nedenle, cinsiyet farklılaşması için gerekli olan bazı genler insanlarla yapılan çalışmalar aracılığıyla tanımlanabilir. Ek olarak, fare gibi model organizmalarda çalışılarak, cinsiyet belirlenmesi ve testis farklılaşmasında gerekli moleküler elemanlar ve hüresel yollar hakkında bilgi kazanılmıştır.

Normal testisin düzenlenmesi için ardışık üç gelişimsel evrenin tamamlanması gerekmektedir. Şekil 2.3'de de şematize edildiği üzere; (i) Farklılaşmamış, bipotansiyel gonad belirlenir. (ii) Çok kısa bir süre için cinsiyet belirlenmesinin kritik basamağı ortaya çıkar. (iii) Son olarak, farklılaşmayı takiben farklı testiküler hücre soyları normal testis yapı ve fonksiyonunun gelişimini sağlar.

### 2.3.1. Testis Farklılaşması

İnsan gebeliğinin 7.haftasında, erkek gonadlarda çizgilenme şeklinde görülen testis kordonlarının düzenlenmesi ile başlayan testis gelişimi, farelerde E11.5 ve E12.5. günler arasındaki 24 saatlik sürece karşılık gelmektedir. Testiküler kordonlar, ilerdeki seminifer tübüllerdir ve Sertoli hücreleri ve peritübüler miyoid hücreler tarafından çevrelenen germ hücrelerinden oluşur. Seminifer kordonları ayıran mezenkim, steroid-salgilayan Leydig hücrelerine dönüşecek olan intersitisiyal hücreleri oluşturur. Bu süreç insanlarda yaklaşık 8-9 hafta sürmektedir. Sonuç olarak, germ hücreleri, fetal testiste ya da ovaryumda bulunmalarına bağlı olarak farklılaşırlar (18).

#### 2.3.1.1. Germ Hücre Gelişimi

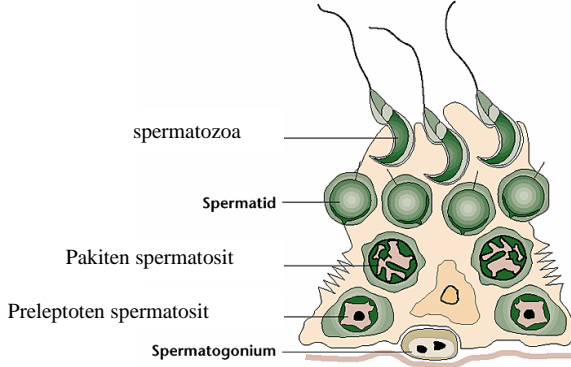
Testiküler gonositler, farklılaşmamış spermatogonyal kök hücrelerin (SKH) fetal/neonatal öncüleridir. Gonosit terimi, gelişmekte olan gonada yerleştikten sonra fetal germ hücrelerini tanımlamak için, 1957 yılında Clermont ve Perey tarafından önerilmiştir. Gonosit terimi pek çok makalede bulunmasına rağmen, bazı çalışmalarda testiküler gonositler ayrıca prespermatogonya ya da primitif germ hücreleri olarak da tanımlanır (34).

Germ hücre gelişimi sırasıyla SKH'lere ve spermatozoaya rehberlik eden iki temel evreden oluşmaktadır. Birinci evre SKH'lerin düzenlenmesine öncülük eden fetal ve neonatal dönemden başlar. Bu gelişimsel dönem germ hücrelerinin 2 temel tipini içerir. Bunlar, embriyodaki germ hücre soyunun ilk hücreleri olan primordiyal germ hücreleri ve PGH'lerinden SKH olarak bilinen tip A spermatogonyalara farklılaşan gonositlerdir. Bütün PGH'ler ve gonositler bir ya da iki nükleuslu ve yuvarlak nükleuslu belirgin bir çekirdek morfolojisi gösterirler (35). Seminifer kordonlarda oluşmakta olan lümenin merkezinde, komşu pre-Sertoli hücreleri arasında bulunurlar. Fetal dönemde testis, somatik hücrelerin proliferasyonuna bağlı olarak gelişir ve aynı zamanda proliferasyon yapan germ hücreleri (gonositler) farede gebeliğin yaklaşık E17.5'uncu gününde, proliferasyonlarını durdurarak "mitotik durgunluğa" girerler ve tekrar mitoz bölünmlere başlamak için doğuma kadar beklerler.

Doğumdan sonra (DS), yaklaşık olarak 1. günde tekrar proliferasyon yapan gonositler, postnatal 2-4. günler sırasında seminifer kordonların bazal bölümüne, pre-Sertoli hücrelerinin aralarına göç ederek farklılaşmaya başlarlar (36). Germ hücre gelişimindeki ikinci evre, çok iyi düzenlenmiş mitoz ve mayoz evreleri içeren hücre bölünmelerini ve spermiyogenez gibi spermatogonyumdan başlayan ve olgun spermatozoa oluşana kadar geçen kompleks farklılaşmaların gerçekleştiği süreci kapsayan spermatogenik hücre siklusudur (37). SKH lerin pluripotensi özelliğine sahip olanlarının, sitoplazmik köprülerle birbiriyle bağlantı kurmayan tip spermatogonyalar olduğu önerilirken, diğer tip spermatogonyal kök hücrelerin farklılaşmaya doğru yöneldiği söylenmektedir (38).

## 2.4. Sertoli Hücreleri ve Önemi

Sertoli hücreleri, seminifer tübüllerin duvarında, bazal membran üzerine oturmuş, lümeneye kadar uzanan büyük hücrelerdir (Şekil 2.4.). Düzensiz şekilli bir nükleusu, belirgin bir nükleolusu bulunur. Komşu germ hücreleri ile özel bağlantı kompleksleri oluşturur. İki Sertoli hücresi yanlara doğru yaptıkları sitoplazmik uzantılarıyla birbirlerine tutunurlar. Bu uzantıların arasında ise spermatogenetik seriye ait germ hücrelerinin etrafını kuşatarak hapsederler. Böylece germ hücrelerinin diğer çevre ortamıyla ilişkisi kesilir. Germ hücrelerinin beslenme, hormonal etkileşim gibi fonksiyonları Sertoli hücreleri aracılığıyla gerçekleşir.



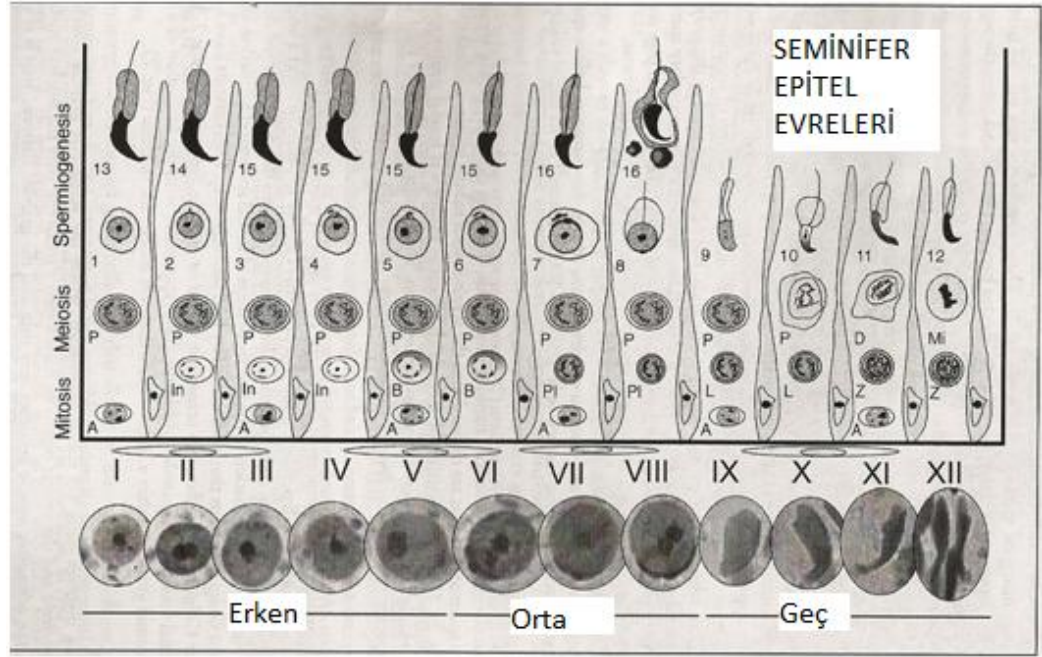
**Şekil 2.4.** Farede seminifer epitelyum boyunca görülen germ hücre dağılımı gösteren tek bir Sertoli hücresinin şematize resmi (27).

Sertoli hücrelerinin aktivitesinde iki hormon önemlidir: Folikül Stimüle Edici Hormon (FSH) ve testosteron. Bunlara ek olarak; progesteron, hidrokortizon, insülin, vitamin A ve vitamin E, epidermal büyüme faktörü (EGF) ve transferrinin de Sertoli hücrelerinin fonksiyonları üzerine etkileri olduğu gösterilmiştir. Ayrıca yukarıda tanımlanan ve peritübüler miyoid hücrelerden salgılanan P-Mod-S, komşu germ hücreleri ve östrojenin de Sertoli hücre fonksiyonları üzerinde değişik etkileri bulunabilir (27).

Spermatogonyumlar bazal membran üzerine oturmuş halde buldukları için sadece üst kutuplarından Sertoli hücrelerinin yaptıkları bağlantılarla kuşatılırlar. Ancak daha ileri evrelerde bulunan spermatozoidler ve spermatidler tüm çevreleri boyunca Sertoli hücreleri tarafından kuşatılarak tamamen dış ortamdan izole edilirler. Sertoli hücrelerinin birbirleri ile sıkı bağlantılar aracılığıyla oluşturdukları bu bariyere "kan-testis bariyeri" adı verilir. Kan-testis bariyeri, seminifer tübüllerin germ hücreleri ile dōşeli duvarını ikiye ayırmış olur: Bazal kompartman ve adluminal kompartman. Bazal kompartman içinde spermatogonyumlar ve genç spermatozoidler (leptoten, zigoten), adluminal kompartmanda ise olgun spermatozoidler (pakiten), spermatidler ve spermatozoa bulunur.

## 2.5. Farelerde Spermatogenezin Evreleri

Spermatogenez, testiste seminifer tübüllerde spermatogonyal hücrelerin belirli aralıklarda spermatozoaya dönüşümü olarak bilinmektedir. Seminifer epitelin, somatik hücrelerin etrafını çevrelediği pek çok germ hücre katmanından oluştuğu 1865'te Enrico Sertoli tarafından ilk kez tanımlanmıştır. Bu epitelin kompleks yapısının nedeni, Leblond ve Clermont tarafından her bir tübül kesitinde hücrelerin dağılımına göre epitelin evrelere ayrılması ile ortaya konmuştur (Şekil.2.5.). Bu evrelendirme türler arasında farklılık göstermekle birlikte kök hücre isimlendirmesi de aynı şekilde farklılık göstermektedir (39).



Şekil 2.5. Farede seminifer epitelium evrelendirmesi (39).

### 2.5.1. Mitoz Evresi

Spermatogonyumlar diploid germ hücreleridir ( $2n$ ), mitozla bölünürler ve bazal membran üzerinde bulunurlar. Genel olarak, spermatogonyal kök hücreleri rutin mikroskop yöntemlerle tanımlamak mümkün değildir, fakat farklı tip spermatogonyumlar tip-A, intermediate ve tip-B olarak tanınmaktadır. Fareler üzerine yapılan laboratuvar çalışmalarında, spermatogonyumların 4 farklı sınıfı olduğu belirtilmiştir: Farklılaşmamış tip-A spermatogonya [A single ( $A_s$ ), A paired ( $A_p$ ), A aligned ( $A_{al}$ )]; farklılaşmış tip-A spermatogonya ( $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$ ,  $A_4$ ); intermediate spermatogonya ( $In$ ); ve tip-B spermatogonya (37, 40).



### **2.5.2. Mayoz Evresi**

Tip-B spermatogonya mayotik profazın başladığını gösteren iki adet preloptoten spermatozite mitoz bölünmeyle farklanır. Bu hücreler bazal membrana yakın dururlar, fakat leptoten ve zigoten spermatozidler kan-testis-bariyerinden hareket ederek lümeneye doğru taşınırlar (41, 42). Preloptoten, leptoten, zigoten spermatozidler seminifer tübülün özgün evrelerinde yer alırlar ve rutin mikroskopla tanımlanabilirler. Mayoz bölünme, spermatogenezin uzun bir dönemidir ve farelerde olgun spermatozoa oluşana kadar yaklaşık 14 gün geçer. Seminifer tübüldeki germ hücre bölünmeleri, 12.evrede meydana gelen 3 bölümde incelenir: (a) mayoz I, 4n hücrelerin bölünmesi; (b) birincil spermatozidlerden daha büyük olan ikincil spermatozidler düzenlenmesi (2n); (c) mayoz II, 2n ikincil spermatozidler haploid (n) yuvarlak spermatidlere bölünmesi.

### **2.5.3. Spermiyogenez**

Seminifer tübül lümenine atılmak üzere haploid spermatidlerin uzamış ve sıkıca kondanse olgun spermatozoaya dönüşümüne “spermiyogenez” denir. Spermatidlerin farklılaşması 4 evreyi içermektedir. Bunlar; golgi evresi, kep evresi, akrozomal evre ve olgunlaşma evresi olarak bilinmektedir (39).

#### **2.5.3.1. Golgi Evresi**

Golgi aygıtı, spermiyogenezin erken basamaklarında, gelişen sperm nükleusunu saran akrozomal sistemin enzimatik bileşenlerini içeren vezikül ve granül üretimini sağlamaktadır ve akrozomun düzenlenmesi için çok önemlidir (43). Yuvarlak spermatid düzenlenmesinin ilk üç evresinin farklılaşması, Periyodik Asit Schiff (PAS) boyaması ile tanımlanan belirgin bir Golgi aygıtına ihtiyaç duyar. Birinci basamakta spermatidler, akrozomal vezikül ya da granülsüz küçük ve perinükleer Golgi bölgesine sahiptir. İkinci ve 3. basamaklarda, tek ve büyük bir akrozomal granülün düzenlenmesi ile birlikte içerisinde proakrozomal vezikül ve granül bulunan Golgi aygıtı görülmektedir.

#### **2.5.3.2. Kep Evresi**

Kep işlemi, 4. ve 5. basamaktaki yuvarlak spermatidlerde, akrozomal granülün temas ettiği nükleer membranın ve vezikülün küçük bir şapka halini almaya başladığı nükleer yüzeyde meydana gelir. Altıncı ve 7. basamakta akrozomal vezikül çok incilir ve granül düzleşir. Basamak 8’de son yuvarlak spermatid ve akrozom nükleus yüzeyinin yaklaşık 1/3’ü kadar düzleşir ve hücre nükleusları şekillerini değiştirmeye başlarlar.

### 2.5.3.3. Akrozomal Evre

Akrozomal basamaklar 9-14, akrozomal sistemin uzayan spermatid nükleusunun ventral yüzeyden göçünü içermektedir. Akrozomun bu göçünü, farklı açılarda ya da yönelmede olduğu için histolojik kesitlerde tanımlamak oldukça zordur. Bu nedenle spermatogenezin özgün evrelerinin tanımlanması, uzayan spermatidler yerine yuvarlak spermatidlerde gözlenen akrozomal sisteme bağlı olarak gerçekleştirilir. Bu spermatid basamakları, aynı zamanda kromatinin kondenzasyonunu da içermektedir. Fazın sonunda, akrozom, çekirdeğin üst 1/3'lük kısmını örter ve sarmaya devam eder ve bu sırada manşet gelişir (40).

### 2.5.3.4. Olgunlaşma Evresi

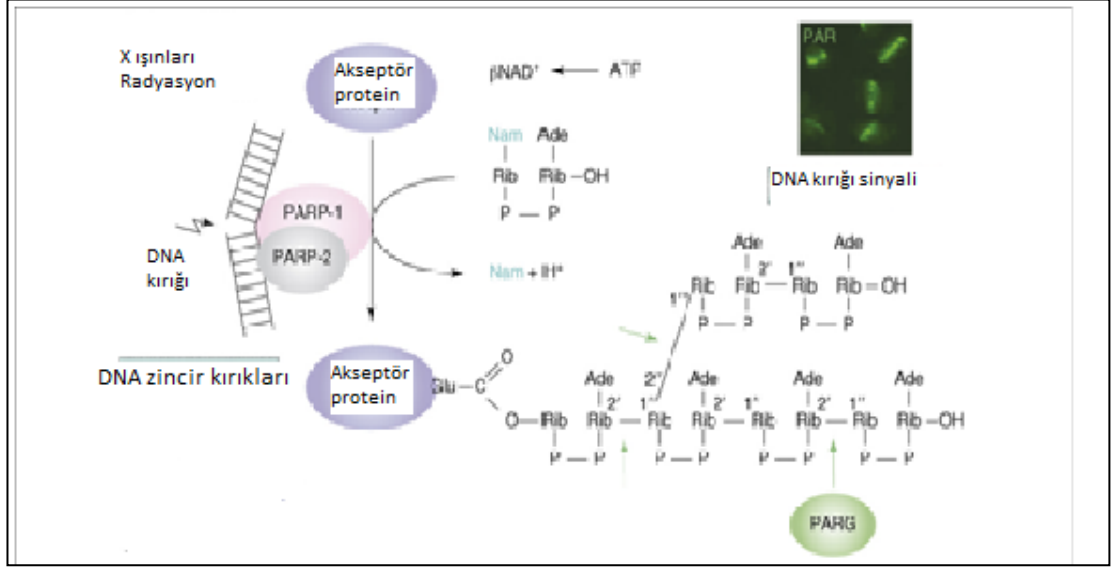
Olgunlaşma basamaklarından 15-16, seminifer tübülün III-VIII evreleri boyunca devam eder, nükleus şeklinde ve akrozomal göçte küçük değişiklikler gösterir. Nükleus kondense olmaya devam eder ve akrozom ince ve PAS pozitif yapısına doğru olgunlaşır. Spermatozoanın fazla sitoplazması, VII-VIII. evrelerde atılır. Sertoli tarafından fagosite edilen bu sitoplazmik loblar, mitokondri, ribozom, lipidler, veziküller ve diğer sitoplazmik elemanları içermektedir. Evre sonunda manşet dağılır, çekirdekdeki kromatin yoğunlaşır, kromatini paketleyen somatik histonlar arjinin- ve lizin-zengin ve sperme özgün olan protaminlerle yer değiştirirler (40).

## 2.6. Poli ADP Ribozilasyon Mekanizması

Poli ADP ribozilasyon, proteinlerin tekrar eden AdenozinDi Fosfat (ADP) riboz ünitelerinin homopolimerik zincirleri ile Poli ADP-riboz Polimeraz (PARP) enzimleri tarafından yönetilen hızlı ve süreksiz post-translasyonel modifikasyonudur. Bu modifikasyon Poli ADP-Riboz Glikohidrolaz (PARG) tarafından yıkılan ADP riboz polimerlerinin kısa yarı ömürlerinin gösterdiği üzere, dinamik bir süreçtir (44) .

Poli ADP ribozilasyonun biyolojik fonksiyonlarından bazıları şöyledir: (a) DNA tamiri ve genomik stabilitenin korunması; (b) transkripsiyonun düzenlenmesi; apoptozdaki rolü, hücre içi aşırı NAD<sup>+</sup> tüketimi sonucunda nekrotik hücre ölümü ve patolojik durumlardaki rolü; (c) sentromer fonksiyonlarının düzenlenmesi; (d) telomer uzunluğunun düzenlenmesi; (e) protein degradasyonunun düzenlenmesi; (f) sentrozomal fonksiyon; (g) endozomal vezikül alışverişinin düzenlenmesi şeklindedir (45).

PARP enzimleri PARP imza motifi olan ve korunmuş katalitik domeyn paylaşan 18 üyelik PARP süper ailesini oluşturur (44, 46, 47). Bu üyeler arasında PARP-1 (113kDa), keşfedilen ilk PARP ailesi üyesidir. PARP-2 (62 kDa) ikinci olarak tanımlanan PARP' dır. PARP-1'den daha az aktiftir. DNA hasarına cevapta total PARP aktivitesinin %5-10 una katılır (Şekil 2.6.).



Şekil.2.6. DNA zincir kırıkları ile aktive olan Poli ADP ribozilasyon (48).

Biyokimyasal ve genetik çalışmalar, PARP-1 ve PARP-2 enzimlerinin DNA hasarına karşı hücrel cevapta paylaştıkları anahtar rolleri hakkında güçlü destek sağlamaktadır. Her iki protein de heterodimer yapıdadır, bazı ortak nükleer bağlayıcı proteinleri paylaşırlar ve DNA tek zincir kırıklarının tamiri/baz eksizyon tamiri (SSBR-BER) süreçlerinde yardımcı oldukları açıklanmıştır (48, 49). PARP-1 ve PARP-2 genleri silinmiş olan fareler canlı değildirler; gastrulasyonun başlangıcında ölürlür, bu durum poli ADP-ribozilasyon mekanizmasının embriyonik gelişimde oldukça kritik bir rolü olduğunu göstermektedir. Ancak, PARP-1 ve PARP-2'nin DNA'da ve proteinlerde tanımlanmaya başlanan spesifik rolleri olabileceğini de düşündürmektedir.

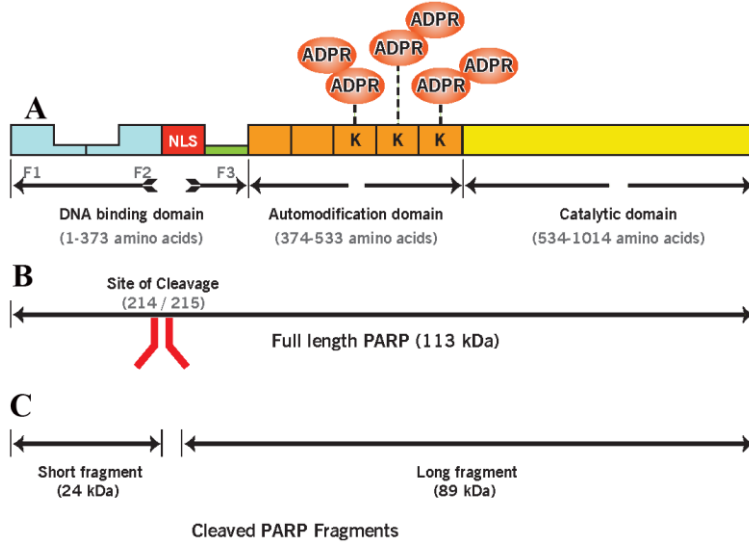
## 2.7. PARP Ailesi

Poli ADP riboz polimeraz aktivitesi taşıyan 18 farklı PARP homologu bulunmuştur (46). PARP ailesi, "PARP imzası" olarak isimlendirilen ve 50 aminoasit rezidüsünden oluşan korunmuş katalitik domeyne sahip 18 adet homolog içermektedir(46). Bu bölge, eklenen PAR zincirlerinin başladığı, uzadığı ve dallandığı bölgedir (50). PARP ailesi üyeleri ayrıca; DNA bağlayıcı domeyn, makro domeynler, Breast Cancer-1 C-Terminal (BRCA-1 C-T) domeyni ve ankyrin tekrar eden domeynlere sahip olabilirler. Bu domeyn tiplerinin özelliğine göre, her bir aile üyesinin özel fonksiyonları ortaya çıkmaktadır (44, 46, 51).

PARP ailesinin tüm üyelerinin yapı ve fonksiyonlarını anlamak için yapılan çalışmalar olsa da, araştırmalar esasen PARP-1 enzimi üzerine yoğunlaşmaktadır. PARP-2, PARP-3, PARP-4 (vPARP), PARP-5a (tankiraz-1) ve PARP-5b (tankiraz-2) gibi diğer PARP enzimleriyle ilgili çalışmalara kıyasla en çok çalışılan protein olan PARP-1 enziminin birçok dokudaki varlığı kanıtlanarak, poli ADP-ribozilasyon mekanizmasının %90'ını yürüttüğü bilinmektedir (45).

### 2.7.1. PARP-1

PARP-1, evrimsel olarak yüksek oranda korunmuş nükleer bir proteindir. Yapısında A'dan F'ye modül olarak ayrılabilen karakteristik 3 domeyn taşımaktadır (Şekil 2.7.1.). Bu bölgeler; N terminal ucunda yer alan 42 kDa'luk "DNA bağlayıcı domeyni", merkezde bulunan 16 kDa'luk "Otomodifikasyon domeyni" ve C terminal ucunda yer alan 55 kDa'luk "Katalitik domeyni"dir (45).



Şekil 2.7.1. PARP-1 proteinin yapısı

A) PARP' in yapısal domeynleri, B) Caspase-3 yarıklanma bölgesi . C) Yarıkılan kısa ve uzun PARP fragmanları (45).

PARP-1'in DNA bağlayıcı domeyni, yapısında bulunan 2 çinko parmak yapısı sayesinde tekli ya da çiftli DNA zincir kırıklarına yüksek afinite göstererek bağlanmaktadır (52). İlk çinko parmak yapısı, PARP-1'in DNA zincir kırıkları tarafından aktivasyonu için gereklidir, ancak ikincisi PARP-1'in tekli DNA zincir kırıkları tarafından aktivasyonu için gerekli iken, DNA çift zincir kırıklarında gerekli değildir. DNA kırıklarının olmadığı durumlarda PARP-1, bazal düzeyde, düşük enzim aktivitesi göstermektedir.

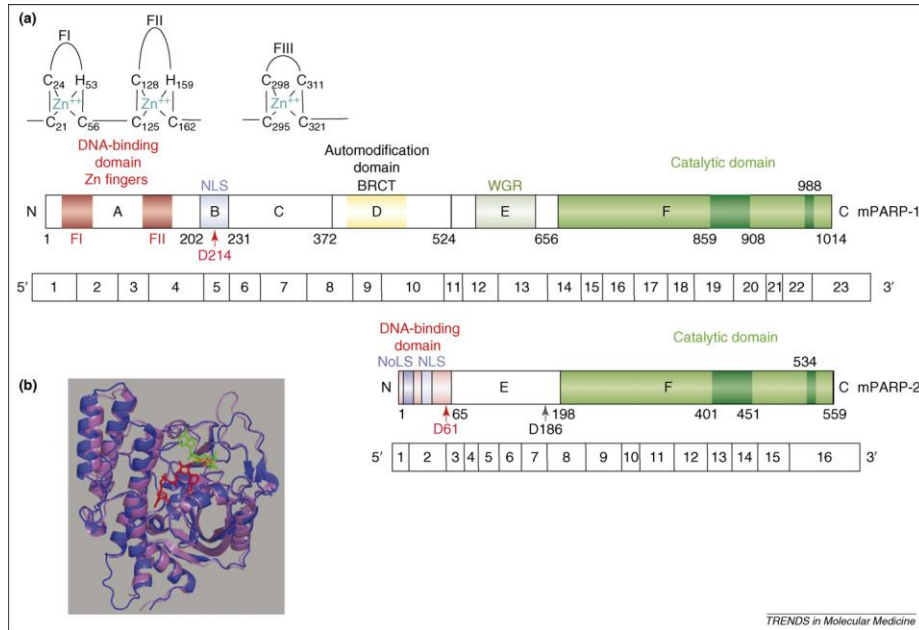
PARP-1'in otomodifikasyon domeyni "glutamik asit rezidüleri"nce zengindir. Bu rezidüler poli ADP-ribozilasyonun gerçekleştiği esas yerlerdir. Ayrıca bu domeyn, DNA hasar tamiri ve hücre siklusu kontrol noktası proteinlerinin bir çoğunda bulunan BRCA1 motifini de içermektedir.

55 kDa'luk C-terminal katalitik domeyn,  $\text{NAD}^+$  bağlanma, ADP-ribozil transferi ve dallanma reaksiyonları için gerekli rezidüleri içermektedir. C-terminal katalitik fragmentinin kristal yapısı, mono ADP-ribozil transferazlar olarak görev yapan bakteriyel toksinlerle şaşırtıcı bir homoloji göstermektedir (45).

PARP-1 ekspre olduğunda; iyonize radyasyon, alkile ajanlar ve oksidanlar tarafından indüklenen DNA hasarına karşı en uygun ve etkili hücrel yanıt olan poli ADP ribozilasyonu gerçekleştirmektedir. PARP-1'in etkileşimde bulunduğu bazı ortakları arasında, PARP-2 ve PARP-3 gibi PARP ailesinin diğer üyeleri de bulunabilmektedir (46).

### 2.7.2. PARP-2

PARP-2, PARP-1 geni silinmiş fare embriyonik fibroblastlarda DNA kırıklarıyla ortaya çıkan PARP aktivitesinin varlığı sonucu keşfedilmiştir (46). PARP-2 geni insanda 14q11.2 pozisyonunda lokalize olurken farede 14 Cl'de lokalizedir (53, 54). PARP-2, N-terminal domeyninde, oldukça bazik bir DNA-bağlayıcı domeyni ve nükleer lokalizasyon sinyali (NoLS) içerir. Ayrıca PARP-2'de PARP-1 gibi  $\text{NAD}^+$  bağlayıcı katalitik bir domeyne C terminalinde bulundurur (Şekil.2.6.2.)



### 2.7.2.1. Genom Bütünlüğü Korunması PARP-1 ve PARP-2

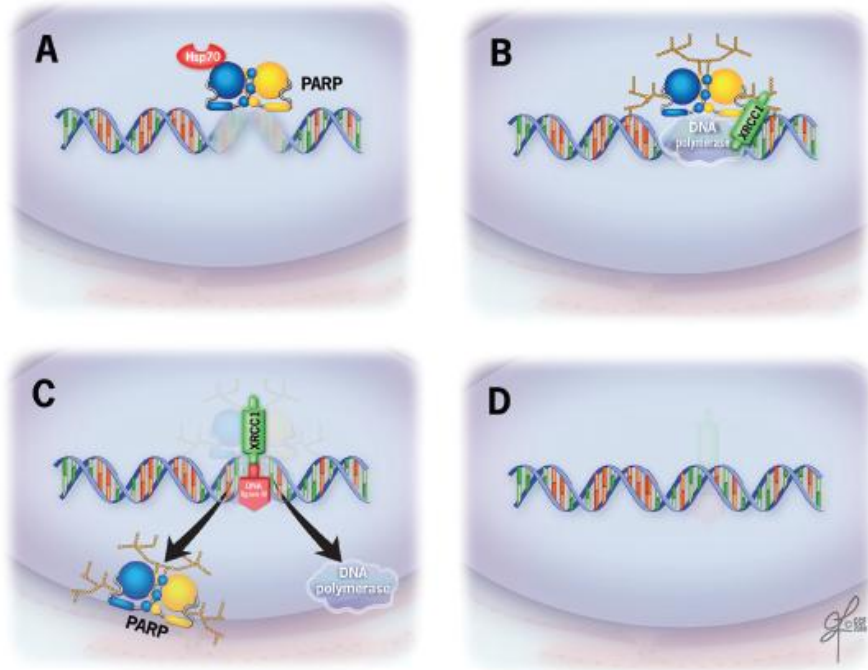
PARP-2'nin DNA bağlanma domeyni, PARP-1'dekinden farklıdır. Bu farklılıkları üyük olasılıkla DNA yapısını tanıdığı farklı enzimlerle yansıtmaktadırlar (55, 56). Bu nedenle, PARP-1'e zıt olarak PARP-2 tek zincir kırıklarına bağlanırken, aralıkları ve flep yapılarını daha hızlı tanımaktadır (57). PARP-2'nin Caspase-3 yarıklanma bölgesi DNRD sekansında bulunur ve DNA bağlanma bölgesi ile Domain E arasındaki sınırı belirler. PARP-1'in E domeynine homologtur (52). PARP-2 domeyn E aracılığı ile pek çok protein ile etkileşim kurar ve otomodifikasyon domeyni gibi iş görür.

PARP-1 ve PARP-2 katalitik domeynleri %69 benzerlik gösterir (55). Ancak, PARP-2 katalitik domeyninde PARP-1'den farklı olarak bulunan 3 adet aminoasit eklentisi vardır (58). Bu eklenti, PARP-2 duyarlı inhibitörlerin tasarlanması için mümkün iskelet sağlamaktadır (59).

PARP-2 geni silinmiş fareler, PARP-1 geni silinmiş farelerle benzerdir. İyonize radyasyon ve alkali ajanlara duyarlılık gösterirler. Bu duyarlılık farklı ölçülerde olmasına rağmen, hücre canlılığı ve genomik bütünlüğü ile ilgili olası spesifik fonksiyonlarını yansıtmaktadır. Dolayısıyla, PARP-1 ve PARP-2 nin koruyucu rolünü destekler. Genom bütünlüğünü korumak, her bir hücrenin temel ve devam eden mücadelesini gerektirir. Genomik dayanıksızlık, bir çok kanserin ayrıcı özelliğidir ve DNA hasarına karşı DNA replikasyonunda bir defekt ya da kromozom ayrımında ve telomerlerin kaybolduğu durumlarda defektli cevabı kapsar (60).

PARP-1 ve PARP-2, DNA kırıklarının moleküler sensörü olarak değerlendirilirler. Çünkü esasen tekli DNA zincir kırık tamiri (SSBR) ya da Baz eksizyon tamiri (BER) yolları tarafından tamir edilen, sırasıyla; şeker-fosfat omurgası ya da dayanak noktası hasarının direkt yarıklanmasından kaynaklanan DNA kırıklarının varlığı ile stimüle olurlar (44).

Aynı PARP-1 gibi PARP-2, SSBR/BER faktörlerinin çoğunu stimüle eden, karşılıklı etkileşime giren, önemli iskele proteini olan XRCC1'e (X-ray repair cross-complementing I) domain E aracılığı ile bağlanır. Bütün PARP'lar, diğer SSBR/BER faktörleri olan DNA polimeraz beta, DNA Ligase III ile etkileşime girerler. Ek olarak PARP-1 ve PARP-2, in vitro olarak birbirlerini homo- ve heterodimerize ve Poli(ADP-riboz)ile ederler (48). Ancak PARP-1 ve PARP-2 lazer indüklü DNA hasar bölgelerinde farklı sürelerde ve hızda birikme gösterirler. PARP-1 hızlı ve süreksiz toplanırken, PARP-2 gecikmeli ve sürekli olarak toplanır (61). PARP-2 birikimi, PARP-1'in aktivitesine dayanmaktadır. XRCC1'in hasar bölgesinde bulunmasının PARP-1 aktivitesine bağımlı olduğu fakat PARP-2'ye bağımlı olmadığını göstermektedir (62-64) (Şekil 2.6.2.1.).



Şekil 2.7.2.1. DNA hasar/tamir mekanizmasında PARP etkileşimi (62).

### 2.7.2.2. PARP-2 ve Erkek Germ Hücre Farklılaşması

PARP-1 ve PARP-2'nin seminifer epitelde doku dağılımının karşılaştırılması analizi her iki genin farklı ekspresyon modellerini göstermektedir (48). Erişkin testis dokusunda, PARP-1 ekspresyonu proliferen olan spermatogonyaları içeren periferik hücre tabakasında sınırlanırken PARP-2 ekspresyonu homojen olarak tüm seminifer tübül boyunca dağılmıştır. Spermatogenezin farklı basamaklarında meydana gelen anormal hücre bölünmelerine, spermiyogenezin normalden geç başlamasına ve hipofertiliteye neden olan PARP-2 eksikliğinin, PARP-2'nin hem mayoz I hem de haploid gen farklılaşmasında rolü olabileceği *in vivo* olarak ispatlanmıştır (16). PARP-1 geni silinmiş farelerde erkek fertilitesinde bozulma tespit edilmemiştir. Buna karşılık, PARP-2 geni silinmiş fareler;

- 1- X- ve Y- bağılı genlerin upregülasyonu ve anormal histon modifikasyonu ile ilişkili hatalı mayotik cinsiyet kromozom inaktivasyonu,
- 2- Geciken nükleer uzama ile karakterize bozuk spermiyogenez gösterirler (16).

### 2.7.3.1. Poli ADP-Riboz Glikohidrolaz (PARG) ve PARP Etkileşimi

PARG, PAR metabolizmasında gerekli olan bir enzimdir. PARP'lar tarafından üretilen PARG, PAR birimlerini eklendiği proteinlerden uzaklaştırır ve bu nedenle hücre fonksiyonunda PARP ile eşit derecede önemlidir. PARP'ın nükleusta bulunmasına karşılık PARG, sitoplazmada bulunur, aynı zamanda nükleus ve sitoplazma arasında, PAR'ı yıkmak için geçiş yapabilmektedir (65). PARG geni silinmiş fareler, Poli (ADP-riboz)ilasyonun hücrelerinde birikmesi nedeni ile ölür çünkü bu sırada enerji tükenmektedir (66).

Spesifik olarak, PARG, PAR'ın kaldırılması ile kromatin yapısını korur ve PARP'ın tersi gibi davranarak kromatini orijinal durumuna döndürür. Poli ADP ribozilasyonun kromatin yeniden modellenmesi basamaklarında rolü olduğu, sıçan spermiyogenezinde yapılan bir çalışmayla gösterilmiştir (13). Bu çalışmaya göre, farklılaşan spermatidlerin kromatinlerinin yeniden modellenmesi esnasında yüksek sıklıkta DNA zincir kırıkları oluştuğu ve bu kırıkların spermiyogenez basamaklarında, özellikle histon-protamin değişiminin gerçekleştiği uzayan spermatid aşamasında olduğu belirlenmiştir (67).

Bu çalışmada, spermatogenez sırasında yüksek sıklıkta DNA zincir kırıkları oluştuğu ve buna karşılık yüksek oranda PAR polimeri üretildiği gösterilmiştir. Bu sonuçlar, poli-ADP-ribozilasyonun mayoz bölünme esnasında kromatin yeniden modellenmesine ek olarak; spermatidin nükleer kondenzasyonunu da kapsadığını göstermiştir. Bu süreçlerde, infertilitede önemli rolü olduğu öne sürülen sperm kromatin bütünlüğünün sağlanmasında PARP proteinlerinin önemi ortaya konmuştur. PARG bunu, PARP gruplarını histonlardan çıkartarak ve bir kere daha histonları kromatinin nükleozom yapısını düzenlemesine izin vererek yapar (68).



Poli ADP-riboz glikohidrolaz, hücre ölümü ile sonuçlanabilen PAR birikimi nedeniyle oluşan DNA hasarına cevapta PAR sentezinin miktarını düzenleyerek DNA tamirine katılır (69). PARG ve PARP, kromatin yapısını modifiye etmek için birbirlerine zıt çalışırlar. PARP, kromatinin aktif bölgelerini transkripsiyonel olarak oluştururken, PARG, kromatini orijinal durumuna yeniden getirmektedir (70, 71).

## **2.8. PARP Aktivasyonu**

DNA hasarına karşı, PARP-1'in aktive olduğu net olarak belirlenmesine rağmen, diğer PARP'ların aktivasyonu için gerekli mekanizma hala bilinmemektedir. PARG'nin hücrel glikohidrolaz aktivitesinden dolayı, PARP aktivasyonunun ve ardından oluşan poli ADP ribozilasyonun çok kısa bir zaman aralığında gerçekleştiği düşünülmektedir. DNA hasarı ile uyarılan poli ADP-ribozilasyon mekanizması ve ardından gerçekleşen PARG yarıklanması yaklaşık 10 dakika sürmektedir.

PARG tek bir gen tarafından sentezlenmektedir ancak, çoklu gen ürünlerinin olup olmadığı veya farklı PARP'lara ortaklık eden PARG izoformlarının olup olmadığı bilinmemektedir. PARG, farklı PARP'lar tarafından poli ADP ribozil proteinleri eklenen proteinlerin hidrolizini katalizleyebilmektedir (45, 46, 72).

### **2.8.1. DNA Tamiri ve Genomik Stabilitenin Korunması**

Prolifere olan hücrelerde; alkilasyon, oksidasyon ve iyonize radyasyon tarafından meydana gelen DNA hasarı ile indüklenen poli ADP ribozilasyon, hücreleri sitotoksik etkiden kurtararak yaşamalarını sağlar. PARP-1 ve onunla ilişkili proteinlerden PARP-2, DNA hasarına yanıt veren PARP ailesi üyelerindedir ve DNA tamiri ve genomik bütünlüğün korunmasında önemli rol oynayarak canlılığının korunmasını sağlamaktadır. PARP-1 ve PARP-2'nin özellikle BER yolağında önemli rolü olduğu gösterilmiştir. Son yıllarda, birçok grup tarafından mekanizmanın nasıl işlediği konusunda ilgi çekici senaryolar geliştirilmiştir. Bunlar;

- a) DNA hasar bölgesindeki kromatinin lokalize olarak gevşemesi, histonların hem doğrudan modifikasyonu hem de non-kovalent etkileşimini yönlendirmektedir,
- b) Hasarı sinyalle ileten fonksiyonu bulunmaktadır,
- c) Hasarlı bölgeye, poli ADP-riboz ile non-kovalent etkileşim sonucunda özgün DNA tamir mekanizmalarının toplanmasıdır (73).

Yapılan son çalışmalar bazı yeni ve ilgi çekici görüşler de ortaya çıkarmıştır. PARP-1, DNA tamiri ve genomik stabilitenin korunması ve prematür yaşlanmadan sorumlu protein olan Werner Sendromu proteininin etkileşim ortağı olarak bilinmektedir. Son zamanlarda, PARP-1'in Werner Sendromu proteininin hem ekzonükleaz hem de helikaz aktivitesini düzenlediği gösterilmiş ve PARP-1 etkisindeki olası mekanizma ortaya konmuştur (74).

Ekzojen kaynaklı herhangi bir DNA hasarının olmadığı durumda, poli ADP ribozilasyonun farklı bir rolü olduğu ortaya çıkmıştır. Testiste, spermiyogenez sırasında spermatid farklılaşması, kromatin yoğunluğu ve bileşimindeki çarpıcı değişikliklerde ki Parlasyonun rolü buna örnektir. Spermatid nükleusunun kondenzasyonu, önemli nükleer proteinlerden olan histon-geçiş proteini-protamin değişimi ile karakterizedir. Sperm hücresinin matürasyon basamaklarındaki kromatin yeniden modellenmesi sırasında ortaya çıkan endojen DNA zincir kırıklarının tamirini ADP riboz polimerleri kolaylaştırmaktadır (45, 75).

### **2.8.2. Sentromer Fonksiyonu**

Temel ve geçiş sentromer proteinlerinin her ikisi de PARP-1 ve PARP-2 ile etkileşmekte ve poli ADP ribozilasyonu devam ettirmektedir (52). Dolayısıyla, poli ADP-ribozilasyonun temel kinetokor proteinler için düzenleyici olarak görev yaptığı düşünülmektedir. PARP-2 lokalizasyonu sentromerde göze çarparken, PARP-1 geniş sentromerik ve perisentromerik dağılım göstermektedir (76). Yapılan çalışmalarda, radyasyon indüklü DNA hasarı sırasında memeli sentromerinin yapısını ve kontrol noktası proteinlerinin fonksiyonlarını düzenleyen moleküller olarak PARP-1 ve PARP-2'nin ayrı ayrı rolleri ortaya konmuştur. Ayrıca, mikrotübüller ve mikrotübül ilişkili proteinleri içeren önemli iğ bileşenlerine ek olarak, iğ için yeni bir bileşeni olarak poli ADP riboz tanımlanmıştır (52). PAR'ın varlığı, bipolar iğ oluşumu ve fonksiyonu için gereklidir (45).

### **2.8.3. PARP-2 ve Telomer Uzunluğu**

PARP-2 'nin telomer bütünlüğündeki gerekliliği; PARP-2'nin telomerik tekrar bağlayıcı faktör 2 (TRF2) ile fiziksel ve fonksiyonel etkileşiminin tanımlaması ile kanıtlanmıştır. PARP-2 hem TRF2'nin heteromodifikasyonunu hem de poli ADP-ribozun TRF2'nin DNA bağlayıcı bölgesine bağlanmasıyla TRF2'nin DNA bağlayıcı aktivitesini düzenler. Bu nedenle PARP-2 geni silinmiş fare embriyonik fibroblastları normal telomer uzunluğu ve telomer kaplaması gösterirken, ilmek sıklığında spontan artış vardır (77). PARP-2, telomer bütünlüğünün ek merkezi elemanıdır. Oysa diğer iki PARP aile üyesi tankyrase 1 ve 2'nin, telomer homeostazında gerekli olan diğer bir telomerik faktörü (TRF1) hedeflediği gösterilmiştir (78). PARP-1, telomer metabolizmasında major spontan rol göstermesine rağmen, TRF2'nin, DNA hasarına cevapta DNA bağlanma aktivitesini kontrol eder (79).

#### **2.8.4. Sentrozomal Fonksiyon**

Mitotik bölünmeler sırasında sentrozom fonksiyonunun doğru bir şekilde gerçekleşmesi, kardeş hücrelere kromozomların tam ve doğru şekilde aktarılmasında oldukça önemlidir. Hem PARP-1 hem de PARP-3'ün sentrozomlarda stabil bir yapı oluşturdukları belirlenmiştir (80). Sentrozomlarda lokalize olan ve sentrozom duplikasyonunu kontrol ettiği bilinen p53'ün PARP proteinleri tarafından poli ADP ribozillendiği gösterilmiştir (81). Böylece hem PARP-1 hem de PARP-3'ün, poli ADP ribozilasyon mekanizması ile p53 aktivitesini regüle ederek sentrozom duplikasyonunda önemli rolleri olduğu gösterilmiştir (82).

#### **2.8.4. PARP ve Apoptoz**

PARP-1'in nükleer lokalizasyon sinyalleri (NLS) içeren domeyninden, Caspase-3 ve Caspase-7 tarafından yarıklanması sonucunda, 24 ve 89 kDa'luk iki adet fragment oluşturmaktadır ve bu nedenle yarıklanmış PARP (cPARP) apoptozun biyokimyasal bir belirteci olarak sıklıkla kullanılmaktadır. DNA zincir kırıkları varlığında Caspase ilişkili PARP-1 yarıklanmasının, PARP-1'in katalitik aktivitesinin kaybına neden olduğu düşünülmektedir. Apoptozun erken evrelerinde gözlenen aşırı PAR oluşumu, PARP ailesi proteinlerinin bu süreçte görevli olduğunu göstermektedir. Ayrıca PARP-1 aktivasyonu, apoptoz indükleyici faktörün (AIF) mitokondriden nükleusa translokasyonundan sorumludur ve AIF, PARP-1 bağımlı hücre ölümünde gereklidir. Bilindiği gibi, AIF tarafından indüklenen apoptotik yolak Caspase bağımsızdır. Dolayısıyla PARP-1 aktivasyonu; hem Caspase bağımlı hem de AIF-indüklü Caspase bağımsız apoptotik yollarda rol oynayabilir (83).

#### **2.9. Erkek Gametlerde PARP aktivasyonunun rolü**

Spermatogenezi farklı evrelerde etkileyebilen çeşitli çevresel, davranışsal ve genetik faktörlerden erkek fertilitesi etkilenmektedir (84-86). Erkek germ hücreleri endojen ve ekzojen gonotoksik ajanların geniş çeşitliliğine maruz kalmaktadır. Endojen ajanlar, metabolik aktiviteler sırasında oluşan reaktif oksijen ve nitrojen türlerini içerir (87, 88). Ekzojen ajanlar, genomik DNA'yı hasara uğratan çeşitli çevresel faktörlerdir. Bu gonotoksik ajanlar, DNA tek zinciri ve çift zinciri düzenindeki DNA lezyonları olan, abazik bölgeleri, baz hasarını, inter- ve intra-zincir çapraz zincirleri ve DNA-protein çapraz bağlarını tanırlar (89, 90). İnsan spermatozoasında, abortif apoptoz, anormal kromatin paketlenmesi, reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve Sertoli hücrelerinden olgunlaşmadan ayrılma nedeni ile DNA hasarı oluşur (91-95).

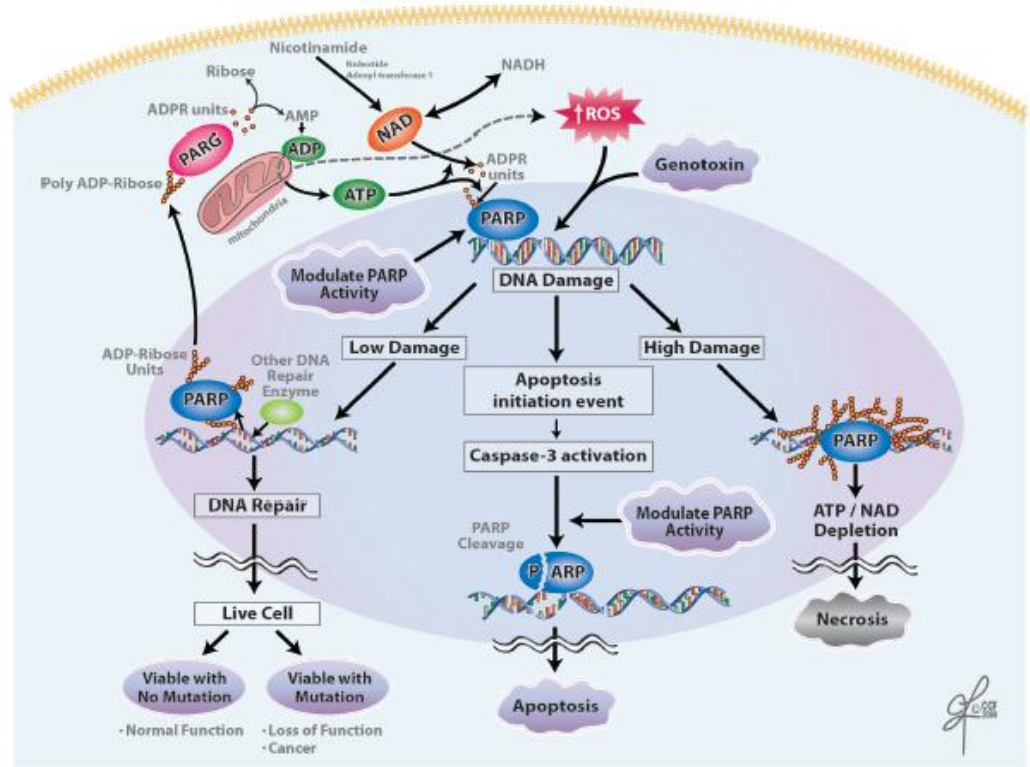
Spermatogenez sırasında, nükleustaki germ hücre DNA'sı, sperm baş bölgesinde paketlenildiği zaman oluşan torsiyonel stresin engellenmesi için topoizomerazlar tarafından yakalanmaktadır. DNA zincir kırıklarının farklı spermatogenez evreleri sırasında ki sürekliliği, olgun spermatozoda DNA hasarının gözlenmesine neden olur (96, 97).

Spermatogenezde, birinci mayoz bölünmenin profaz aşamasında DNA çift zincir kırıkları meydana gelmektedir. Oluşan bu kırıklar, genetik farklılığı ve kromozom ayrışmasını doğru gerçekleştirmek üzere tamir edilmektedir. Diğer bir yandan, farklılaşan spermatidlerde kromatinin sıkı paketlenmesi sırasında DNA kırıkları ortaya çıkmaktadır. Dolayısıyla, PARP-1'in ve PAR polimerinin; kalıcı ve devamlı ekspresyonu ve erkek germ hücrelerindeki lokalizasyonu, insan germ hücre farklılaşmasında poli-ADP-ribozilasyon için anahtar rolü oynamaktadır. PARP-1 ve PARP-2 enzimleri post-mayotik hücrelerde ekspresyonlarını kaybeder ve PARP-1 geni spermde kapanır (11, 12, 98).

### **2.9.2. PARP' in Germ Hücre Ölümündeki Rolü**

Apoptoz, spermatogenezin tamamlayıcı bir parçasıdır. Anormal spermatozoayı elimine etmek ve olgun spermatozoa üretmek amacıyla için apoptoz spermatogenezin tüm evrelerinde spontan olarak düzenlenmektedir. Hatta spermatogenez sırasında pek çok spermatozoa ölür ve elimine edilir. Bu durumun Sertoli hücrelerinin koruyacağı germ hücre sayısını sınırlandırdığından dolayı olabileceği ve sayıca artan germ hücrelerin bu kapasite dolayısıyla elendiği ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Apoptoz bu hücreleri yok etmek için ve hücre kontrol noktalarından geçmesi engellemek için gerçekleşiyor olabilir (99). Daha da önemlisi, yavruya geçebilecek genetik anormallikleri engellemek için apoptoza gerek duyuluyor olabilir (100). Codelia ve arkadaşları, pubertal sıçan spermatogenezinde hangi apoptoz yolağının gerekli olduğunu incelemişlerdir. Caspase-8 inhibitörü kullanarak, PARP'in yarıklanmasının anahtar rol olduğunu ve germ hücre apoptozunun Fas-antijen(Fas)-Fas ligand aracılığı ile gerçekleştiğini destekleyen az miktarda cleaved PARP gözlenirken, apoptotik germ hücrelerinde de azalma tespit etmişlerdir (101).

Apoptoz sırasında, pek çok DNA zincir kırığı PARP aktivasyonuna neden olmaktadır. PARP'in bu aktivasyonlarının, nükleaz aktivasyonu nedeniyle oluşan DNA hasarını tamir etmek isteyen ölmekte olan hücreler tarafından tetiklendiği düşünülmektedir (102-104). Ancak, bu tetikleminin DNA hasarı tamiri için olduğu düşüncesi yararsızdır çünkü PARP, caspase-3 tarafından 89 kDa'nun katalitik parçasına ve 24 kDa 'nun DNA bağlayıcı bölgesine yarıklanır (75, 105). Bu nedenle, PARP' in bu yarıklanmış şekli caspase-bağımlı apoptozun biyokimyasal şartleyicisi olabilir (106, 107) (Şekil 2.9.2.).



**Şekil 2.9.2.** PARP'nin ROS, gonotoksin ya da PARP hedefleri nedeni ile oluşan DNA hasarı sonucu gerçekleşen hücre ölümündeki olası rolleri:

Eğer yüksek hasar meydana gelirse, PARP over-aktif olur, ATP/NAD azalması ve nekroz görülür. Caspase-3 aktivasyonu ve PARP yarıklanması ile apoptoz görülür. Eğer düşük hasar meydana gelirse PARP diğer tamir enzimlerini toplar ve DNA tamiri gerçekleşir. Her bir ok bir ya da daha fazla reaksiyonu temsil ediyor (109).

### 2.9.1. PARP ve Spermatogenez

İnsanda testis belirleyici faktörün (TDF), diğer memelilerde ise testis belirleyici Y lokusunun (*Tdy*) en önemli anahtar düzenleyicisi olan SRY/*Sry* (*Sex-determining region Y*), embriyolojik gelişim sürecinde testis oluşumu ve farklılaşmasından sorumludur (108). SRY/*Sry*, aynı zamanda diğer cinsiyet belirleyici proteinlerle ya da kofaktörlerle etkileşimde bulunan transkripsiyonel düzenleyici komplekslerini oluşturmaktadır. Ayrıca, biyolojik fonksiyonları da düzenleyen bu kompleksler otozomal ve/veya X kromozomu üzerindeki genler tarafından kodlanırlar (109, 110). Günümüzde SRY/*Sry*'nin TDF'yi hangi moleküler mekanizmalarla düzenlediği bilinmemektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, birçok transkripsiyonel fonksiyonu düzenleme yetisi bulunan SRY/*Sry*'nin regüle ettiği proteinleri keşfetmek yönündedir.

PARP-1, erişkin farelerde seminifer tübüllerinin bazalindeki hücrelerde yüksek seviyelerde ekspresyon gösterir fakat PARP-1'in mayozun haploid evresinde susmasından dolayı seminifer tübüllerin luminal bölgesinde ekspresyonu yoktur (49). Bu durum, PARP-1'in spermatogenezin erken evrelerinde ekspre olduğunu açıklamaktadır. Farklılaşan germ hücrelerinde PARP-1 seviyelerinde ve aktivitesinde ki bu düşüşün, spermatogenezle ilgili kromatin yapısındaki değişiklikler nedeni ile olabileceği düşünülmektedir. Spermatogenezin kromatin yeniden modellenmesi;

histonların protaminlerle yer değiştirmesini ve DNA' nın sarmal oluşumuna geemesini (sıkıca paketlenmesini) içerir (111, 112).

İnsan testis örnekleri kullanılarak yapılan son çalışmalarda, PARP-1'in spermatogonyumlarda belirgin ekspresyonu gösterilmiştir. Poli ADP-riboz'un varlığı spermatogenezin evrelerinde PARP-1'e göre biraz farklıdır. Poli (ADP-riboz) ilasyon insan yuvarlak ve uzayan spermatidlerinde primer spermatositlerin alt populasyonunda ki gibi güçlüdür. Buna karşılık, olgun spermatidlerde PARP ekspresyonu ya da PAR yoktur (113). Sıçan germ hücreleri ile yapılan bir çalışma ile uyumlu olan bu sonuçlar, PAR ve NAD seviyelerinin primer spermatositlerden sekonder spermatositlere ve spermatidlere doğru ilerledikçe düştüğünü ortaya koymuştur (12).

Son zamanlarda, testiste PARP ailesi proteinleri üzerine yapılan çalışmaların sayısı oldukça artmaktadır. Özellikle PARP-1 ve PARP-2'nin insan ve sıçan testisindeki varlığı, hangi hücre tiplerinde ekspre olduğu ve patolojik durumlardaki ekspresyon şiddeti en çok tartışılan konular arasındadır (114).

PARP-1 mRNA'sının bütün dokularda farklı seviyelerde bulunduğu ancak, testis, dalak ve timusta yüksek seviyede var olduğu belirlenmiştir. Testis dokusunda PARP ekspresyonu ile ilgili çalışmalar ilk olarak sıçanlarda yapılmıştır. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre, PARP'in erişkin testisinde spermatogonya ve pakiten spermatosit nükleusunda yoğun olarak lokalize olduğu gösterilmiştir. İnsan testis örnekleriyle yapılan çalışmalarda ise, PARP-1 ve PAR aktivitesi esasen testiküler germ hücrelerinde lokalize iken, somatik testiküler hücrelerde PARP aktivitesi mevcut değildir (11).

Poli ADP ribozilasyonun genel olarak, kromatin yeniden modellenmesinde ve herhangi bir nedenle oluşan DNA hasarına karşı gerekli yanıtı vererek DNA bütünlüğünün sağlanması önemli rolü olduğu bilinmektedir. Böylesine önemli bir durumdan sorumlu proteinler olan PARP'ların germinal hücrelerdeki varlığı oldukça dikkat çekicidir. Germinal hücrelerin mayoz blnmelerdeki olaylar tarafından şekillendiği bilinmektedir:

(A) DNA replikasyonu spermatogonyada ve mayozdan önce primer spermatositlerde meydana gelir, (B) spermatogonya, spermatositler ve erken spermatidlerin DNA transkripsiyonu aktiftir, ancak geç spermatidler ve spermatozoanın tamamı inaktiftir, (C) DNA kırıklarının oluşması ve tamiri (rekombinasyonel tamir) arasında geçen srenin düzenlenmesi primer spermatositlerde meydana gelir, (D) geç spermatidler nükleer kondenzasyonunun son aşamasından önce kendi DNA hasarlarını tamir edebilirler. Bu aşamalarda meydana gelen hasarların fark edilmesi ve tamirinde PARP'ların, özellikle PARP-1 ve PARP-2'nin, önemli rolleri olduğu ortaya çıkmıştır. PARP-1 ve PARP-2'nin sıçan primer spermatositlerinde yüksek oranda ekspre olduğu bilinmektedir (12). Ayrıca spermatogenezin özgün evrelerinde PARP'ların rolü olduğuna dair kanıtlar vardır.

Spermatogenezde, birinci mayoz bölünmenin profaz aşamasında DNA çift zincir kırıkları meydana gelmektedir. Oluşan bu kırıklar, genetik farklılığı ve kromozom ayrışmasını doğru gerçekleştirmek üzere tamir edilmektedir. Diğer bir yandan, farklılaşan spermatidlerde kromatinin sıkı paketlenmesi sırasında (kondenzasyon) DNA kırıkları ortaya çıkmaktadır. Dolayısıyla, PARP-1'in ve PAR polimerinin; kalıcı ve devamlı ekspresyonu ve erkek germ hücrelerindeki subsellüler lokalizasyonu, insan germ hücre farklılaşmasında poli-ADP-ribozilasyon için anahtar rolü oynamaktadır. PARP-1 ve PARP-2 enzimleri post-mayotik hücrelerde ekspresyonlarını kaybeder (11, 12), dolayısıyla PARP-1 geni spermde kapalıdır (98).

Bu bulgular, genomik bütünlüğün gardiyanı olarak görev yapan bu proteinleri germinal hücre farklılaşmasının mayotik bölünme gibi önemli basamaklarına yerleştirdiğini göstermektedir. Mayoz bölünme sürecinde, DNA tamir enzimlerinin memeli spermatogenezinde belirgin bir önemi vardır (115), ayrıca, epigenetik histon modifikasyonları da mayotik ve post-mayotik evrelerde önemli rol oynamaktadır (116). Poli ADP ribozilasyonun, hem DNA tamir mekanizmalarında hem de epigenetik bilgiye katkı sağladığı dikkat çekmektedir (45). Ancak PARP-1 ve PARP-2 gibi; PARP ailesi üyeleri mayotik hücre fonksiyonlarının düzenlenmesinde farklı roller üstlenebilmektedir.

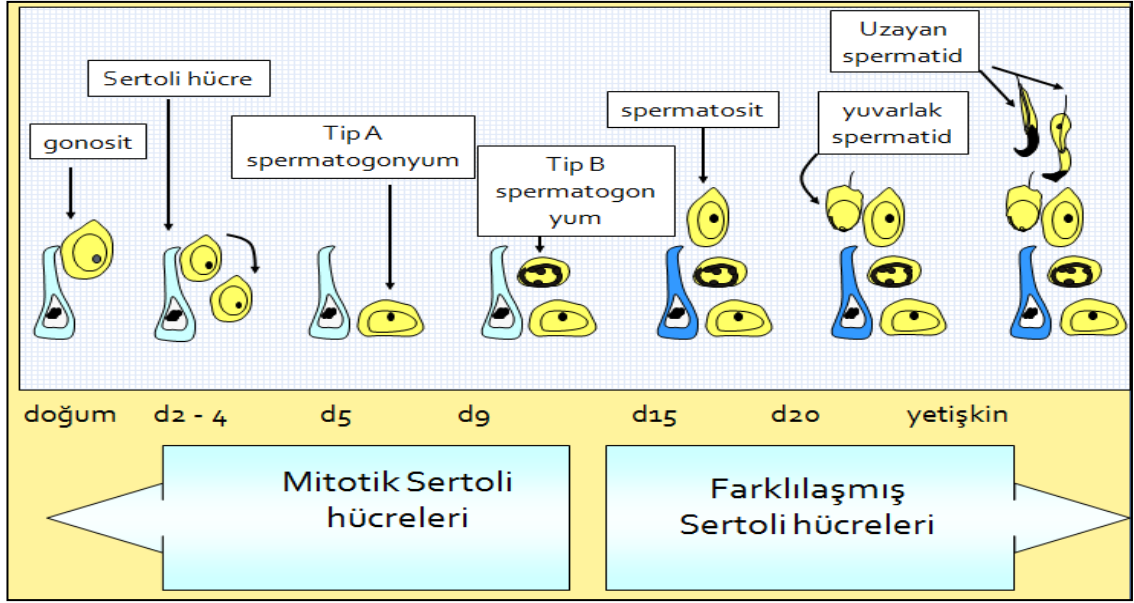
## GEREÇ VE YÖNTEM

### 3.1.Deney Hayvanları

Çalışmada, Akdeniz Üniversitesi “Deney Hayvanları Ünitesi”nden elde edilen 18 adet *Mus Musculus* BALB/C ırkı erkek fareler ile 48 adet *Mus Musculus* BALB/C ırkı dişi fareler kullanılmıştır. Çalışmamız 05.01.2009 tarih ve 01-03 numaralı karar ile Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır. Tüm fareler standart laboratuvar koşullarında, standart diyet ve musluk suyu ile beslenmiştir. Yedi haftalık ve ağırlıkları 60-80 gr olan yetişkin erkek fareler rastgele olarak 9 farklı kafese yerleştirildikten sonra çiftleştirme, bir kafeste 2 dişiye 1 erkek olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Ertesi gün vajinal plak oluşumu gözlenen dişi fareler gebeliğin 0.gününde kabul edilerek, doğum öncesi ve doğum sonrası takip edilerek elde edilen erkek yavru fare sayısı saptanmıştır. Elde edilen yavrular, 1.Grup erkek fareler (Embriyonik 15.5.gün, n=6), 2.Grup erkek fareler (Embriyonik 17.5.gün, n=6), 3.Grup erkek fareler (postnatal 0.5.gün, n=6), 4.Grup erkek fareler (postnatal 3.gün, n=6), 5.Grup erkek fareler (postnatal 5.gün, n=6), 6.Grup erkek fareler (postnatal 9.gün, n=6), 7.Grup erkek fareler (postnatal 15.gün, n=6), 8.Grup erkek fareler (postnatal 20.gün, n=6), 9.Grup erkek fareler (yetişkin, n=6) olarak sınıflandırılarak diseksiyon tarihleri belirlenmiştir.

**Seçilen bu günlerin önemi:** Embriyonik 15.5’uncu günde seminifer kordonlarda bulunan Sertoli hücreleri ve gonositler proliferasyonlarına devam etmektedir. Embriyonik 17.5’uncu günde Sertoli hücreleri proliferasyonlarına devam etmekte fakat gonositler doğum sonrası 1.güne kadar mitotik duraklamaya girmektedir. Doğum sonrası 0. günde seminifer kordonların merkezinde bulunan gonositlerin bazale doğru göçü başlar. Doğum sonrası 3.günde bazale inen gonositler artık proliferasyon olmaktadır ve Sertoli desteği ile gelişimlerine devam ederler. Doğum sonrası 5.günde bazale göç eden gonositler spermatogonyumlara farklılaşırlar. Doğum sonrası 9.günde farklılaşmalarını tamamlarlar ve mitoz bölünmelere devam ederek bir yandan tip A spermatogonyum havuzunu korur bir yandan da spermatogeneze devam edecek olan tip B spermatogonyumlara farklılaşırlar. DS9. günde Sertoli hücreleri post-mitotiktirler ancak farklılaşmalarını henüz tamamlamamışlardır. Spermatogenezin ilk dalgasının başladığı DS15.günde; bazalde ve Sertoli hücreleri arasında tip A spermatogonyum ve tip B spermatogonyumların yanı sıra mayoz bölünmelere başlamış olan spermatositler de görülmektedir. Farede pubertenin başlangıcı olarak bilinen DS20. günde tip A ve tip B spermatogonyumlara ek olarak, spermatogenik seri hücrelerinden spermatositler ve yuvarlak spermatidler görülmektedir. Aşağıdaki şekilde postnatal testis gelişiminin şematize çizimi verilmiştir (Şekil 3.1.).

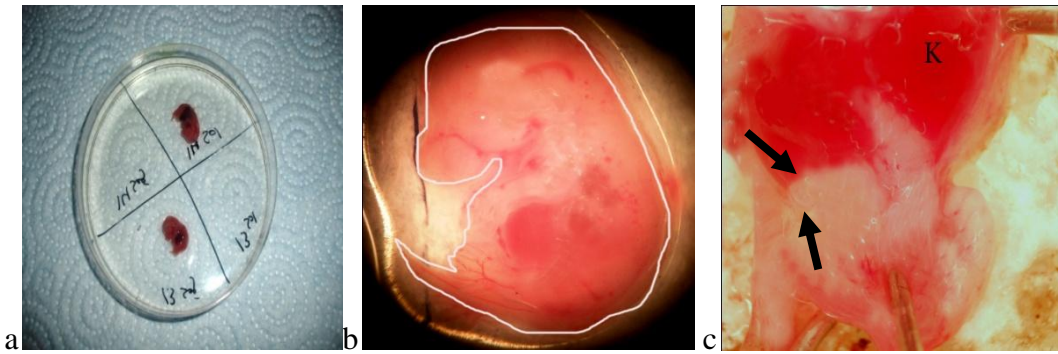




**Şekil 3.1.** Doğum sonrası 0.günden yetişkine kadar olan süreçte testiste seminifer tübülde görülen hücre tipleri (Şahin,Z.)

### 3.2.Dokuların Elde Edilmesi ve Hazırlanması

Steriomikroskop altında diseke edilen erkek fetüslerden ve ya doğan erkek yavrulardan belirtilen günlerde alınan doku örnekleri (Şekil 3.2.) Bouin fiksatifinde gece boyu +4°C derecede bekletildikten sonra su ile yıkama yapılmadan %70'lik alkole alınmıştır. Ardından %80 ve %90'lık alkollerde gece boyu, %100'lük alkolde 2 saat bekletildikten sonra, şeffaflaştırma için ksilol serilerinden 1'er dakika geçirilmiştir ve sıvı parafin içerisinde 1.5 saat inkübe edilmiştir. Tüm gruplardaki farelerin testis dokuları bloklanarak ışık mikroskopik incelemeleri ve immünohistokimyasal araştırmalar için hazırlanmıştır.



**Şekil 3.2.** Fare embriyolarının steriomikroskoptaki görüntüleri: (a); Embriyonik 15.5. günlük embriyo makroskopik görüntü. (b) Steriomikroskop altında embriyonun bütün görüntüsü. (c); embryo açıldıktan sonra karaciğer oluşumlarının altında yer alan gonad siyah oklarla gösterilmektedir. K:Karaciğer

### 3.3. İmmünohistokimyasal Protokol

Beş µm kalınlığındaki parafin kesitler, bir gece 45 °C'lik etüvde bekletilmiştir. Deparafinizasyon için iki kere 10'ar dakika ksilollerden geçirildikten sonra, her birinde beşer dakika olmak kaydıyla %100, %90, %70'lik alkol serilerinden geçirilerek rehidrate edilmiştir. Daha sonra, distile suda çalkalanarak, tris tamponunda (TBS; pH: 7.2-7.4) üç kere beşer dakika yıkanmıştır. Antijenik maskenin giderilmesi amacıyla kesitler 200 ml glisin tamponu (pH:3.5) içerisinde mikrodalga fırında 10 dakika muamele edildikten sonra 20 dakika oda ısısında soğumaya bırakılmıştır. Çevresi hidrofobik kalemle çizilen kesitler, distile su ve TBS'ten geçirilmiştir. Endojen peroksidadz aktivitesinin giderilmesi amacıyla kesitler %3'lük hidrojen peroksit ile 5 dakika inkübe edilmiştir. Distile suda çalkalanıp TBS'te yıkanan kesitler, oda sıcaklığında ve nemli ortamda özgül olmayan Immunoglobulin (Ig) bağlanmalarını önlemek amacıyla bloklama serumu (Lab Vision) ile 7 dakika muamele edilmiştir Serumun fazlası alındıktan sonra, fare monoklonal anti-PAR [Alexis, Kat No ALX-804-220] ile 1:100 dilüsyon oranında, oda ısısında gece boyu, tavşan poliklonal anti-PARP-1 [Abcam, Kat No Ab6079] ile 1:500 dilüsyon oranında, oda ısısında gece boyu, tavşan poliklonal anti-PARP-2 [Alexis, Kat No: ALX-210-899-R100] ile 1:100 oranında oda ısısında gece boyu, tavşan poliklonal anti-VASA/MVH [Abcam Kat No: ab13840] ile 1:500 oranında oda ısısında gece boyu, keçi poliklonal anti-AMH/MIS [Santa Cruz Kat No: sc-6886] ile oda ısısında gece boyu, fare monoklonal anti-PCNA [sc-56] ile 1:500 dilüsyon oranında kesitler inkübe edilmişlerdir. Kesitler, inkübasyon sonunda TBS ile üç defa beşer dakika yıkanmıştır. Daha sonra sırasıyla, 1 saat oda ısısında biyotinli fare, tavşan ve keçi sekonder antikor (Vector) ile ve önceden 30 dakika oda ısısında bekletilen Vectastain Avidin Biotin Complex kiti [Vector PK 4000] ile 30 dk inkübasyon yapılmıştır. Her iki uygulama sonrasında da, TBS ile 3 defa beşer dakika yıkama yapılmıştır. Sinyali geliştirmek için dokular üç dakika 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) kromojeni [SIGMAFAST Kat No:4168] ile muamele edildikten sonra distile suda yıkanmıştır. Mayer'in Hematoksilen'inde (Dako) 30 saniye zıt boyama yapıldıktan sonra 3'er dk sırasıyla %70, %90'lık alkol, 10 dk %100'lük alkol ve son olarak 5'er dk ksilollerden geçirilerek entellan kapatma solüsyonu ile kapatılmıştır.

İmmünohistokimyasal tekniklerle boyanan bütün kesitler Axioplan mikroskopunda (Zeiss) değerlendirilmiştir. Kesitlerden Spot Advance programı aracılığı ile resimler elde edilmiştir.

## BULGULAR

PARP-1 ve PARP-2'nin ekspresyonlarının hangi hücrelerde yer aldığını gösterebilmek için; testis gelişimi süresince pre-Sertoli hücrelerinden salgılanan ve bu hücrelerin bir belirteci olan AMH ekspresyonu, erişkin testise kadar seçilen tüm günlerde henüz farklanmamış olan pre-Sertoli hücrelerinin sitoplazmalarında gösterilmiştir.

Embriyonik dönemden itibaren tüm germ hücrelerinin sitoplazmalarında gösterilen VASA ekspresyonu germ hücre belirteci olarak kullanılmıştır. Belirli günlerde çoğalan ya da mitotik olarak duraksamaya giden hücrelerin ayırt edilmesi için proliferen hücrelerin nükleuslarında PCNA ekspresyonu gösterilmiştir.

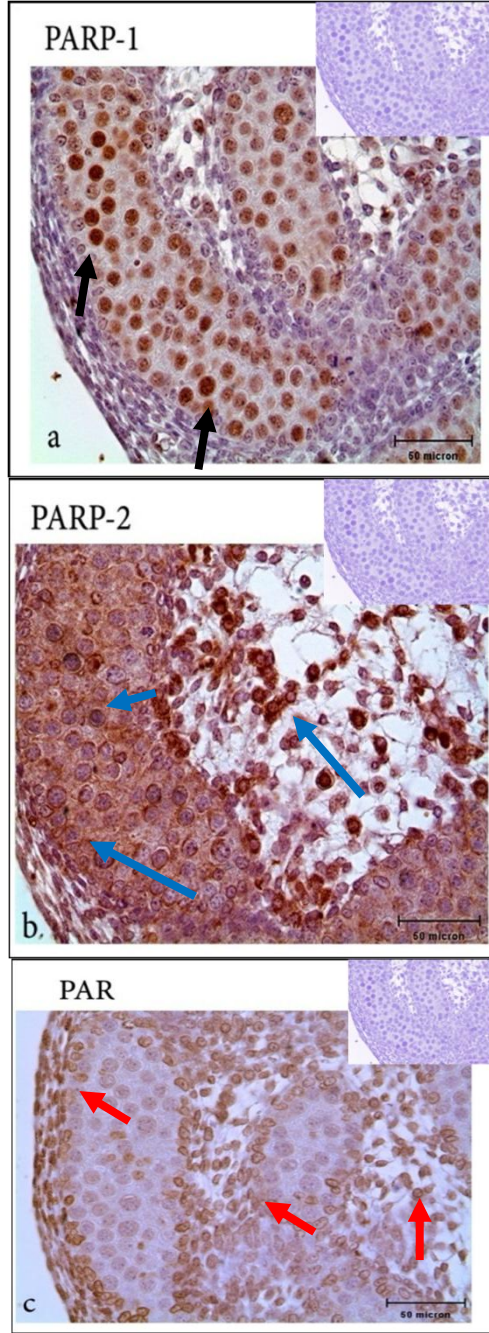
### 4.1. Embriyonik dönem fare testis dokularında immünohistokimyasal bulgular

#### 4.1.1. Embriyonik 15.5. günde (E15.5) PARP-1, PARP-2 ve PAR ekspresyonları

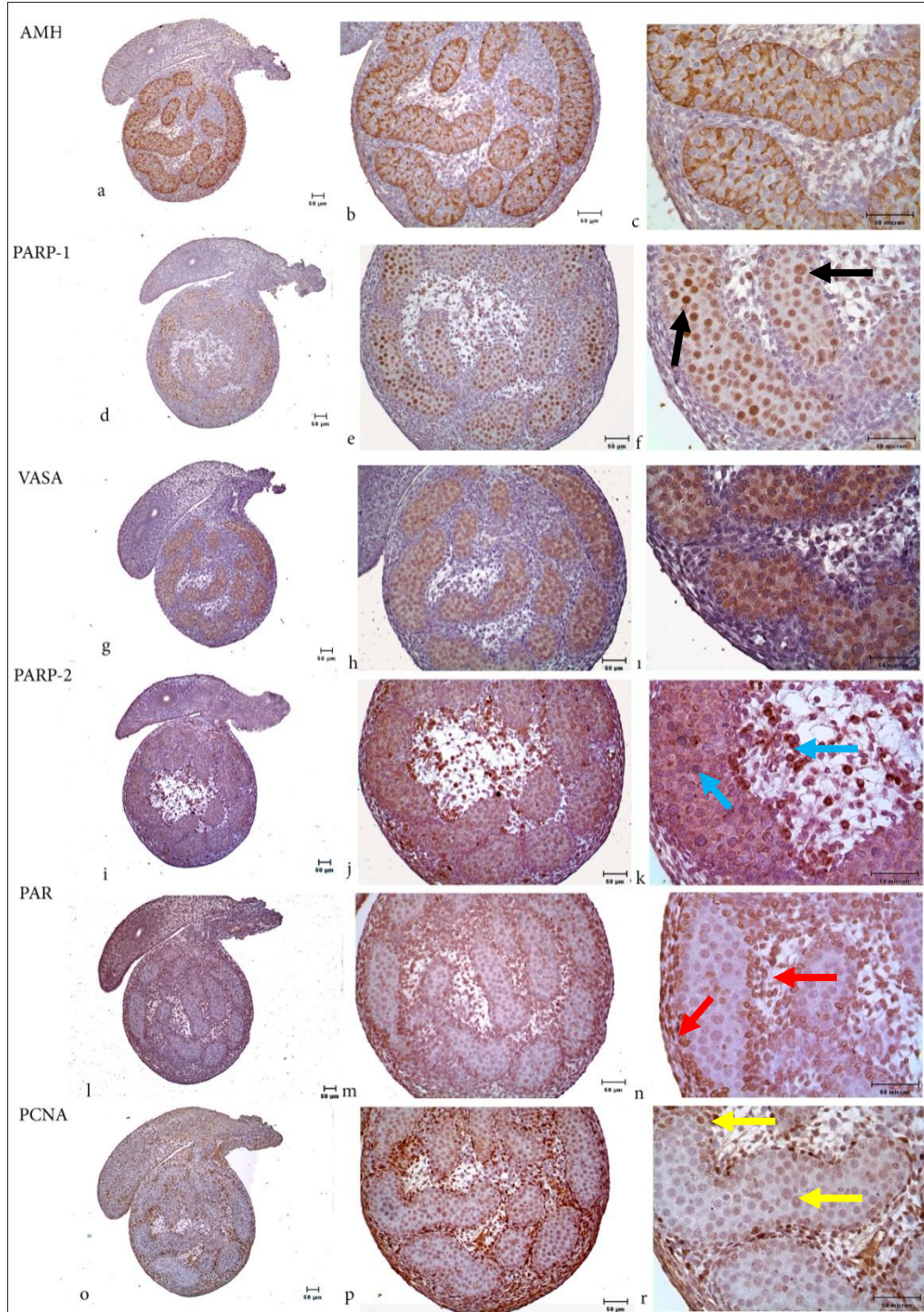
E15.5. günde; proliferen hücreler, seminifer kordonların içerisinde düzensiz şekilde görülmektedir. Gonositleri çevreleyen pre-Sertoli hücrelerinin nükleusları oval şekillidir ve bazal membrana oturmuş halde gözlenmektedir.

AMH ve VASA ekspresyonları ile germ hücre ve pre-Sertoli hücreleri tanımlanmasının ardından devam eden seri kesitlerde izlenen PARP-1 ekspresyonu E15.5. günde gonositlerde nükleer olarak gösterilmiştir. PARP-2 ekspresyonu; E15.5. günde gonositlerde nükleer, pre-Sertoli hücrelerinde ise sitoplazmik olarak gösterilmiştir. PAR ekspresyonu, E15.5.günde proliferatif hücreler pre-Sertoli hücrelerinde nükleer olarak gözlenmiştir (Şekil 4.1.1a).

Ayrıca, E15.5. günde testis dokusunun genel görüntüsünü göstermek ve PARP-1, PARP-2 ve PAR ekspresyonlarını; AMH, VASA ve PCNA ekspresyonları ile ilişkilendirmek amacıyla küçük büyütmelerdeki fotoğraflar da gösterilmektedir (Şekil4.1.1b).



**Şekil 4.1.1a.** Embriyonik 15.5. güne ait fare testisinde PARP-1, PARP-2 ve PAR ekspresyonları. a) Seminifer kordonların lümeninde dağınık olarak gözlenen gonositlerin nükleuslarında PARP-1 ekspresyonu (siyah oklar). b) Seminifer kordonların lümeninde yer alan gonositlerin ve pre-Sertoli hücrelerinin sitoplazmalarının da, intersitisyel alanda bulunan hücrelerde PARP-2 ekspresyonu (mavi oklar). c) Pre-Sertoli hücrelerinin nükleuslarında ve intersitisyel alanda bulunan hücrelerde PAR ekspresyonu gösterilmiştir (kırmızı oklar).



**Şekil 4.1.1b.** Farede embriyonik dönem 15.5. günde seri kesitlerde PARP-1, PARP-2 ve PAR ekspresyonlarının immünohistokimyasal olarak gösterilmesi. (a-c) Seminifer kordonların bazalinde bulunan pre-Sertoli hücre sitoplazmalarında AMH ekspresyonu. (d-f) Seminifer kordonların lümeninde gözlenen gonositlerde PARP-1 ekspresyonu. (g-i) Gonosit belirteci olan ve gonositlerin sitoplazmalarında gözlenen VASA ekspresyonu. (j-k) Gonositlerde, pre-Sertoli hücrelerinde ve intersitisiyel alan hücrelerinde sitoplazmik PARP-2 ekspresyonu (mavi oklar). (l-n) Pre-Sertoli hücrelerinde ve intersitisiyel hücrelerdeki nükleer PAR ekspresyonu (kırmızı oklar). (o-r) Çoğalan hücrelerin nükleuslarında PCNA ekspresyonu gösterilmektedir (sarı oklar).

#### **4.1.2. Embriyonik 17.5. günde (E17.5) PARP-1, PARP-2 ve PAR ekspresyonları**

Prenatal günlerden bir diğeri olan E17.5. günde seminifer kordonlar daha belirgin hale gelmiştir ve sayıları artmıştır. Gonositler seminifer kordonların bazalinde bulunan pre-Sertoli hücreleri tarafından çevrelenmektedir. Gonositlerin mitotik olarak sessiz olduğu E17.5. günde, PCNA ekspresyonu bu hücrelerde gözlenmemiştir.

PARP-1 ekspresyonu; E17.5. günde lümende görülen tüm gonositlerde nükleer olarak gösterilmiştir. PARP-2 ekspresyonu; henüz seminifer kordon oluşumu devam eden E17.5. günde lümende dağınık olarak gözlenen gonositlerin ve intersisiyal alanda bulunan hücre gruplarının sitoplazmalarında gösterilmiştir. Aynı zamanda PARP-2 proteini, AMH ekspresyonuna paralel şekilde pre-Sertoli hücrelerinin sitoplazmalarında da ekspre olmaktadır. PAR ekspresyonu, E17.5. günde proliferatif olan pre-Sertoli hücrelerinde ve intersitsiyel hücrelerde nükleer olarak gözlenmiştir (Şekil 4.1.2a).

Ayrıca, E17.5. günde testis dokusunun genel görüntüsünü göstermek ve PARP-1, PARP-2 ve PAR ekspresyonlarını; AMH, VASA ve PCNA ekspresyonları ile ilişkilendirmek amacıyla küçük büyütmedeki fotoğraflar da gösterilmektedir (Şekil 4.1.2b).

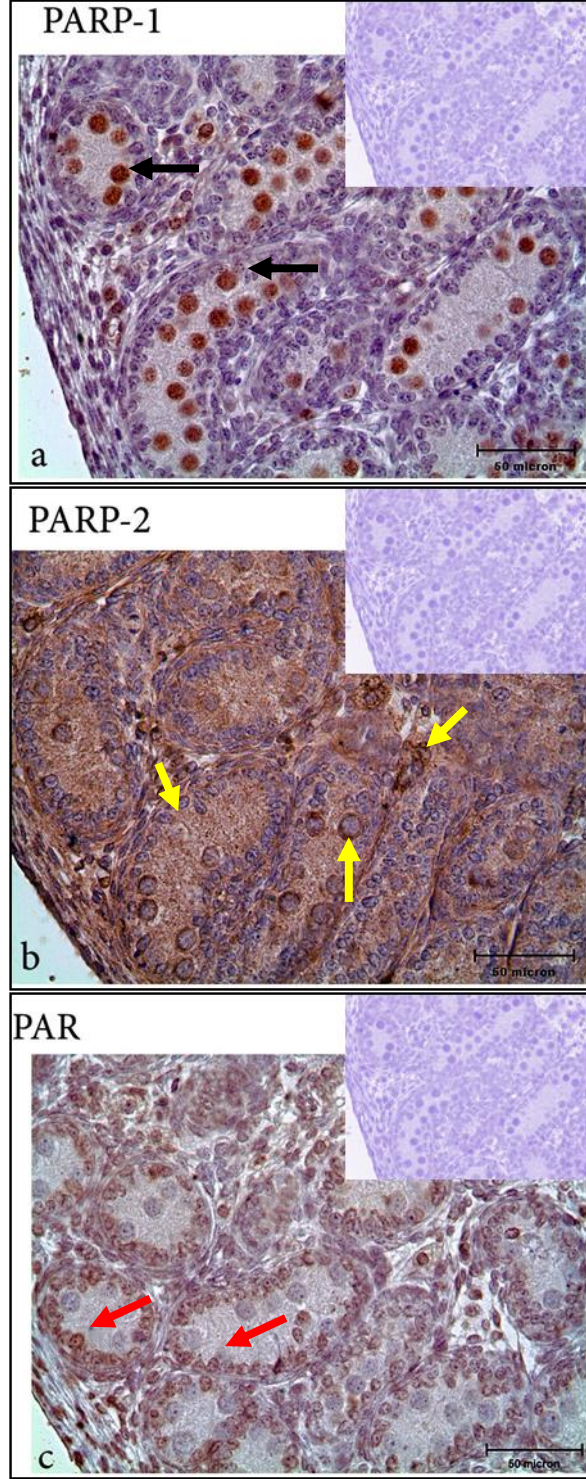
#### **4.2. Neonatal ve Postnatal dönem fare testis dokularında immünohistokimyasal bulgular**

##### **4.2.2. Doğum sonrası 0. Günde (PP0) PARP-1, PARP-2 ve PAR ekspresyonları**

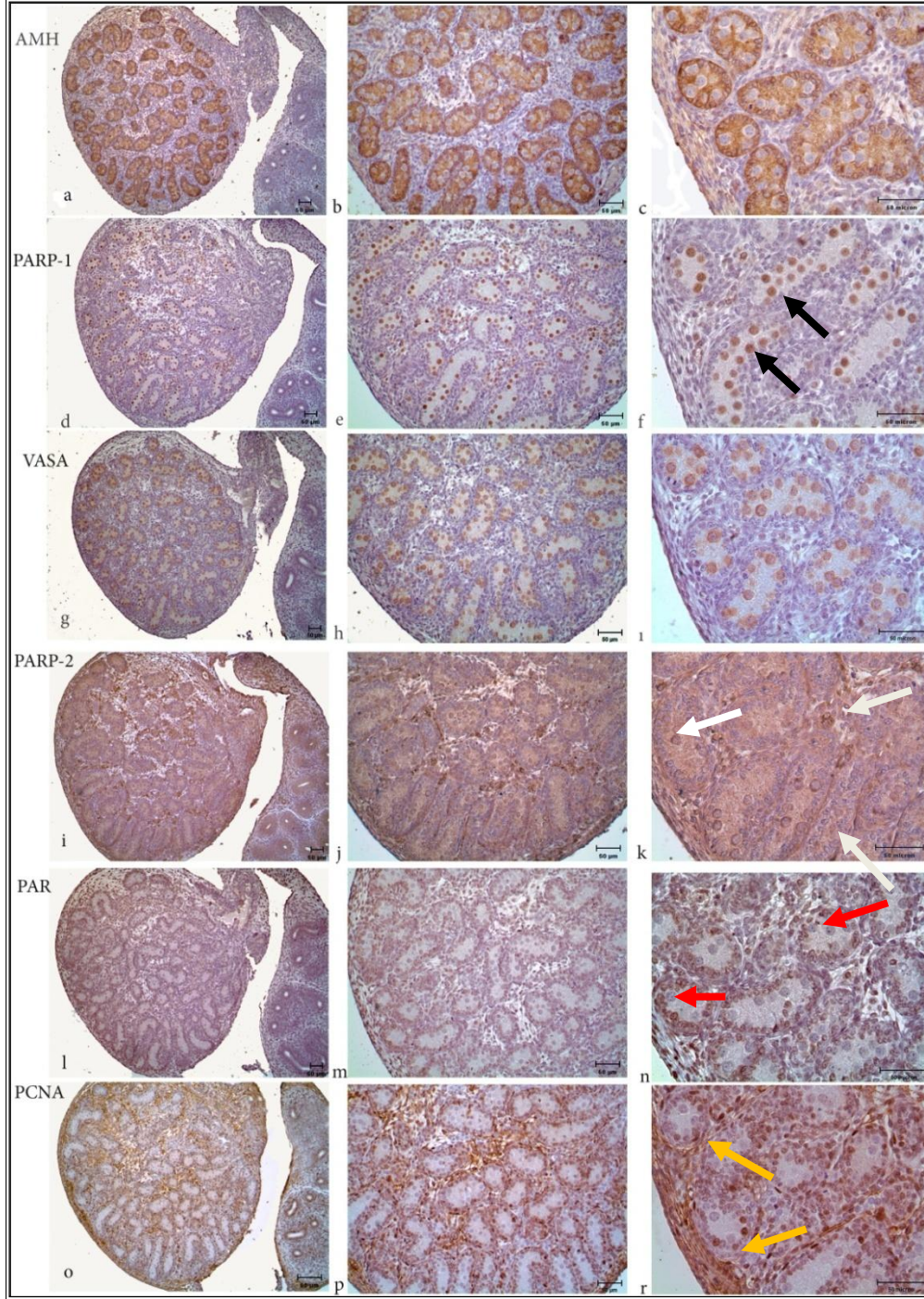
Doğumda henüz spermatogonyumlara farkanmamış halde görülen gonositler proliferasyonlarına yeniden devam etmekteledir. Pre-Sertoli hücreleri de mitotik olup PCNA ekspresyonu göstermektedir.

PARP-1 ekspresyonu gonositlerde nükleer olarak gösterilmiştir. PARP-2 ekspresyonu; DS0. günde gonositlerde nükleer ve sitoplazmik olarak gözlenmiştir. Ayrıca intersisiyal alandaki hücrelerde ve pre-Sertoli hücrelerinde PARP-2 ekspresyonu sitoplazmada izlenmektedir. PAR ekspresyonu, DS0. günde proliferatif olan pre-Sertoli hücrelerinde nükleer olarak gösterilmiştir (Şekil 4.2.2a.).

Ayrıca, DS0. günde testis dokusunun genel görüntüsünü göstermek ve PARP-1, PARP-2 ve PAR ekspresyonlarını; AMH, VASA ve PCNA ekspresyonları ile ilişkilendirmek amacıyla küçük büyütmedeki fotoğraflar da gösterilmektedir (Şekil 4.2.2b).

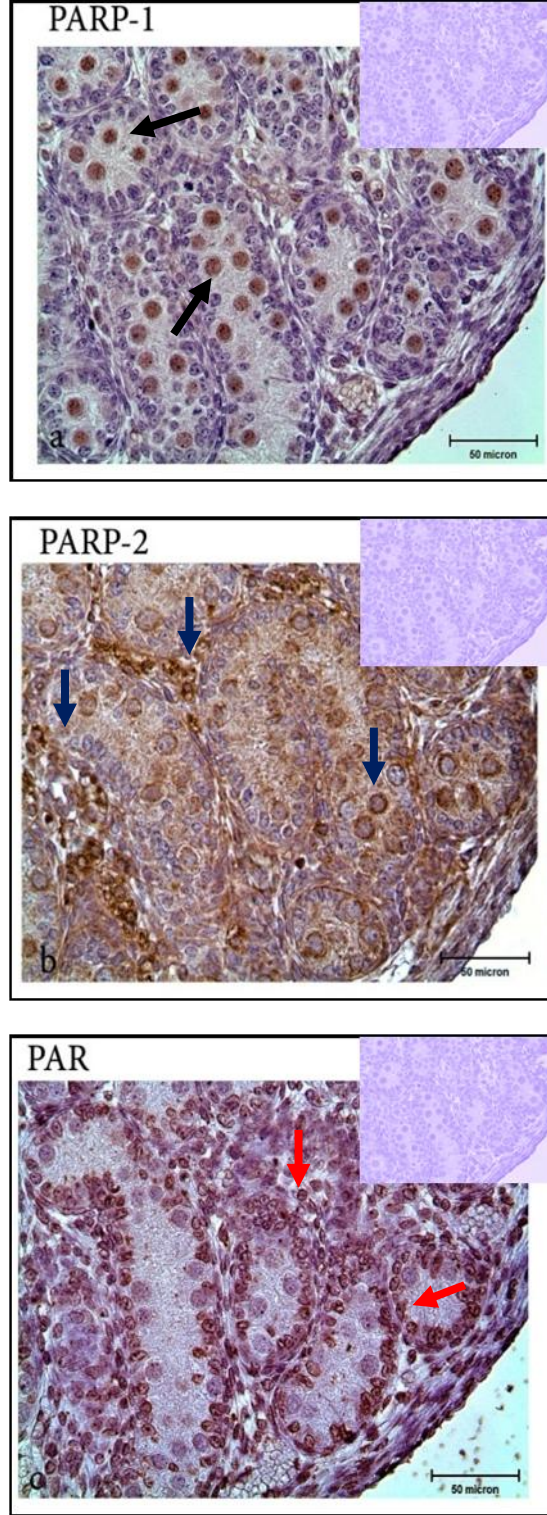


**Şekil 4.1.2a.** Embriyonik 17.5. güne ait fare testisinde PARP-1, PARP-2 ve PAR ekspresyonları. a) Seminifer kordonların lümeninde dağınık olarak gözlenen gonositlerin nükleuslarında PARP-1 ekspresyonu (siyah oklar). b) Seminifer kordonların lümeninde yer alan gonositlerin ve pre-Sertoli hücrelerinin sitoplazmalarında, intersitisyel alanda bulunan hücrelerde PARP-2 ekspresyonu (sarı oklar). c) Pre-Sertoli hücrelerinin nükleuslarında intersitisyel alanda bulunan hücrelerde PAR ekspresyonu gösterilmiştir (kırmızı oklar).

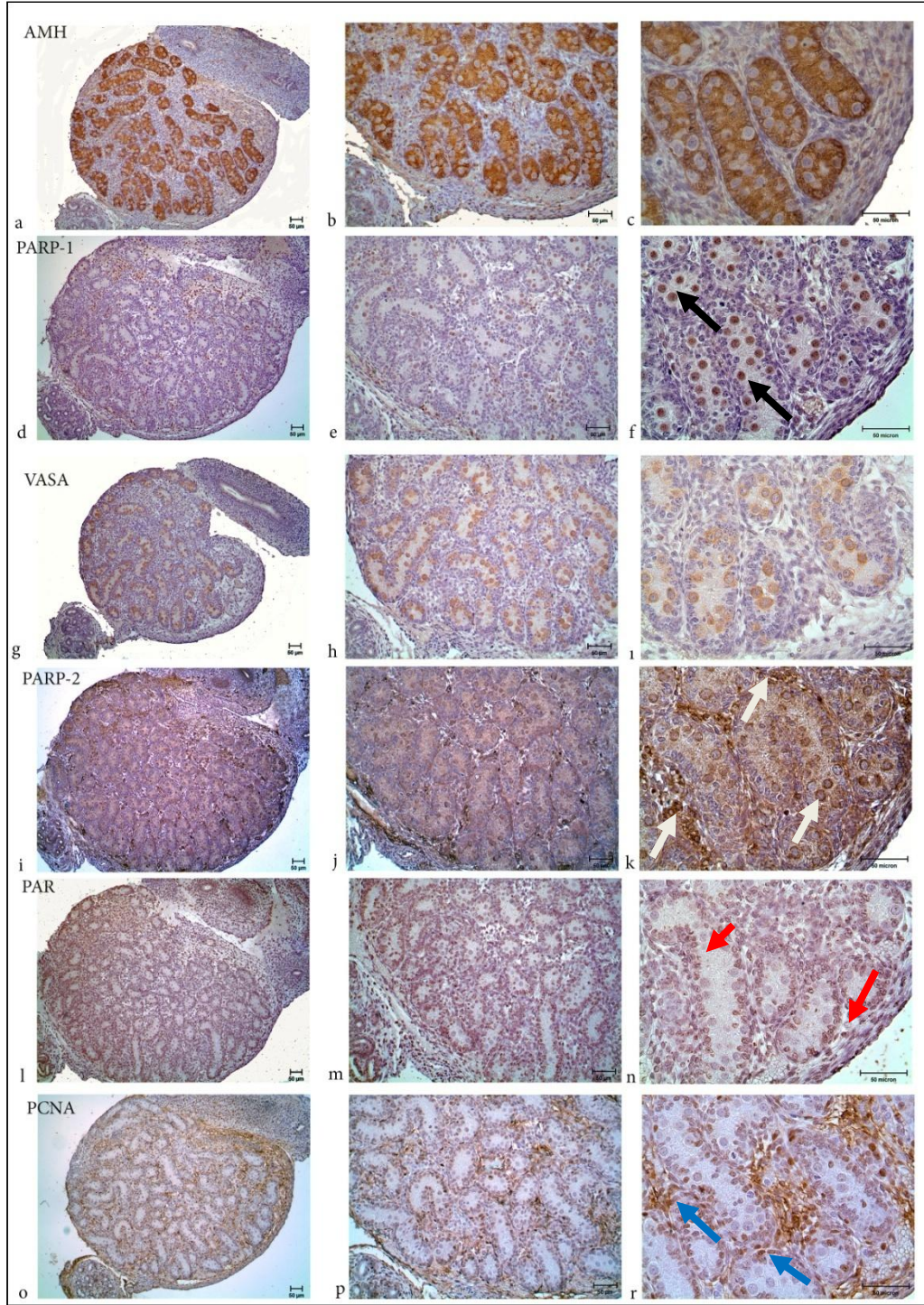


**Şekil 4.1.2b.** Farede embriyonik dönem 17.5. günde seri kesitlerde PARP-1, PARP-2 ve PAR ekspresyonlarının immünohistokimyasal olarak gösterilmesi. (a-c) Seminifer kordonların bazalinde bulunan pre-Sertoli hücre sitoplazmalarında AMH ekspresyonu. (d-f) Seminifer kordonların lümeninde gözlenen gonositlerde PARP-1 ekspresyonu (siyah oklar). (g-i) Gonosit belirteci olan ve gonositlerin sitoplazmalarında gözlenen VASA ekspresyonu. (j-k) Pre-Sertoli hücrelerinde ve gonositlerde sitoplazmik olarak gösterilen PARP-2 ekspresyonu (beyaz oklar). (l-n) Pre-Sertoli hücrelerinde nükleer olarak gösterilen PAR ekspresyonu (kırmızı oklar). (o-r) Çoğalan hücrelerin nükleuslarında PCNA ekspresyonu gösterilmektedir fakat mitotik sessizlik evresinde olan gonositlerde ekspresyon gözlenmemektedir (sarı oklar).





**Şekil 4.2.2a.** Doğum sonrası 0. güne ait fare testisinde PARP-1, PARP-2 ve PAR ekspresyonları. a) Seminifer kordonların lümeninde bulunan gonositlerin nükleuslarında PARP-1 ekspresyonu (siyah oklar). b) Seminifer kordonların lümeninde yer alan gonositlerin ve pre-Sertoli hücrelerinin sitoplazmalarında, intersitisyel alanda bulunan hücrelerde PARP-2 ekspresyonu (mavi oklar). c) Pre-Sertoli hücrelerinin nükleuslarında PAR ekspresyonu gösterilmiştir (kırmızı oklar).



**Şekil 4.2.2b.** Farede doğum sonrası 0. günde seri kesitlerde PARP-1, PARP-2 ve PAR ekspresyonlarının immünohistokimyasal olarak gösterilmesi. (a-c) Seminifer kordonların bazalinde bulunan pre-Sertoli hücre sitoplazmalarında AMH ekspresyonu. (d-f) Lümen ve yer yer bazale yakın halde gözlenen gonositlerde PARP-1 ekspresyonu (siyah oklar). (g-i) Gonosit belirteci olan ve gonositlerin sitoplazmalarında gözlenen VASA ekspresyonu. (j-k) Pre-Sertoli hücrelerinde ve intersitisyel alanda ve gonositlerde sitoplazmik olarak izlenen PARP-2 ekspresyonu (beyaz oklar). (l-n) Sertoli hücrelerinde nükleer olarak gösterilen PAR ekspresyonu (kırmızı oklar). (o-r) Çoğalan hücrelerin nükleuslarında PCNA ekspresyonu gösterilmektedir (mavi oklar).

#### **4.2.3. Doğum sonrası 3. Günde (DS3) PARP-1, PARP-2 ve PAR ekspresyonları**

DS3. günde bazale göç eden gonositler proliferasyonlarına devam etmektedir ve pre-Sertoli hücre desteği ile gelişimlerine devam ederler. Gonositlerin bazıları henüz lümende bulunmaktadırlar.

PARP-1 ekspresyonu göç eden gonositlerde nükleer olarak gösterilmiştir. PARP-2 ekspresyonu gonositlerin ve pre-Sertoli hücrelerinin sitoplazmalarında ve intertisyel alanda bulunan hücre gruplarında sitoplazmik olarak izlenmektedir. PAR ekspresyonu, pre-Sertoli hücrelerinde ve intersitisyel alandaki bazı hücrelerde nükleer olarak şiddetini değiştirmeden devam etmektedir (Şekil 4.2.3a.).

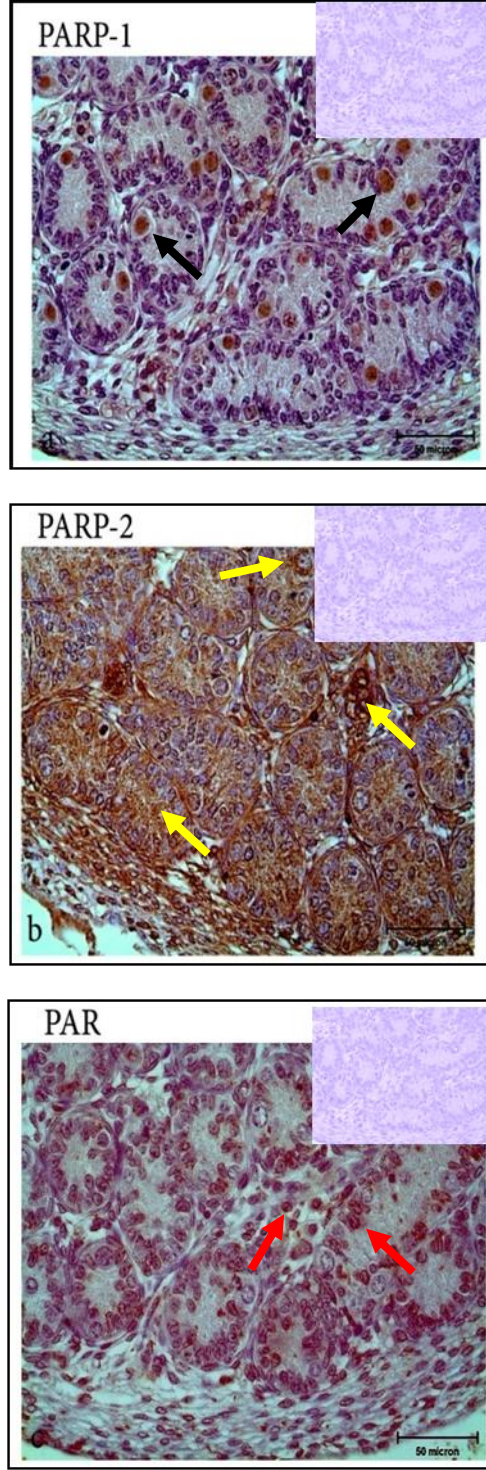
Ayrıca, DS3. günde testis dokusunun genel görüntüsünü göstermek ve PARP-1, PARP-2 ve PAR ekspresyonlarını; AMH, VASA ve PCNA ekspresyonları ile ilişkilendirmek amacıyla küçük büyütmedeki fotoğraflar da gösterilmektedir (Şekil 4.2.3b).

#### **4.2.4. Doğum sonrası 5. günde (DS5) PARP-1, PARP-2 ve PAR ekspresyonları**

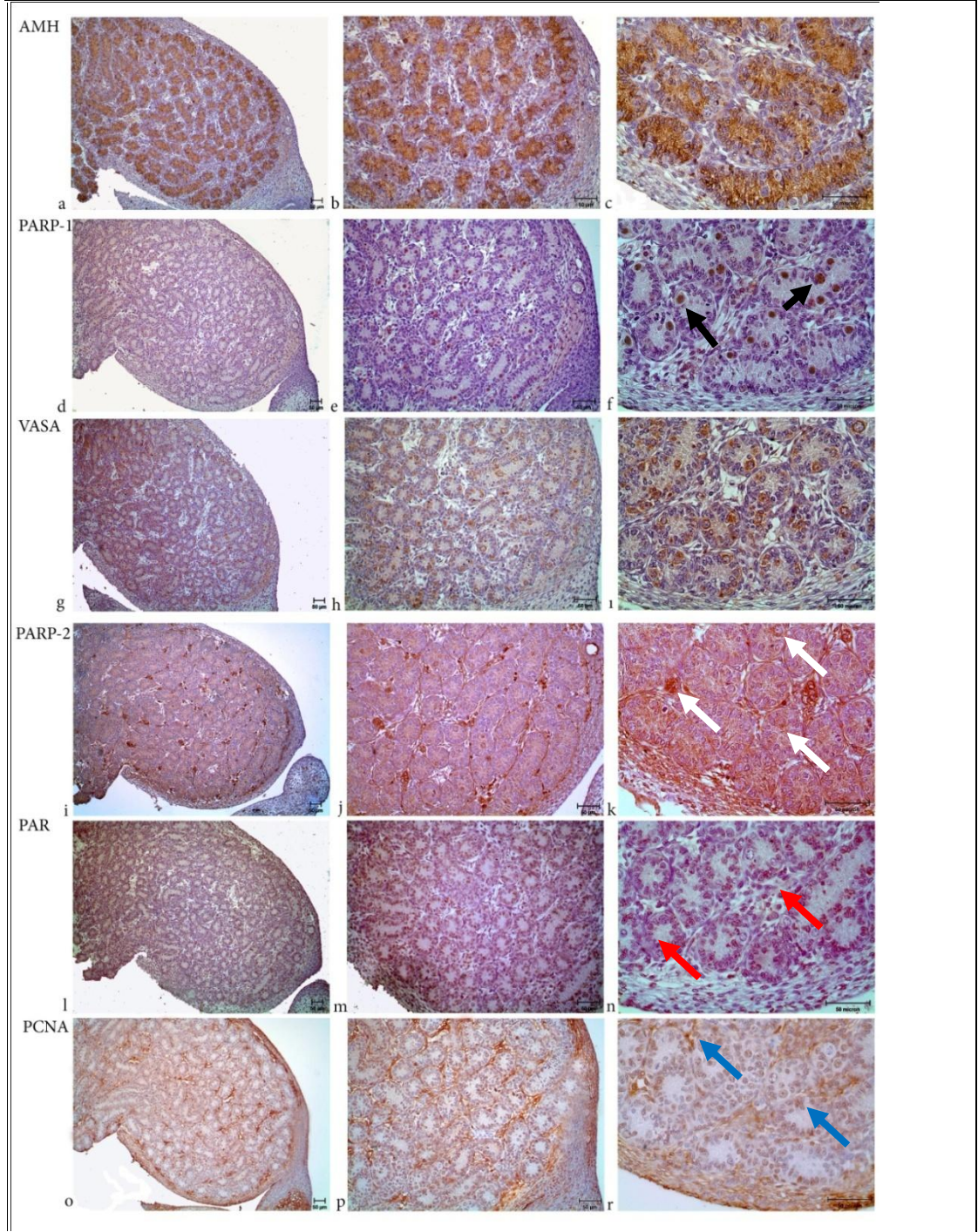
Doğum sonrası 5. günde spermatogonyumlara farklanmak üzere bazı gonositler bazale doğru göç etmektedir. Bazale göç eden spermatogonyumlara farklanan gonositlerin proliferasyonlarına devam ettiği, nükleuslarında gözlenen PCNA ekspresyonu ile gösterilmiştir.

Doğum sonrası 5. günde lümeden bazale doğru göç eden ve spermatogonyumlara farklanan gonositlerde PARP-1 ekspresyonu nükleer olarak devam etmektedir. PARP-2 ekspresyonu; DS5. günde spermatogonyumlarda gözlenmezken intersitisyel alandaki hücrelerde ve pre-Sertoli hücrelerinin sitoplazmalarında gösterilmiştir. PAR ekspresyonu, DS5. günde mitotik evrelerine devam eden pre-Sertoli hücrelerinde nükleer olarak devam etmektedir. (Şekil 4.2.4a.)

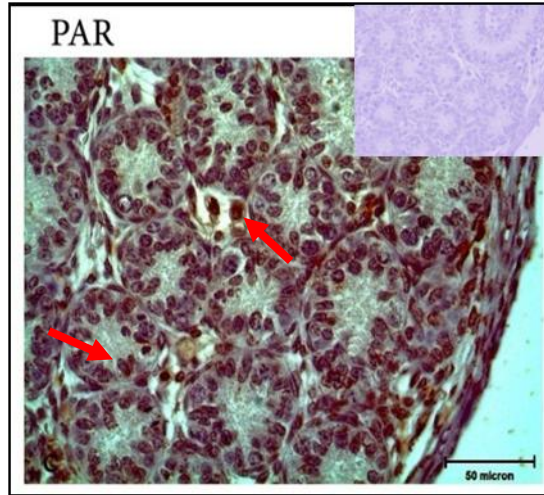
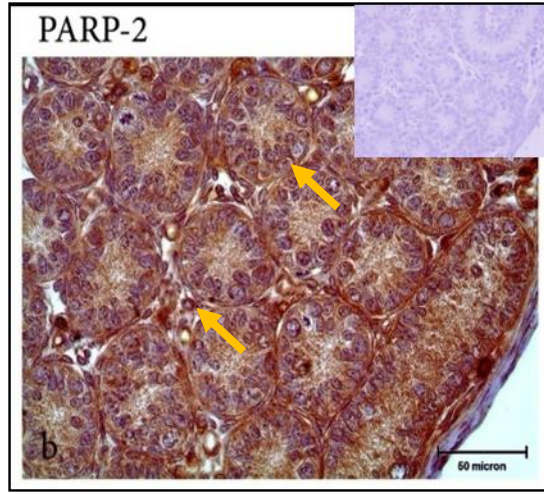
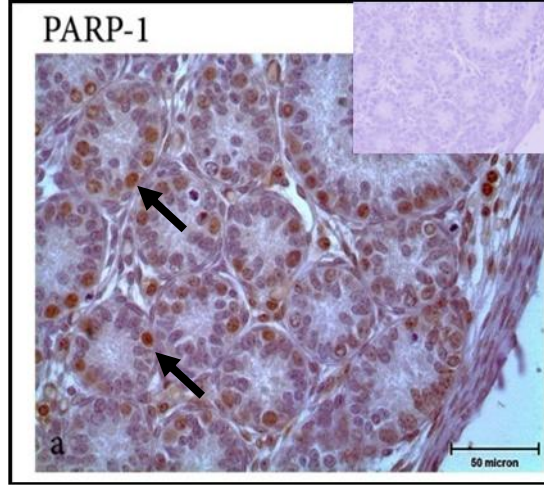
Ayrıca, DS5. günde testis dokusunun genel görüntüsünü göstermek ve PARP-1, PARP-2 ve PAR ekspresyonlarını; AMH, VASA ve PCNA ekspresyonları ile ilişkilendirmek amacıyla küçük büyütmedeki fotoğraflar da gösterilmektedir (Şekil 4.2.4b).



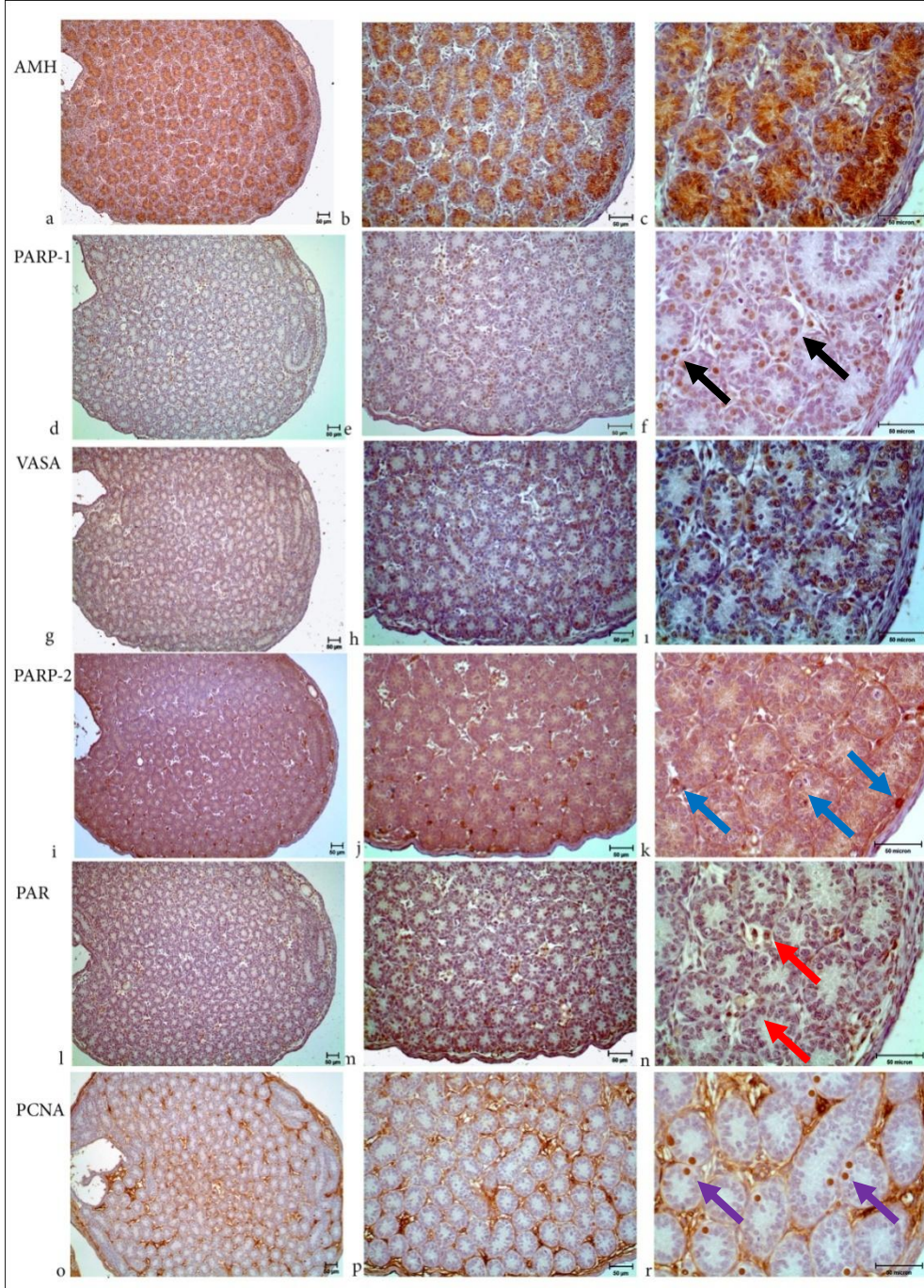
**Şekil 4.2.3a.** Doğum sonrası 3. güne ait fare testisinde PARP-1, PARP-2 ve PAR ekspresyonları. a) Seminifer kordonların lümeninden bazale doğru göç eden gonositlerin nükleuslarında PARP-1 ekspresyonu (siyah oklar). b) Seminifer kordonların lümeninden tübüllerin bazaline göç eden gonositlerin, pre-Sertoli hücrelerinin sitoplazmalarında ve intersitisyel alanda bulunan hücre gruplarında sitoplazmik PARP-2 ekspresyonu (sarı oklar). c) Pre-Sertoli hücrelerinin nükleuslarında ve intersitisyel alanda görülen hücrelerde nükleer PAR ekspresyonu gösterilmiştir (kırmızı oklar).



**Şekil 4.2.3b.** Farede doğum sonrası 3. günde seri kesitlerde PARP-1, PARP-2 ve PAR ekspresyonlarının immünohistokimyasal olarak gösterilmesi. (a-c) Seminifer kordonların bazalinde bulunan pre-Sertoli hücre sitoplazmalarında AMH ekspresyonu. (d-f) Seminifer kordonların bazaline doğru göç etmekte olan gonositlerde PARP-1 ekspresyonu (siyah oklar). (g-i) Germ hücre belirteci olan ve germ hücrelerinin sitoplazmalarında gözlenen VASA ekspresyonu. (j-k) İntersisiyal alan hücre gruplarında, pre-Sertoli hücrelerinde ve gonositlerde sitoplazmik olarak gösterilen PARP-2 ekspresyonu (beyaz oklar). (l-n) Sertoli hücrelerinde ve intersitisyel alandaki bazı hücrelerde nükleer olarak gösterilen PAR ekspresyonu. (o-r) Çoğalan hücrelerin nükleuslarında PCNA ekspresyonu gösterilmektedir (mavi oklar).



**Şekil 4.2.4a.** Doğum sonrası 5. güne ait fare testisinde PARP-1, PARP-2 ve PAR ekspresyonları. a) Seminifer kordonların bazaline göç ederek farklılaşan spermatogonyumların nükleuslarında PARP-1 ekspresyonu (siyah oklar). B) Pre-Sertoli hücrelerinin sitoplazmalarında ve intersitisyel alanda bulunan hücre gruplarında PARP-2 ekspresyonu (sarı oklar). c) Pre-Sertoli hücrelerinin nükleuslarında ve intersitisyel alandaki bazı hücrelerde PAR ekspresyonu gösterilmiştir (kırmızı oklar).



**Şekil 4.2.4b.** Farede doğum sonrası 5. günde seri kesitlerde PARP-1, PARP-2 ve PAR ekspresyonlarının immünohistokimyasal olarak gösterilmesi. (a-c) Seminifer kordonların bazalinde bulunan Sertoli hücre sitoplazmalarında AMH ekspresyonu. (d-f) Seminifer tübül bazaline göç ederek spermatogonyumlara farklı hücrelerde nükleer PARP-1 ekspresyonu (siyah oklar). (g-i) Germ hücre belirteci olan ve germ hücrelerinin sitoplazmalarında gözlenen VASA ekspresyonu. (j-k) Pre-Sertoli hücrelerinde ve intersitisyel alan hücrelerinde sitoplazmik olarak gözlenen PARP-2 ekspresyonu (mavi oklar). (l-n) Pre-Sertoli hücrelerinde nükleer olarak gösterilen PAR ekspresyonu (kırmızı oklar). (o-r) Bazale göç eden ve spermatogonyuma farklı hücrelerde PCNA ekspresyonu gösterilmektedir (mor oklar).

#### **4.2.5. Doğum sonrası 9. Günde (DS9) PARP-1, PARP-2 ve PAR ekspresyonları**

Doğum sonrası 9. günde seminifer kordonlar artık seminifer tübül olarak adlandırılmaktadır. Çünkü spermatogonyumlar lümeden bazale göç etmiş ve seminifer tübüller de lümen ortaya çıkmıştır. Bu tübüllerde gözlenen spermatogonyumlar tip A spermatogonyumlardır. Bu hücreler mitoz bölünmelerine devam ederek bir yandan kendi tip A spermatogonyum havuzlarını korumakta, diğer yandan ise tip B spermatogonyumlara farklanmaktadır. Proliferasyonları, bu hücrelerdeki nükleer PCNA ekspresyonu ile gösterilmiştir. Pre-Sertoli hücreleri artık mitotik bölünmelerini tamamlamışlardır. Fakat bu aşamada henüz olgun Sertoli hücresi değildir.

PARP-1 ekspresyonu, DS9. günde spermatogonyumlarda nükleer olarak aynı ekspresyon şiddetinde devam etmektedir. PARP-2 ekspresyonu, pre-Sertoli hücrelerinde ve intersitisyel alandaki hücre gruplarında sitoplazmik olarak izlenmekteyken, tip B spermatogonyumlarda nükleer olarak izlenmektedir. Pre-Sertoli hücre sitoplazmasında azalan PARP-2 ekspresyonu dikkat çekicidir. PAR, DS9. günde hiçbir hücrede ekspres olmamaktadır (Şekil 4.2.5a.).

Ayrıca, DS9. günde testis dokusunun genel görüntüsünü göstermek ve PARP-1, PARP-2 ve PAR ekspresyonlarını; AMH, VASA ve PCNA ekspresyonları ile ilişkilendirmek amacıyla küçük büyütmedeki fotoğraflar da gösterilmektedir (Şekil 4.2.5b).

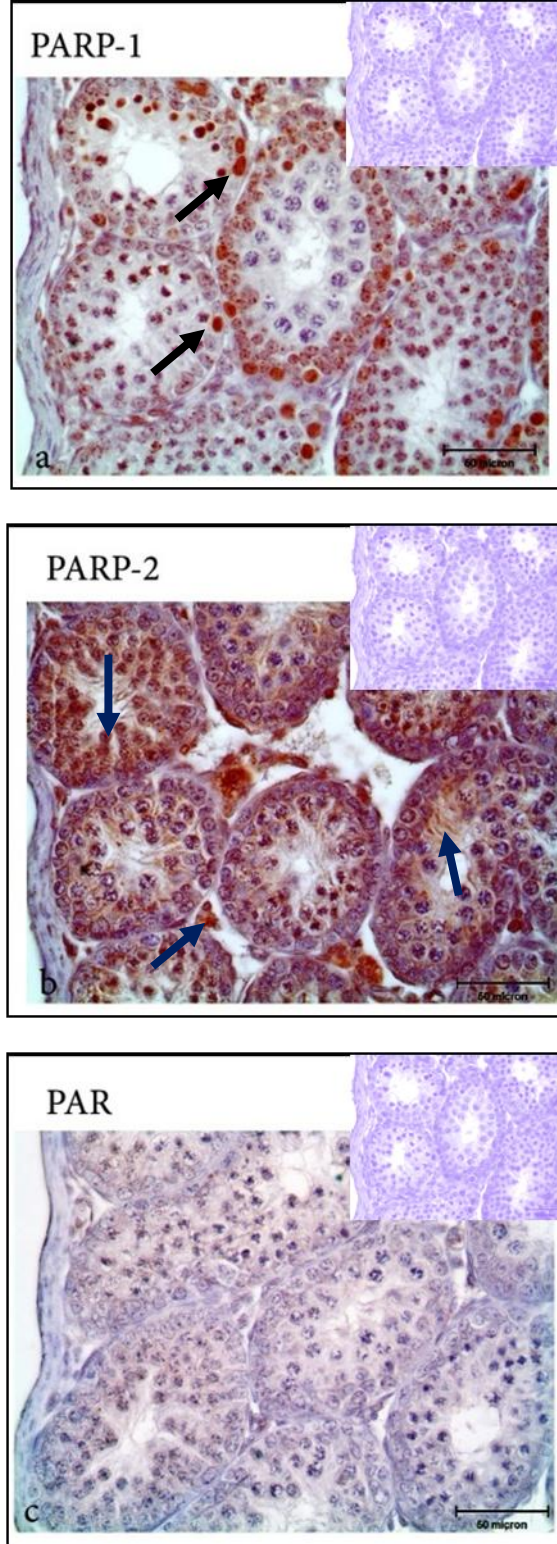
#### **4.2.6. Doğum sonrası 15. günde PARP-1, PARP-2 ve PAR ekspresyonları**

Doğum sonrası 15.günde, seminifer tübüllerde olgunlaşmasına devam eden Sertoli hücrelerinin yanı sıra, tip A ve tip B spermatogonyumlar gözlenmektedir. Bu günde ilk spermatogenik dalga başlar ve mayoz bölünme aşamasında olan spermatositler de izlenir.

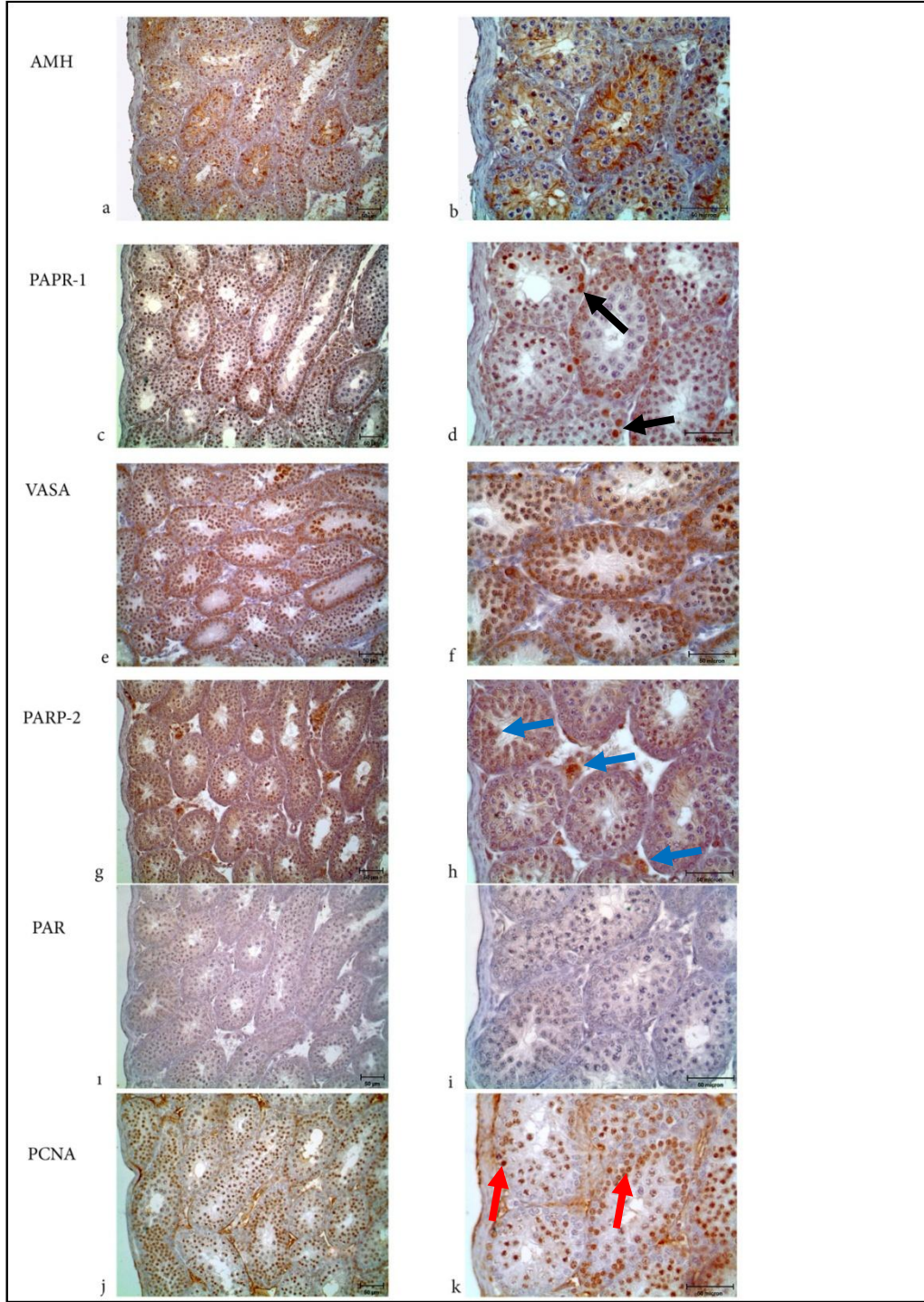
DS15. günde bazale oturmuş halde gözlenen spermatogonyumlarda PARP-1 ekspresyonu nükleer olarak devam etmektedir. PARP-2 ekspresyonu, DS15. günde Sertoli hücrelerinin ve intersitisyel alandaki hücrelerin sitoplazmalarında devam etmektedir. Mayoz bölünme aşamasında olan spermatositlerin sitoplazmalarında da PARP-2 ekspresyonu gösterilmiştir. PAR ekspresyonu, DS15. günde Sertoli hücrelerinin nükleuslarında izlenmektedir (Şekil 4.2.6a.).

Ayrıca, DS15. günde testis dokusunun genel görüntüsünü göstermek ve PARP-1, PARP-2 ve PAR ekspresyonlarını; AMH, VASA ve PCNA ekspresyonları ile ilişkilendirmek amacıyla küçük büyütmedeki fotoğraflar da gösterilmektedir (Şekil 4.2.6b).

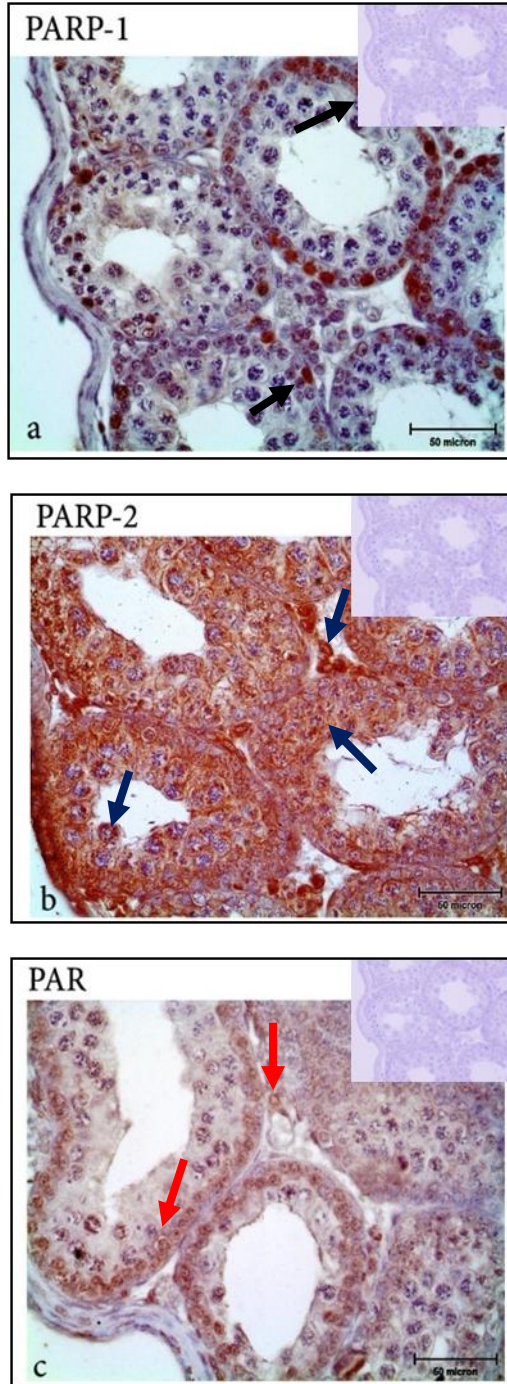




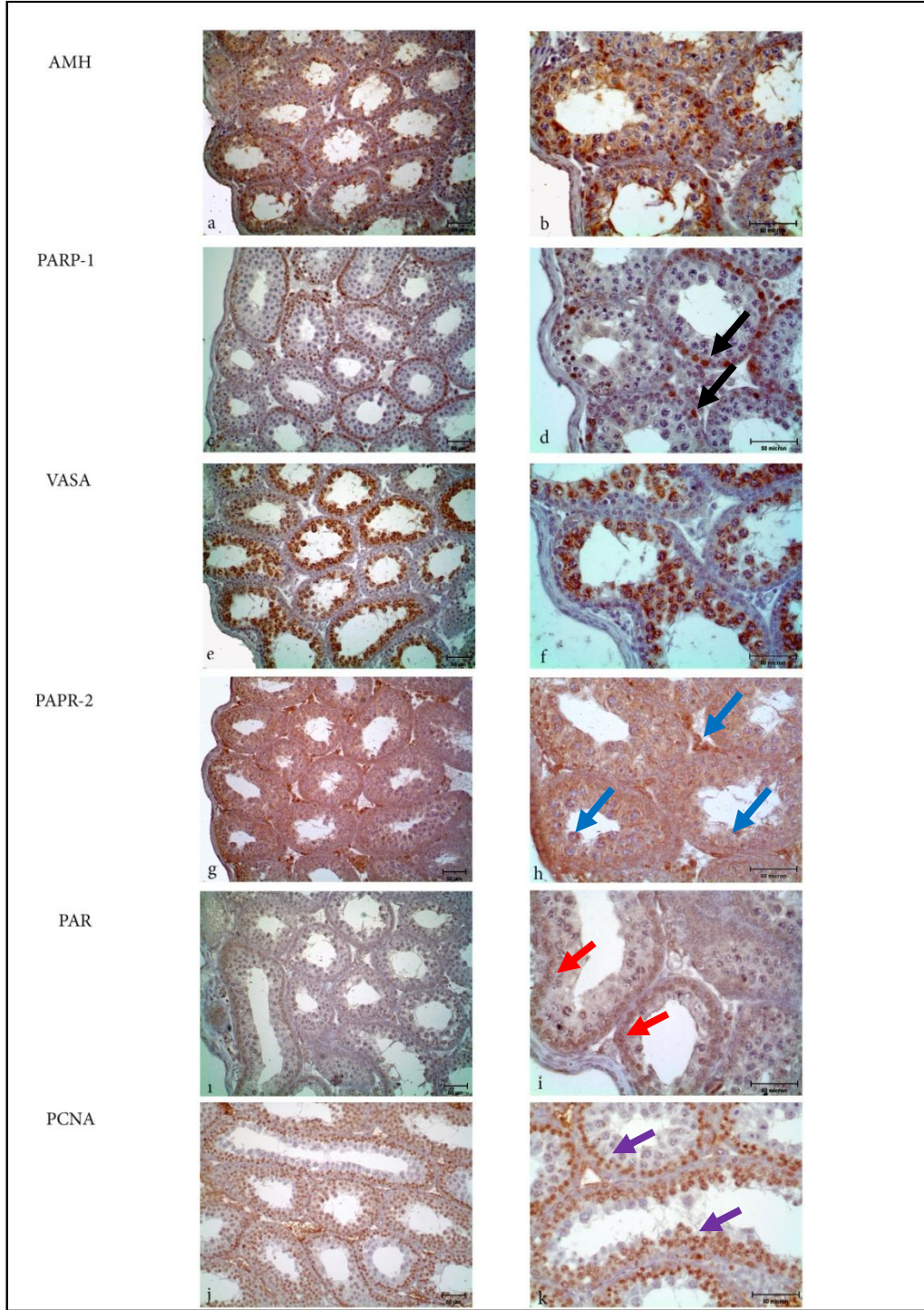
**Şekil 4.2.5a.** Doğum sonrası 9. güne ait fare testisinde PARP-1, PARP-2 ve PAR ekspresyonları. a)Seminifer tübüllerin bazalinde bulunan spermatogonyumların nükleuslarında PARP-1 ekspresyonu (siyah oklar). b) Germ hücrelerinin ve Sertoli hücrelerinin sitoplazmalarında, intersitisyel alanda bulunan hücre gruplarına PARP-2 ekspresyonu (mavi oklar). c) Sertoli hücrelerinin nükleuslarında PAR ekspresyonu gösterilmiştir.



**Şekil 4.2.5b.** Farede doğum sonrası 9. günde seri kesitlerde PARP-1, PARP-2 ve PAR ekspresyonlarının immünohistokimyasal olarak gösterilmesi. (a,b) Seminifer tübüllerin bazalinde bulunan pre-Sertoli hücre sitoplazmalarında AMH ekspresyonu. (c,d) Seminifer tübüllerin bazalinde gösterilen spermatogonyumlarda PARP-1 ekspresyonu (siyah oklar). (e,f) Germ hücre belirteci olan ve germ hücrelerinin sitoplazmalarında gözlenen VASA ekspresyonu. (g,h) Germ hücrelerinde, pre-Sertoli hücrelerinde ve intersitisyel alan hücrelerinde sitoplazmik olarak gösterilen PARP-2 ekspresyonu (mavi oklar). (i,i) PAR ekspresyonu. (j,k) Spermatogonyumların nükleuslarında PCNA ekspresyonu gösterilmektedir (kırmızı oklar).



**Şekil 4.2.6a.** Doğum sonrası 15. güne ait fare testisinde PARP-1, PARP-2 ve PAR ekspresyonları. a) Spermatogonyumların nükleuslarında PARP-1 ekspresyonu (siyah oklar). b) Pakiten evredeki spermatositlerin, Sertoli hücrelerinin sitoplazmalarında ve intersitisyel alanda bulunan hücrelerin sitoplazmalarında PARP-2 ekspresyonu (mavi oklar). c) Sertoli hücrelerinin nükleuslarında PAR ekspresyonu gösterilmiştir (kırmızı oklar).



**Şekil 4.2.6b.** Farede doğum sonrası 15. günde seri kesitlerde PARP-1, PARP-2 ve PAR ekspresyonlarının immünohistokimyasal olarak gösterilmesi. (a,b) Seminifer tübüllerde Sertoli hücrelerinin sitoplazmalarında AMH ekspresyonu. (c,d) Seminifer tübüllerde bazalde görülen spermatogonyumlarda PARP-1 ekspresyonu (siyah oklar). (e,f) Germ hücre belirteci olan ve germ hücrelerinin sitoplazmalarında gözlenen VASA ekspresyonu. (g,h) Sertoli hücrelerinin, intersitisyel alan hücrelerinin ve lümene yakın olarak gözlenen pakiten spermatositlerin sitoplazmalarında PARP-2 ekspresyonu (mavi oklar). (ı,i) Sertoli hücrelerinde nükleer olarak gösterilen PAR ekspresyonu. (j,k) Mitoz bölünmelerle çoğalan hücrelerin nükleuslarında PCNA ekspresyonu gösterilmektedir (mor oklar).

#### **4.2.7. Doğum sonrası 20. günde (DS20) PARP-1, PARP-2 ve PAR ekspresyonları**

Pubertenin başlangıcı olan DS20.günde; Sertoli hücreleri hala AMH ekspresyon etmektedirler. Çevrelediği hücreler arasında tip A ve tip B spermatogonyumlar ile spermatositler ve yuvarlak spermatidler görülmektedir.

PARP-1 ekspresyonu, DS20. günde spermatogonyumların nükleuslarında devam etmektedir. PARP-2 ekspresyonu; DS20. günde intersitisyel alan hücrelerinin, Sertoli hücrelerinin ve spermatositlerin sitoplazmalarında gösterilmiştir. PAR ekspresyonu, DS20. günde mayoz bölünmeler geçiren hücrelerin ve intersitisyel alandaki hücrelerin nükleuslarında gözlenmektedir (Şekil 4.2.7a.).

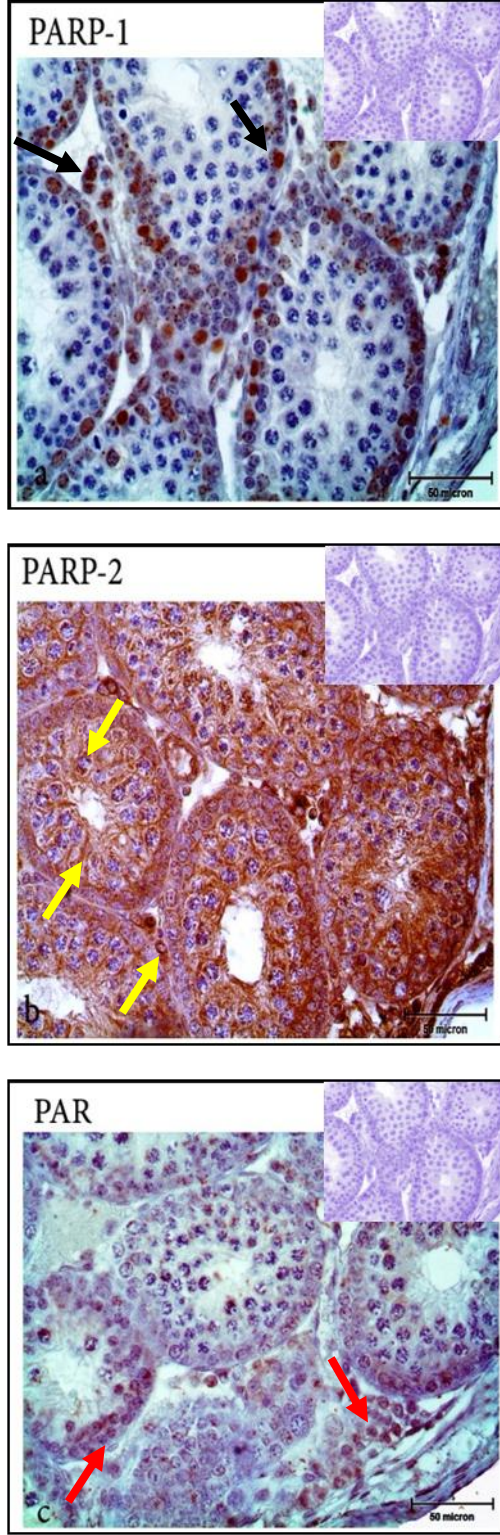
Ayrıca, DS20. günde testis dokusunun genel görüntüsünü göstermek ve PARP-1, PARP-2 ve PAR ekspresyonlarını; AMH, VASA ve PCNA ekspresyonları ile ilişkilendirmek amacıyla küçük büyütmedeki fotoğraflar da gösterilmektedir (Şekil 4.2.7b).

### **4.3. Erişkin fare testisinde immünohistokimyasal bulgular (75, 93, 102, 117)**

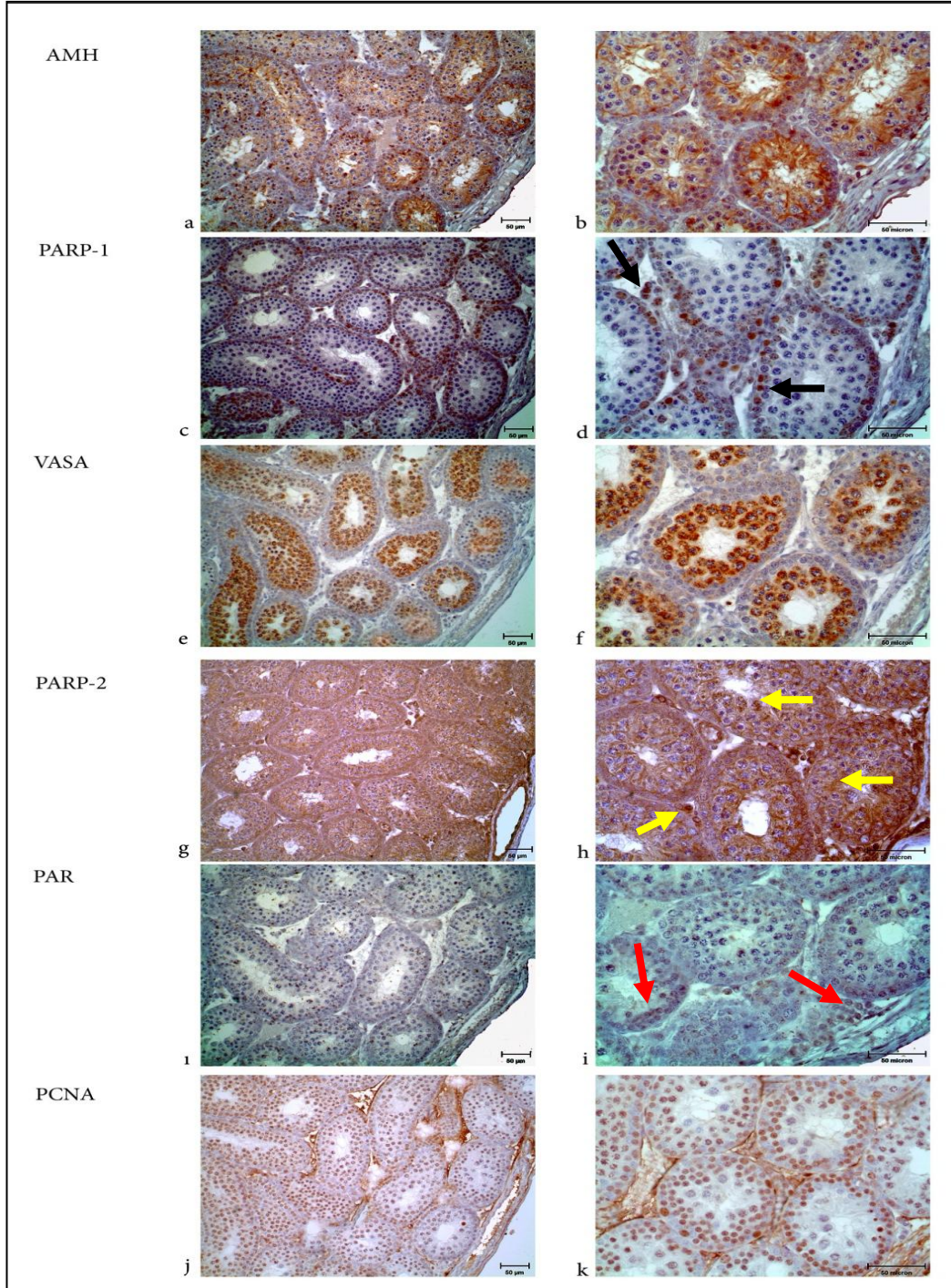
#### **4.3.1. Erişkin dönemde PARP-1, PARP-2 ve PAR ekspresyonları**

Erişkin fare testisinde semifer tübüllerdeki Sertoli hücrelerinde AMH ekspresyonu sonlanmıştır. Çünkü buradaki Sertoli hücreleri artık olgun Sertoli hücreleridirler. Erişkin testis dokusundaki ekspresyonların değerlendirmeleri semifer tübül evrelendirmesi dikkate alınarak yapılmıştır. Nükleer PARP-1 ekspresyonu tüm tübüllerde evre sınıflandırmasından bağımsız olarak spermatogonyumlarda gösterilmiştir. Ayrıca intersitisyel alandaki hücrelerde de nükleer PARP-1 ekspresyonu izlenmektedir. PARP-2 ekspresyonu, tüm evrelerdeki tübüllerin Sertoli hücre sitoplazmalarında ve intersitisyel alan hücrelerinin sitoplazmalarında gözlenmiştir. Semifer tübül evre V ve evre VI'da, PARP-2 uzayan spermatidlerde, hem nükleer hem de sitoplazmik olarak görünmektedir. Evre VII-VII'de ise, PARP-2 ekspresyonu yuvarlak spermatidlerde ve uzayan spermatidlerde nükleer olarak izlenmektedir. PAR ekspresyonu, tüm evrelerdeki spermatogonyumlarda ve intersitisyel alandaki bazı hücrelerde nükleer olarak gözlenmiştir (Şekil 4.3.1a.).

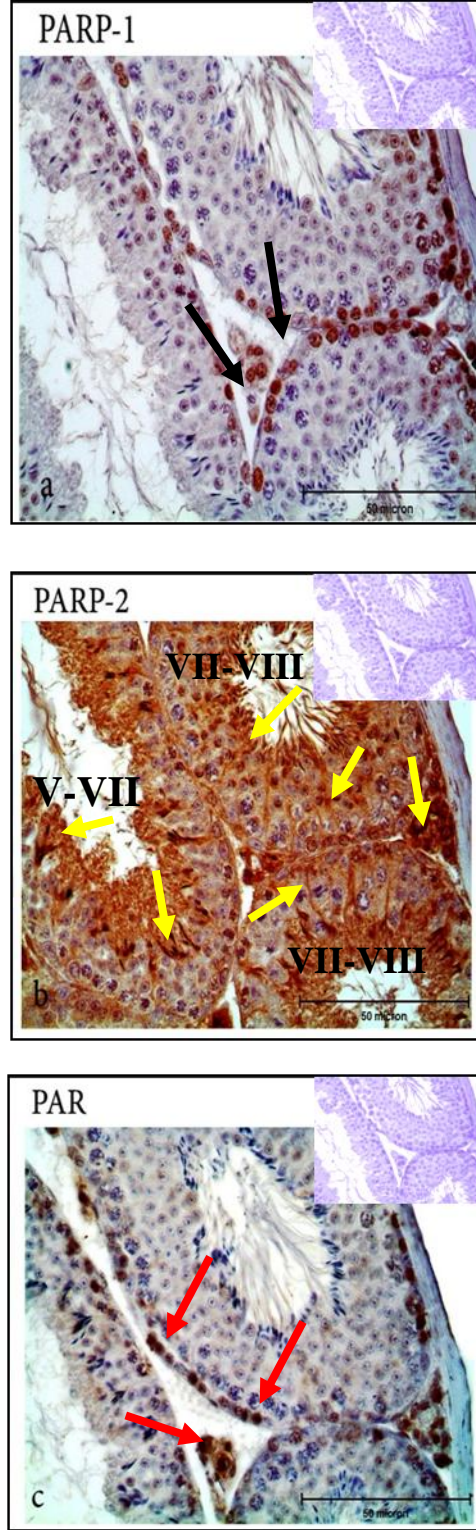
Ayrıca, erişkin testis dokusunun genel görüntüsünü göstermek ve PARP-1, PARP-2 ve PAR ekspresyonlarını; AMH, VASA ve PCNA ekspresyonları ile ilişkilendirmek amacıyla küçük büyütmedeki fotoğraflar da gösterilmektedir (Şekil 4.3.1b.).



**Şekil 4.2.7a.** Doğum sonrası 20. güne ait fare testisinde PARP-1, PARP-2 ve PAR ekspresyonları. a) Spermatogonyumların ve intersitisyel alandaki hücrelerin nükleuslarında PARP-1 ekspresyonu (siyah oklar). b) Spermatozoidlerin, Sertoli hücrelerinin ve intersitisyel alanda bulunan hücrelerin sitoplazmalarında PARP-2 ekspresyonu (sarı oklar). c) İntersitisyel alan hücrelerin ve Sertoli hücrelerinin nükleuslarında PAR ekspresyonu gösterilmiştir (kırmızı oklar).

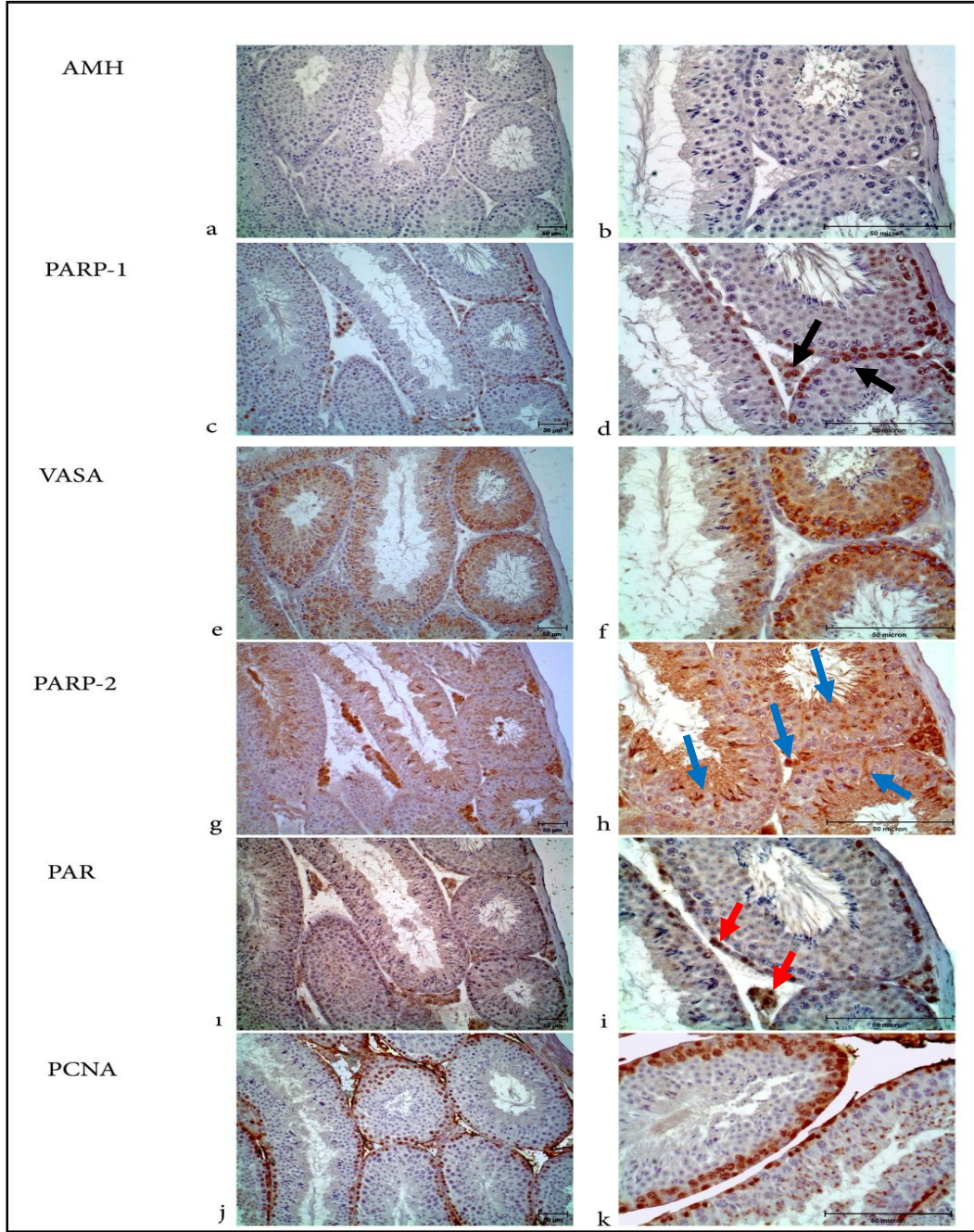


**Şekil 4.2.7b.** Farede doğum sonrası 20. günde seri kesitlerde PARP-1, PARP-2 ve PAR ekspresyonlarının immünohistokimyasal olarak gösterilmesi. (a,b) Sertoli hücre sitoplazmalarında AMH ekspresyonu. (c,d) Seminifer tübüllerinde bazalinde yerleşmiş olarak gözlenen spermatogonyumlarda PARP-1 ekspresyonu (siyah oklar). (e,f) Germ hücre belirteci olan ve germ hücrelerinin sitoplazmalarında gözlenen VASA ekspresyonu. (g,h) Sertoli hücrelerinde, intersitisyel alandaki hücrelerde ve spermatositlerde PARP-2 ekspresyonu (sarı oklar). (i,i) Sertoli hücrelerinin ve intersitisyel alandaki hücrelerin nükleusunda PAR ekspresyonu (kırmızı oklar). (j,k) Mitotik bölünmeler gösteren hücrelerin nükleusunda PCNA ekspresyonu gösterilmektedir.



**Şekil 4.3.1a.** Erişkin fare testisinde seri kesitlerde PARP-1, PARP-2 ve PAR ekspresyonları. a) Spermatogonyumların nükleuslarında PARP-1 ekspresyonu (siyah oklar). b) Sertoli hücrelerinin sitoplazmalarında, intersitisyel alanda bulunan hücrelerin sitoplazmalarında ve evre özgü olarak bazı tübüllerde uzayan spermatidlerin sitoplazma ve nükleuslarında PARP-2 ekspresyonu (mavi oklar). c) İntersitisyel alandaki bazı hücrelerin ve Sertoli hücrelerinin nükleuslarında PAR ekspresyonu gösterilmiştir (kırmızı oklar).





**Şekil 4.3.1b.** Erişkin fare testisinde seri kesitlerde PARP-1, PARP-2 ve PAR ekspresyonlarının immünohistokimyasal olarak gösterilmesi.

(a,b) Sertoli hücre sitoplazmalarında AMH ekspresyonu gözlenmemektedir. (c,d) Seminifer tübüllerin bazalinde yer alan spermatogonyumların ve intersitisyel alandaki bazı hücrelerin nükleuslarında PARP-1 ekspresyonu (siyah oklar). (e,f) Germ hücre belirteci olan ve germ hücrelerinin sitoplazmalarında gözlenen VASA ekspresyonu. (g,h) Sertoli hücrelerinin sitoplazmalarında, uzayan spermatidlerin hem sitoplazmalarında hem de nükleuslarında ve intersitisyel alandaki hücrelerin sitoplazmalarında PARP-2 ekspresyonu (mavi oklar). (i,i) Spermatogonyumlarda ve intersitisyel alandaki hücrelerin nükleuslarında PAR ekspresyonu. (j,k) Mitoz bölünmelerle çoğalan hücrelerin nükleuslarında PCNA ekspresyonu gösterilmektedir.

## TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Normal testis gelişimi; sadece fertil bir gonadın oluşumu için değil aynı zamanda gelişim sürecinden sapmamış bir gonad farklılaşması için de ön koşuldur. Germ hücre tümörlerinin ortaya çıkış mekanizmasının, fetal ve neonatal hayatta gonosit proliferasyonunda ki ve farklılaşmasındaki bozukluklardan kaynaklandığı düşünülmektedir (9). Ayrıca, testis gelişimi sırasında sayılarını arttırarak çoğalan Sertoli destek hücrelerinin yeterli sayıda olması erişkin testiste germ hücre sayısının da belirlenmesinde önemlidir. Dolayısıyla, prenatal dönemde testiste oluşan ve olgunlaşan Sertoli hücreleri belli sayıda germ hücrelerini destekleyerek erkek gonadın fonksiyonuna katılırlar (118). Bu nedenlerle, testis gelişimi sırasında somatik ve germ hücrelerin proliferasyon ve farklılaşmalarının doğru şekilde gerçekleşmesi, normal testis gelişimi açısından önemlidir. Bu sürecin anlaşılabilmesi için fetal ve neonatal dönemde normal testis gelişiminde rol oynayan mekanizmaların aydınlatılması gerekmektedir. PARP ailesi üyeleri olan PARP-1 ve PARP-2, hücre proliferasyonu ve farklılaşmasında rol oynayan proteinlerdir (46). Son yıllarda, erişkin testiste PARP-1 ve PARP-2'nin varlığı ve lokalizasyonu ile PARP aktivitesi sonucunda oluşan PAR polimerlerinin lokalizasyonunu irdeleyen çalışmaları görmek mümkündür (75, 93, 102, 117).

PARP-1 geni silinmiş erkek fareler fertil iken, PARP-2 geni silinen erkek fareler ise hipofertildirler. PARP-1 ve PARP-2 genleri homozigot silinen fareler ise yaşamamaktadırlar (16). PARP-1 geninin tek başına silinmesiyle oluşan canlı ve fertil farelerin, PARP-2 genlerinin de silinmesiyle embriyonik gelişimlerini devam ettirememeleri, PARP-2'nin PARlasyon mekanizmasındaki önemli rolünü ortaya koymaktadır. PARlasyon önemli bir post-translasyonel modifikasyondur ve %90'ı PARP-1 tarafından gerçekleştirilir (57). Buna karşılık; PARP-1 ve PARP-2 çift mutant farelerin embriyonik ölümleri bu iki enzimin birbirlerinden farklı rolleri olabileceğini ortaya koymaktadır.

Bununla birlikte, erişkin testiste varlıkları bilinen ve son yıllarda erkek fertilitesinde rolleri olduğu düşünülen bu proteinlerin testis gelişimi sürecindeki varlıkları ve lokalizasyonları bilinmemektedir. Bu çalışmada; PARP-1 ve PARP-2 enzimlerinin ve bu enzimlerin aktivasyon ürünü olan PAR polimerlerinin somatik ve germ hücrelerindeki ekspresyonları ve lokalizasyonları fare testiküler gelişim sürecinde zamana bağlı olarak değerlendirilmiştir.

İmmünohistokimyasal bulgularımıza göre; PARP-1, E15.5. günde gonositlerde nükleer olarak izlenmiştir. Gonositlerde gözlenen bu ekspresyon, testiküler gelişim için önemli olan ve farklı aşamalarda farklı hücre tipleri içeren E17.5, DS0, DS3. günlerde de devam etmektedir. Doğum sonrası 5. günde gonositler seminifer tübüllerin bazaline göç ederek spermatogonyumlara farkedildiğinde, PARP-1 ekspresyonu bu hücrelerin nükleuslarında gözlenmektedir. Doğum sonrası 9, DS15 ve DS20. günlerde PARP-1 spermatogonyumlarda ekspre olmaktadır. Son olarak,

erişkinde de, PARP-1 ekspresyonu spermatogonyumlarda izlenmektedir. Embriyonik 15.5. günde proliferen gonositlerde izlenen PARP-1 ekspresyonunun E17.5. günde mitotik sessizliğe girmiş gonositlerde de devam etmesi, PARP-1'in gonositlerde sadece proliferasyonla ilgili bir rolü olmadığını düşündürmektedir. Genel olarak; PARP-1 embriyonik, postnatal, puberte ve erişkin dönemlerde kök hücreler olan spermatogonyumlarda ekspre olduğundan, bu molekülün esasen bu hücrelerin farklılaşma ve gelişimlerinde rol oynadığını düşündürmektedir.

PARP enzimlerinin aktivasyon ürünü olan PAR polimerleri, esasen bu enzimlerin ekspre olduğu hücrelerin nükleuslarında üretilir ve fonksiyon görürler (12, 75, 113). Dolayısıyla, üretilen PAR polimerleri nükleustaki hedef proteinlere bağlanarak onların aktivitelerini düzenlerler. PARP-1'in kendisine de PAR polimerleri eklenerek otomodifikasyonu gerçekleşir ve aktivitesi genellikle bu şekilde sonlandırılır (57). Bizim bulgularımıza göre; PAR polimerlerinin, PARP-1 ekspre eden gonositlerde ya da puberte öncesindeki spermatogonyumlarda gözlenmemesi, PARP-1'in gelişim aşamalarında gonosit ve spermatogonyumlarda PAR üretiminden farklı bir fizyolojik rolü olabileceğini düşündürmektedir. Literatürde PARP-1'in PAR üretiminden bağımsız olarak, hücredeki bazı proteinlerle direkt ilişkiye girip onların fonksiyonlarına katıldığı bilinmektedir (15, 104). Hücre bölünmeleri sırasında meydana gelen DNA kırıklarının tamirinde PARP-1'in önemli rol oynadığı bilindiğinden, bulgularımız gonosit ve spermatogonyumlarda da bu mekanizmalarda rol alabileceğini düşündürmektedir. Bunu kanıtlayan çalışmalar, gonad kültürlerinde PARP-1 inhibisyonu sonrasında DNA tamir proteinlerinin düzeylerinin araştırılmasıyla gerçekleştirilebilir. Erişkin dönemde ise, PARP-1 ve PAR polimerlerinin spermatogonyum nükleuslarında birlikte gözlenmesi, erişkin testiste PARP-1 aktivasyonunun esasen PARlasyon mekanizması ile ilişkili olabileceğini ortaya koymaktadır. Daha önce sıçanlarda ve insanlarda yapılan çalışmaların sonuçları da bu yöndedir (119).

PAR ekspresyonunun; testiküler gelişimin E15.5. gününden itibaren pre-Sertoli hücre nükleusunda başladığı ve DS0, DS3, DS5, DS9, DS15 ve DS20. günlerinde devam ettiği bulgularımızda gösterilmiştir. Erişkin döneme kadar olan testiküler gelişim aşamalarında Sertoli hücre nükleusunda ekspre olan PAR'ın bu hücrelerdeki üretimi, başka bir PARP ailesi üyesinin aktivasyonu sonucunda ortaya çıkmış olabilir. Bu nedenle, diğer PARP ailesi üyelerinin testis gelişimi süreçlerinde araştırılması gerekmektedir. Nükleer PAR polimerleri üretimi erişkin testiste Sertoli hücrelerinde değil, PARP-1 ile birlikte spermatogonyumlarda izlenmektedir ve burada PARlasyon mekanizmasının varlığını ortaya koymaktadır. Bulgularımız, PARlasyonun puberte öncesinde Sertoli hücre proliferasyonuna ve olgunlaşmasına bir etkisi olabileceğine dikkat çekmektedir. Çünkü, erişkin testiste olgun Sertoli hücresinde AMH ile paralellik göstererek, PAR ekspresyonu da ortadan kalkmıştır. Ayrıca, testisin diğer somatik hücreleri olan intersitisyel alan hücrelerinin bazılarında da PAR ekspresyonu gelişim süresince nükleer olarak izlenmektedir.

Testiküler gelişim sürecinde PARP-2, PARP-1'den farklı olarak, esasen sitoplazmik olarak ekspre olmaktadır. Nükleer PARP-2 ekspresyonu, erişkin testiste sadece bazı yuvarlak spermatidlerde ve uzayan spermatidlerin başlarında seminifer tübül evresine özgü olarak gözlenmiştir. PARP-2'nin sitoplazmik ve nükleer

ekspresyonu fare akciğer gelişim dönemlerinde de farklı hücrelerde bildirilmiştir (120). Bulgularımıza göre; PARP-2 ekspresyonu, tüm gelişim evrelerinde ve erişkin testiste, germ hücrelerinde, Sertoli hücrelerinde ve intersitisyel alanda yer alan hücre gruplarında gözlenmiştir. Embriyonik 15.5. günde gonositlerin sitoplazmasında yer alan PARP-2 ekspresyonu, E17.5, DS0 ve DS3. günlerde aynı hücrelerde devam etmektedir. Gonositlerin spermatogonyuma farkedildiği DS5.günde PARP-2 ekspresyonu bu hücrelerde izlenmemiştir. Bu farklanma aşamasında PARP-2'nin rolü olmadığını düşündürmektedir. Doğum sonrası 9. günde tip A spermatogonyumlara farkedilen hücreler mitoz bölünmelerine devam etmektedirler. Burada havuza katılan tip B spermatogonyumlarla birlikte PARP-2 ekspresyonu yeniden spermatogonyumların sitoplazmasında izlenmiştir. Spermatogenezin ilk dalgasının başladığı DS15. günde mayoz bölünmeler devam etmektedir ve PARP-2 ekspresyonu mayoz bölünmelere başlayan spermatositlerde izlenmiştir. DS20. günde mayoz bölünmelerine devam eden spermatositlerde PARP-2'nin varlığı devam etmektedir. Erişkin testiste ise; spermatogenik seriye katılan yuvarlak spermatidlerde ve uzayan spermatidlerde evreye özgü olarak hem nükleer hem de sitoplazmik PARP-2 ekspresyonu gözlenmiştir. PARP-2 ekspresyonunun, PARP-1'den farklı olarak, sadece spermatogonyumlarda değil, mayoz bölünmeler ve spermiyogenezin gerçekleştiği hücrelerde de rolü olabileceğini düşündürmektedir.

PARP-2'nin PARP-1'den farklı olarak, testiküler gelişim sürecinde, somatik hücrelerde de varlığı gösterilmiştir. Sertoli hücrelerindeki ve intersitisyel alandaki hücrelerde E15.5. günde başlayan sitoplazmik PARP-2 ekspresyonu, gelişimin diğer günleri olan E17.5, DS0, DS3, DS5, DS9, DS15 ve DS20.günlerde de varlığını korumuştur ve erişkin dönemde de bu hücrelerde sitoplazmik olarak izlenmiştir. PARP-2'nin testiküler gelişimde farklı hücrelerdeki lokalizasyonları, bu proteinin hem somatik hem de germ hücrelerinin gelişimlerinde fizyolojik bir rolü olabileceğini düşündürmektedir. Dolayısıyla, PARP-1 ve PARP-2'nin proliferasyon ve farklılaşma süreçlerini kapsayan testis gelişimi süresince farklı hücre tiplerinde, farklı rollere sahip olabileceği sonucu ortaya çıkmaktadır.

Sonuç olarak; PARP ailesinin önemli iki üyesi olan PARP-1 ve PARP-2'nin ve onların ürünü olan PAR'ın testis gelişimindeki ekspresyon ve lokalizasyonlarını değerlendiren bu çalışmada, literatürde erişkin testiste varlığı bilinen PARP proteinlerinin, testiste gelişimsel dönemde hangi hücrelerde ekspre oldukları ilk defa gösterilmiştir. PARP-1 ve PARP-2'nin gelişim döneminde hangi sinyal yollarıyla etkileştiği yönündeki çalışmaların planlanması ile bu proteinlerin rollerinin aydınlatılması önemlidir. Aynı zamanda, sonuçlarımız, erişkinde erkek fertilitesi için önemli olduğu bildirilen bu proteinlerin, embriyonik ve pre-pubertal testis gelişiminde de rolleri olabileceğini ortaya koymaktadır.

## KAYNAKLAR

1. Hacker, A., Capel, B., Goodfellow, P., and Lovell-Badge, R. (1995) Expression of Sry, the mouse sex determining gene. *Development* **121**, 1603-1614
2. Koopman, P., Munsterberg, A., Capel, B., Vivian, N., and Lovell-Badge, R. (1990) Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature* **348**, 450-452
3. Rossi, P., Dolci, S., Albanesi, C., Grimaldi, P., and Geremia, R. (1993) Direct evidence that the mouse sex-determining gene Sry is expressed in the somatic cells of male fetal gonads and in the germ cell line in the adult testis. *Mol Reprod Dev* **34**, 369-373
4. de Kretser, D. M., Loveland, K. L., Meinhardt, A., Simorangkir, D., and Wreford, N. (1998) Spermatogenesis. *Hum Reprod* **13 Suppl 1**, 1-8
5. Orth, J. M., Gunsalus, G. L., and Lamperti, A. A. (1988) Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology* **122**, 787-794
6. Rodriguez, I., Ody, C., Araki, K., Garcia, I., and Vassalli, P. (1997) An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *EMBO J* **16**, 2262-2270
7. Wang, R. A., Nakane, P. K., and Koji, T. (1998) Autonomous cell death of mouse male germ cells during fetal and postnatal period. *Biol Reprod* **58**, 1250-1256
8. Shiokawa, M., Masutani, M., Fujihara, H., Ueki, K., Nishikawa, R., Sugimura, T., Kubo, H., and Nakagama, H. (2005) Genetic alteration of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in human germ cell tumors. *Jpn J Clin Oncol* **35**, 97-102
9. Mego, M. (2006) Cancer stem cell in relapsed testicular germ cell cancer: embryonic or somatic? *Int J Androl* **29**, 627
10. Laniel, M. A., Bergeron, M. J., Poirier, G. G., and Guerin, S. L. (1997) A nuclear factor other than Sp1 binds the GC-rich promoter of the gene encoding rat poly(ADP-ribose) polymerase in vitro. *Biochem Cell Biol* **75**, 427-434

11. Meyer-Ficca, M. L., Meyer, R. G., Jacobson, E. L., and Jacobson, M. K. (2005) Poly(ADP-ribose) polymerases: managing genome stability. *Int J Biochem Cell Biol* **37**, 920-926
12. Atorino, L., Alvarez-Gonzalez, R., Cardone, A., Lepore, I., Farina, B., and Quesada, P. (2000) Metabolic changes in the poly(ADP-ribosyl)ation pathway of differentiating rat germinal cells. *Arch Biochem Biophys* **381**, 111-118
13. Meyer-Ficca, M. L., Scherthan, H., Burkle, A., and Meyer, R. G. (2005) Poly(ADP-ribosyl)ation during chromatin remodeling steps in rat spermiogenesis. *Chromosoma* **114**, 67-74
14. Alcivar, A. A., Hake, L. E., and Hecht, N. B. (1992) DNA polymerase-beta and poly(ADP)ribose polymerase mRNAs are differentially expressed during the development of male germinal cells. *Biol Reprod* **46**, 201-207
15. Li, Y., Oh, H. J., and Lau, Y. F. (2006) The poly(ADP-ribose) polymerase 1 interacts with Sry and modulates its biological functions. *Mol Cell Endocrinol* **257-258**, 35-46
16. Dantzer, F., Mark, M., Quenet, D., Scherthan, H., Huber, A., Liebe, B., Monaco, L., Chicheportiche, A., Sassone-Corsi, P., de Murcia, G., and Menissier-de Murcia, J. (2006) Poly(ADP-ribose) polymerase-2 contributes to the fidelity of male meiosis I and spermiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 14854-14859
17. Abraham L.Kierszenbaum, M., PhD, ed (2006) *Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş*
18. O.Söder, ed (2003) *The Developing Testis: Physiology and Pathophysiology* Vol. 5
19. Karl, J., and Capel, B. (1998) Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. *Dev Biol* **203**, 323-333
20. Vergouwen, R. P., Jacobs, S. G., Huiskamp, R., Davids, J. A., and de Rooij, D. G. (1991) Proliferative activity of gonocytes, Sertoli cells and interstitial cells during testicular development in mice. *J Reprod Fertil* **93**, 233-243
21. Koopman, P., Gubbay, J., Vivian, N., Goodfellow, P., and Lovell-Badge, R. (1991) Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature* **351**, 117-121
22. Merchant-Larios, H., and Moreno-Mendoza, N. (1998) Mesonephric stromal cells differentiate into Leydig cells in the mouse fetal testis. *Exp Cell Res* **244**, 230-238

23. Saez, J. M. (1994) Leydig cells: endocrine, paracrine, and autocrine regulation. *Endocr Rev* **15**, 574-626
24. Combes, A. N., Wilhelm, D., Davidson, T., Dejana, E., Harley, V., Sinclair, A., and Koopman, P. (2009) Endothelial cell migration directs testis cord formation. *Dev Biol* **326**, 112-120
25. Buehr, M., Gu, S., and McLaren, A. (1993) Mesonephric contribution to testis differentiation in the fetal mouse. *Development* **117**, 273-281
26. Martineau, J., Nordqvist, K., Tilmann, C., Lovell-Badge, R., and Capel, B. (1997) Male-specific cell migration into the developing gonad. *Curr Biol* **7**, 958-968
27. Aydos, D. K. (2010) [www.androloji.info](http://www.androloji.info).
28. Wylie, C. (1999) Germ cells. *Cell* **96**, 165-174
29. Ginsburg, M., Snow, M. H., and McLaren, A. (1990) Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development* **110**, 521-528
30. Godin, I., and Wylie, C. C. (1991) TGF beta 1 inhibits proliferation and has a chemotropic effect on mouse primordial germ cells in culture. *Development* **113**, 1451-1457
31. Tam, P. P., and Snow, M. H. (1981) Proliferation and migration of primordial germ cells during compensatory growth in mouse embryos. *J Embryol Exp Morphol* **64**, 133-147
32. Gubbay, J., Collignon, J., Koopman, P., Capel, B., Economou, A., Munsterberg, A., Vivian, N., Goodfellow, P., and Lovell-Badge, R. (1990) A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* **346**, 245-250
33. Sinclair, A. H., Berta, P., Palmer, M. S., Hawkins, J. R., Griffiths, B. L., Smith, M. J., Foster, J. W., Frischauf, A. M., Lovell-Badge, R., and Goodfellow, P. N. (1990) A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* **346**, 240-244
34. Gaskell, T. L., Esnal, A., Robinson, L. L., Anderson, R. A., and Saunders, P. T. (2004) Immunohistochemical profiling of germ cells within the human fetal testis: identification of three subpopulations. *Biol Reprod* **71**, 2012-2021
35. Baillie, A. H. (1964) The Histochemistry and Ultrastructure of the Genocyte. *J Anat* **98**, 641-645

36. Matsui, Y. (1998) Developmental fates of the mouse germ cell line. *Int J Dev Biol* **42**, 1037-1042
37. Russell, L. (1990) Histological and histopathological evaluation of the testis. *Cache River Press Eds.*
38. de Rooij, D. G., and Russell, L. D. (2000) All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J Androl* **21**, 776-798
39. Cheng, C. Y., ed (2008) *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis* Vol. 636
40. Hess, R. A. (1990) Quantitative and qualitative characteristics of the stages and transitions in the cycle of the rat seminiferous epithelium: light microscopic observations of perfusion-fixed and plastic-embedded testes. *Biol Reprod* **43**, 525-542
41. Russell, L. (1977) Movement of spermatocytes from the basal to the adluminal compartment of the rat testis. *Am J Anat* **148**, 313-328
42. Russell, L. D., and Malone, J. P. (1980) A study of Sertoli-spermatid tubulobulbar complexes in selected mammals. *Tissue Cell* **12**, 263-285
43. Leblond, C. P., and Clermont, Y. (1952) Spermiogenesis of rat, mouse, hamster and guinea pig as revealed by the periodic acid-fuchsin sulfurous acid technique. *Am J Anat* **90**, 167-215
44. Schreiber, V., Dantzer, F., Ame, J. C., and de Murcia, G. (2006) Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 517-528
45. Burkle, A. (2005) Poly(ADP-ribose). The most elaborate metabolite of NAD<sup>+</sup>. *Febs J* **272**, 4576-4589
46. Ame, J. C., Spenlehauer, C., and de Murcia, G. (2004) The PARP superfamily. *Bioessays* **26**, 882-893
47. Otto, H., Reche, P. A., Bazan, F., Dittmar, K., Haag, F., and Koch-Nolte, F. (2005) In silico characterization of the family of PARP-like poly(ADP-ribosyl)transferases (pARTs). *BMC Genomics* **6**, 139
48. Dantzer, F., de La Rubia, G., Menissier-De Murcia, J., Hostomsky, Z., de Murcia, G., and Schreiber, V. (2000) Base excision repair is impaired in mammalian cells lacking Poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Biochemistry* **39**, 7559-7569



49. Schreiber, V., Ame, J. C., Dolle, P., Schultz, I., Rinaldi, B., Fraulob, V., Menissier-de Murcia, J., and de Murcia, G. (2002) Poly(ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) is required for efficient base excision DNA repair in association with PARP-1 and XRCC1. *J Biol Chem* **277**, 23028-23036
50. Hassa, P. O., and Hottiger, M. O. (2008) The diverse biological roles of mammalian PARPS, a small but powerful family of poly-ADP-ribose polymerases. *Front Biosci* **13**, 3046-3082
51. Wacker, D. A., Frizzell, K. M., Zhang, T., and Kraus, W. L. (2007) Regulation of chromatin structure and chromatin-dependent transcription by poly(ADP-ribose) polymerase-1: possible targets for drug-based therapies. *Subcell Biochem* **41**, 45-69
52. Menissier de Murcia, J., Ricoul, M., Tartier, L., Niedergang, C., Huber, A., Dantzer, F., Schreiber, V., Ame, J. C., Dierich, A., LeMeur, M., Sabatier, L., Chambon, P., and de Murcia, G. (2003) Functional interaction between PARP-1 and PARP-2 in chromosome stability and embryonic development in mouse. *Embo J* **22**, 2255-2263
53. Berghammer, H., Ebner, M., Marksteiner, R., and Auer, B. (1999) pADPRT-2: a novel mammalian polymerizing(ADP-ribosyl)transferase gene related to truncated pADPRT homologues in plants and *Caenorhabditis elegans*. *FEBS Lett* **449**, 259-263
54. Johansson, M. (1999) A human poly(ADP-ribose) polymerase gene family (ADPRTL): cDNA cloning of two novel poly(ADP-ribose) polymerase homologues. *Genomics* **57**, 442-445
55. Ame, J. C., Rolli, V., Schreiber, V., Niedergang, C., Apiou, F., Decker, P., Muller, S., Hoger, T., Menissier-de Murcia, J., and de Murcia, G. (1999) PARP-2, A novel mammalian DNA damage-dependent poly(ADP-ribose) polymerase. *J Biol Chem* **274**, 17860-17868
56. Pion, E., Ullmann, G. M., Ame, J. C., Gerard, D., de Murcia, G., and Bombarda, E. (2005) DNA-induced dimerization of poly(ADP-ribose) polymerase-1 triggers its activation. *Biochemistry* **44**, 14670-14681
57. Schreiber, V. (2004) PARP-2, structure-function relationship. In *In Poly(ADP-ribosylation)* (Burkle, A., ed)
58. Ruf, A., Menissier de Murcia, J., de Murcia, G., and Schulz, G. E. (1996) Structure of the catalytic fragment of poly(AD-ribose) polymerase from chicken. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 7481-7485

59. Oliver, A. W., Ame, J. C., Roe, S. M., Good, V., de Murcia, G., and Pearl, L. H. (2004) Crystal structure of the catalytic fragment of murine poly(ADP-ribose) polymerase-2. *Nucleic Acids Res* **32**, 456-464
60. Lengauer, C., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1998) Genetic instabilities in human cancers. *Nature* **396**, 643-649
61. Mortusewicz, O., Ame, J. C., Schreiber, V., and Leonhardt, H. (2007) Feedback-regulated poly(ADP-ribosylation) by PARP-1 is required for rapid response to DNA damage in living cells. *Nucleic Acids Res* **35**, 7665-7675
62. El-Khamisy, S. F., Masutani, M., Suzuki, H., and Caldecott, K. W. (2003) A requirement for PARP-1 for the assembly or stability of XRCC1 nuclear foci at sites of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Res* **31**, 5526-5533
63. Lan, L., Nakajima, S., Oohata, Y., Takao, M., Okano, S., Masutani, M., Wilson, S. H., and Yasui, A. (2004) In situ analysis of repair processes for oxidative DNA damage in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 13738-13743
64. Okano, S., Lan, L., Caldecott, K. W., Mori, T., and Yasui, A. (2003) Spatial and temporal cellular responses to single-strand breaks in human cells. *Mol Cell Biol* **23**, 3974-3981
65. Winstall, E., Affar, E. B., Shah, R., Bourassa, S., Scovassi, I. A., and Poirier, G. G. (1999) Preferential perinuclear localization of poly(ADP-ribose) glycohydrolase. *Exp Cell Res* **251**, 372-378
66. Koh, D. W., Lawler, A. M., Poitras, M. F., Sasaki, M., Wattler, S., Nehls, M. C., Stoger, T., Poirier, G. G., Dawson, V. L., and Dawson, T. M. (2004) Failure to degrade poly(ADP-ribose) causes increased sensitivity to cytotoxicity and early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 17699-17704
67. McPherson, S., and Longo, F. J. (1993) Chromatin structure-function alterations during mammalian spermatogenesis: DNA nicking and repair in elongating spermatids. *Eur J Histochem* **37**, 109-128
68. Davidovic, L., Vodenicharov, M., Affar, E. B., and Poirier, G. G. (2001) Importance of poly(ADP-ribose) glycohydrolase in the control of poly(ADP-ribose) metabolism. *Exp Cell Res* **268**, 7-13
69. Heeres, J. T., and Hergenrother, P. J. (2007) Poly(ADP-ribose) makes a date with death. *Curr Opin Chem Biol* **11**, 644-653
70. Kraus, W. L., and Lis, J. T. (2003) PARP goes transcription. *Cell* **113**, 677-683

71. Rouleau, M., Aubin, R. A., and Poirier, G. G. (2004) Poly(ADP-ribosyl)ated chromatin domains: access granted. *J Cell Sci* **117**, 815-825
72. Burkle, A. (2006) *Poly (ADP-Ribosylation)*, Landes Bioscience, Konstanz, Germany
73. Pleschke, J. M., Kleczkowska, H. E., Strohm, M., and Althaus, F. R. (2000) Poly(ADP-ribose) binds to specific domains in DNA damage checkpoint proteins. *J Biol Chem* **275**, 40974-40980
74. von Kobbe, C., Harrigan, J. A., Schreiber, V., Stiegler, P., Piotrowski, J., Dawut, L., and Bohr, V. A. (2004) Poly(ADP-ribose) polymerase 1 regulates both the exonuclease and helicase activities of the Werner syndrome protein. *Nucleic Acids Res* **32**, 4003-4014
75. D'Amours, D., Desnoyers, S., D'Silva, I., and Poirier, G. G. (1999) Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem J* **342** ( Pt 2), 249-268
76. Saxena, A., Wong, L. H., Kalitsis, P., Earle, E., Shaffer, L. G., and Choo, K. H. (2002) Poly(ADP-ribose) polymerase 2 localizes to mammalian active centromeres and interacts with PARP-1, Cenpa, Cenpb and Bub3, but not Cenpc. *Hum Mol Genet* **11**, 2319-2329
77. Dantzer, F., Giraud-Panis, M. J., Jaco, I., Ame, J. C., Schultz, I., Blasco, M., Koering, C. E., Gilson, E., Menissier-de Murcia, J., de Murcia, G., and Schreiber, V. (2004) Functional interaction between poly(ADP-Ribose) polymerase 2 (PARP-2) and TRF2: PARP activity negatively regulates TRF2. *Mol Cell Biol* **24**, 1595-1607
78. Griffith, J. D., Comeau, L., Rosenfield, S., Stansel, R. M., Bianchi, A., Moss, H., and de Lange, T. (1999) Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* **97**, 503-514
79. Cook, B. D., Dynek, J. N., Chang, W., Shostak, G., and Smith, S. (2002) Role for the related poly(ADP-Ribose) polymerases tankyrase 1 and 2 at human telomeres. *Mol Cell Biol* **22**, 332-342
80. Augustin, A., Spenlehauer, C., Dumond, H., Menissier-De Murcia, J., Piel, M., Schmit, A. C., Apiou, F., Vonesch, J. L., Kock, M., Bornens, M., and De Murcia, G. (2003) PARP-3 localizes preferentially to the daughter centriole and interferes with the G1/S cell cycle progression. *J Cell Sci* **116**, 1551-1562
81. Kanai, M., Tong, W. M., Sugihara, E., Wang, Z. Q., Fukasawa, K., and Miwa, M. (2003) Involvement of poly(ADP-Ribose) polymerase 1 and poly(ADP-Ribosylation) in regulation of centrosome function. *Mol Cell Biol* **23**, 2451-2462

82. Tarapore, P., Tokuyama, Y., Horn, H. F., and Fukasawa, K. (2001) Difference in the centrosome duplication regulatory activity among p53 'hot spot' mutants: potential role of Ser 315 phosphorylation-dependent centrosome binding of p53. *Oncogene* **20**, 6851-6863
83. Petrilli, V., Herceg, Z., Hassa, P. O., Patel, N. S., Di Paola, R., Cortes, U., Dugo, L., Filipe, H. M., Thiemermann, C., Hottiger, M. O., Cuzzocrea, S., and Wang, Z. Q. (2004) Noncleavable poly(ADP-ribose) polymerase-1 regulates the inflammation response in mice. *J Clin Invest* **114**, 1072-1081
84. Ogawa, T., Ito, C., Nakamura, T., Tamura, Y., Yamamoto, T., Noda, T., Kubota, Y., and Toshimori, K. (2004) Abnormal sperm morphology caused by defects in Sertoli cells of Cnot7 knockout mice. *Arch Histol Cytol* **67**, 307-314
85. Suzuki-Toyota, F., Ito, C., Toyama, Y., Maekawa, M., Yao, R., Noda, T., Iida, H., and Toshimori, K. (2007) Factors maintaining normal sperm tail structure during epididymal maturation studied in Gopc<sup>-/-</sup> mice. *Biol Reprod* **77**, 71-82
86. Toshimori, K., Ito, C., Maekawa, M., Toyama, Y., Suzuki-Toyota, F., and Saxena, D. K. (2004) Impairment of spermatogenesis leading to infertility. *Anat Sci Int* **79**, 101-111
87. Aitken, R. J., and De Iuliis, G. N. (2007) Origins and consequences of DNA damage in male germ cells. *Reprod Biomed Online* **14**, 727-733
88. Amiri, I., Sheikh, N., and Najafi, R. (2007) Nitric oxide level in seminal plasma and its relation with sperm DNA damages. *Iran Biomed J* **11**, 259-264
89. Kappes, F., Fahrner, J., Khodadoust, M. S., Tabbert, A., Strasser, C., Mor-Vaknin, N., Moreno-Villanueva, M., Burkle, A., Markovitz, D. M., and Ferrando-May, E. (2008) DEK is a poly(ADP-ribose) acceptor in apoptosis and mediates resistance to genotoxic stress. *Mol Cell Biol* **28**, 3245-3257
90. Tripathi, D. N., and Jena, G. B. (2008) Astaxanthin inhibits cytotoxic and genotoxic effects of cyclophosphamide in mice germ cells. *Toxicology* **248**, 96-103
91. El-Domyati, M. M., Al-Din, A. B., Barakat, M. T., El-Fakahany, H. M., Honig, S., Xu, J., and Sakkas, D. The expression and distribution of deoxyribonucleic acid repair and apoptosis markers in testicular germ cells of infertile varicocele patients resembles that of old fertile men. *Fertil Steril* **93**, 795-801
92. Patrizio, P., Sanguineti, F., and Sakkas, D. (2008) Modern andrology: from semen analysis to postgenomic studies of the male gametes. *Ann N Y Acad Sci* **1127**, 59-63

93. Sakkas, D., Moffatt, O., Manicardi, G. C., Mariethoz, E., Tarozzi, N., and Bizzaro, D. (2002) Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol Reprod* **66**, 1061-1067
94. Seli, E., and Sakkas, D. (2005) Spermatozoal nuclear determinants of reproductive outcome: implications for ART. *Hum Reprod Update* **11**, 337-349
95. Tesarik, J., Mendoza-Tesarik, R., and Mendoza, C. (2006) Sperm nuclear DNA damage: update on the mechanism, diagnosis and treatment. *Reprod Biomed Online* **12**, 715-721
96. Laberge, R. M., and Boissonneault, G. (2005) Chromatin remodeling in spermatids: a sensitive step for the genetic integrity of the male gamete. *Arch Androl* **51**, 125-133
97. Laberge, R. M., and Boissonneault, G. (2005) On the nature and origin of DNA strand breaks in elongating spermatids. *Biol Reprod* **73**, 289-296
98. Aguilar-Mahecha, A., Hales, B. F., and Robaire, B. (2001) Acute cyclophosphamide exposure has germ cell specific effects on the expression of stress response genes during rat spermatogenesis. *Mol Reprod Dev* **60**, 302-311
99. Baum, J. S., St George, J. P., and McCall, K. (2005) Programmed cell death in the germline. *Semin Cell Dev Biol* **16**, 245-259
100. Print, C. G., and Loveland, K. L. (2000) Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis. *Bioessays* **22**, 423-430
101. Codelia, V. A., Cisternas, P., and Moreno, R. D. (2008) Relevance of caspase activity during apoptosis in pubertal rat spermatogenesis. *Mol Reprod Dev* **75**, 881-889
102. Ohashi, Y., Ueda, K., Kawaichi, M., and Hayaishi, O. (1983) Activation of DNA ligase by poly(ADP-ribose) in chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 3604-3607
103. Spina-Purrello, V., Patti, D., Giuffrida-Stella, A. M., and Nicoletti, V. G. (2008) Parp and cell death or protection in rat primary astroglial cell cultures under LPS/IFN $\gamma$  induced proinflammatory conditions. *Neurochem Res* **33**, 2583-2592
104. Tanori, M., Mancuso, M., Pasquali, E., Leonardi, S., Rebessi, S., Di Majo, V., Guilly, M. N., Giangaspero, F., Covelli, V., Pazzaglia, S., and Saran, A. (2008) PARP-1 cooperates with Ptc1 to suppress medulloblastoma and basal cell carcinoma. *Carcinogenesis* **29**, 1911-1919

105. Tewari, M., Quan, L. T., O'Rourke, K., Desnoyers, S., Zeng, Z., Beidler, D. R., Poirier, G. G., Salvesen, G. S., and Dixit, V. M. (1995) Yama/ CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell* **81**, 801-809
106. Duriez, P. J., and Shah, G. M. (1997) Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: a sensitive parameter to study cell death. *Biochem Cell Biol* **75**, 337-349
107. Pacher, P., and Szabo, C. (2008) Role of the peroxynitrite-poly(ADP-ribose) polymerase pathway in human disease. *Am J Pathol* **173**, 2-13
108. Berta, P., Hawkins, J. R., Sinclair, A. H., Taylor, A., Griffiths, B. L., Goodfellow, P. N., and Fellous, M. (1990) Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature* **348**, 448-450
109. Eicher, E. M., Washburn, L. L., Schork, N. J., Lee, B. K., Shown, E. P., Xu, X., Dredge, R. D., Pringle, M. J., and Page, D. C. (1996) Sex-determining genes on mouse autosomes identified by linkage analysis of C57BL/6J-YPOS sex reversal. *Nat Genet* **14**, 206-209
110. Brennan, J., and Capel, B. (2004) One tissue, two fates: molecular genetic events that underlie testis versus ovary development. *Nat Rev Genet* **5**, 509-521
111. Wouters-Tyrou, D., Martinage, A., Chevaillier, P., and Sautiere, P. (1998) Nuclear basic proteins in spermiogenesis. *Biochimie* **80**, 117-128
112. Ward, W. S., and Coffey, D. S. (1991) DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biol Reprod* **44**, 569-574
113. Maymon, B. B., Cohen-Armon, M., Yavetz, H., Yogev, L., Lifschitz-Mercer, B., Kleiman, S. E., Botchan, A., Hauser, R., and Paz, G. (2006) Role of poly(ADP-ribosylation) during human spermatogenesis. *Fertil Steril* **86**, 1402-1407
114. Tramontano, F., Malanga, M., and Quesada, P. (2007) Differential contribution of poly(ADP-ribose)polymerase-1 and -2 (PARP-1 and -2) to the poly(ADP-ribosylation) reaction in rat primary spermatocytes. *Mol Hum Reprod* **13**, 821-828
115. Eddy, E. M., and O'Brien, D. A. (1998) Gene expression during mammalian meiosis. *Curr Top Dev Biol* **37**, 141-200
116. Maleki, S., and Keeney, S. (2004) Modifying histones and initiating meiotic recombination; new answers to an old question. *Cell* **118**, 404-406

117. Poirier, G. G., de Murcia, G., Jongstra-Bilen, J., Niedergang, C., and Mandel, P. (1982) Poly(ADP-ribosyl)ation of polynucleosomes causes relaxation of chromatin structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 3423-3427
118. Orth, J. M. (1982) Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study. *Anat Rec* **203**, 485-492
119. Dantzer, F., Ame, J. C., Schreiber, V., Nakamura, J., Menissier-de Murcia, J., and de Murcia, G. (2006) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation during DNA damage and repair. *Methods Enzymol* **409**, 493-510
120. Maeda, Y., Hunter, T. C., Loudy, D. E., Dave, V., Schreiber, V., and Whitsett, J. A. (2006) PARP-2 interacts with TTF-1 and regulates expression of surfactant protein-B. *J Biol Chem* **281**, 9600-9606

## ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında İstanbul’da doğdu. 1995 yılında İstanbul Nurettin Teksan İlkokulu’ndan, 1999’da İstanbul İstek Semiha Şakir Lisesi’nden ve 2003 yılında İstanbul Kadıköy Anadolu Lisesi’nden mezun oldu. 2007 yılında İstanbul Üniversitesi’nde Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünü bitirdi. 2007 yılında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı’nda “Üreme Biyolojisi” Yüksek Lisans programına başladı. 20 Şubat 2009’da Sağlık Bilimleri Enstitüsü’nde Araştırma Görevlisi kadrosuna atanmıştır. Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında görevine devam etmektedir. Nazlı Ece Güngör İngilizce bilmektedir.