

T.C.
GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Transforming Growth Factor-Beta (TGF- β)/Smad Sinyal Yolağı ile Übikütin
Proteazom Sistemi Arasındaki Etkileşimin Gelişmekte Olan Sıçan Testis ve İnsan
Sperminde Belirlenmesi**

SEDA OCAKLI

TOKAT
2013

Her Hakkı Saklıdır

Transforming Growth Factor-Beta (TGF- β)/Smad Sinyal Yolağı ile Übikütin Proteazom Sistemi Arasındaki Etkileşimin Gelişmekte Olan Sıçan Testis ve İnsan Sperminde Belirlenmesi

Tezin Kabul Ediliş Tarihi:19/07/2013

Başkan: Doç.Dr.Sevil ÇAYLI

İmza:

Üye: Doç.Dr.Birsen ÖZYURT

İmza:

Üye: Yrd.Doç.Dr.Fikret GEVREK

İmza:

Bu tez, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 09/07/2013 tarih ve 13/05 sayılı oturumunda belirlenen jüri tarafından kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü

Prof.Dr.Şemsettin ŞAHİN



TEZ BEYANI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

Seda OCAKLI

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Transforming Growth Factor-Beta (TGF- β)/Smad Sinyal Yolağı ile Übikütün Proteazom Sistemi Arasındaki Etkileşimin Gelişmekte Olan Sıçan Testis ve İnsan Sperminde Belirlenmesi

Seda OCAKLI

**Gaziosmanpaşa Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı**

Danışman

Doç.Dr. Sevil ÇAYLI

Transforming Growth Faktör- β ve Übikütün Proteazom Sistem (UPS) üyelerinin sıçan testisi ve insan sperminde farklı biyolojik fonksiyonlarının olduğu bilinmektedir.

Bu çalışmanın ilk amacı gelişmekte olan sıçan testisinde TGF- β /Smad sinyal yolağındaki proteinler ile UPS proteinlerinin postnatal sıçan testisinde hücrel lokalizasyonlarının belirlenmesi ve SMAD proteinleri ile UPS proteinleri arasındaki etkileşiminin belirlenmesidir. İkinci amaç ise, UPS proteinlerinden p97/VCP ve übikütünün fertil ve infertil bireylerde immüno lokalizasyonunun ve sperm kalitesiyle olan ilişkisinin araştırılmasıdır.

Postnatal 0, 5, 15, 30 ve 60 günlük sıçan testisleri üzerinde immunohistokimya ve immunofloresan teknikleri uygulandı. Ayrıca fertil ve infertil bireylerden alınan sperm örneklerine ise immünohistokimya teknikleri uygulandı.

0 ve 5 günlük sıçan testisinde, TGF- β /Smad sinyal yolağındaki proteinlerden (BMP2, BMP4, SMAD1, SMAD5, SMAD8, pSMAD 1/5/8) ile UPS proteinlerinin (p97/VCP, Übikütün, Jab1/CSN5) gonosit ve Sertoli hücrelerinde, 15, 30 ve 60 günlük sıçan testisinde ise bu proteinlerin spermatogonyum, spermatosit, spermatidlerde ve bu germ hücrelerine ek olarak intertisyel hücrelerde de ekspre olduğu gözlenmiştir. Testisde bu proteinlerin farklı hücrelerde farklı boyanma yoğunluğu gösterdiği ve de ekspresyonlarının 0. günden 5. güne doğru genel anlamda kademeli bir artış gösterdiği gözlemlenmiştir. p97/VCP ve SMAD1 proteinlerinin spermatogonya, Sertoli hücreleri ve spermatositlerde birlikte kolokelize olduğu bulunmuştur. İnsan sperminde ise p97/VCP ve übikütünün infertilite ve sperm kalitesi ile negatif korelasyon gösterdiği saptanmıştır.

Sonuç olarak, postnatal sıçan testisindeki bazı SMAD proteinleri ve UPS proteinleri arasındaki etkileşimin bulunması, UPS'in BMP sinyal yolağını spermatogenez boyunca kontrol edebileceğini göstermektedir. Ayrıca fertil ve infertil bireylerin übikütün ve p97/VCP immunoreaktivite yüzdeleri arasındaki fark ve bu yüzdelerle semen parametreleri arasındaki ilişki, übikütün ve p97/VCP'nin erkek infertilitesini değerlendirmede bir belirteç olabileceğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: TGF- β , UPS, SMAD, Testis, Sperm, İnfertilite

ABSTRACT

MASTER THESIS

Determination of The Relationship Between Transforming Growth Factor Beta(TGF- β)/SMAD Signaling Pathways and Ubiquitin Proteasome System In The Developing Rat Testis and Human Sperm

Seda OCAKLI

Gaziosmanpasa University

Faculty of Medicine

Department of Histology and Embryology

Supervisor

Associate. Prof.Dr. Sevil Cayli (PhD)

Members of the Transforming Growth Factor Beta(TGF- β) and Ubiquitin Proteasome System (UPS) family are known to have different biological functions during rat testicular and human sperm development.

The first aim of the present study was to investigate the cellular localization of the members of TGF- β /SMAD, the UPS proteins and to determine the interaction of SMADs and UPS proteins in the postnatal rat testis. The second aim of the present study was to investigate the immunolocalization of p97/VCP and ubiquitin in fertile and infertile men and to find out the relationship between expression of these proteins and sperm quality.

Testicular tissues from 0, 5, 15, 30 and 60-day-old rats were examined by immunohistochemistry and immunofluorescence. Additionally, human sperm smears were examined by immunohistochemistry.

In 0 and 5-day-old rat testis, the members of the TGF- β /SMAD proteins (BMP2, BMP4, SMAD1, SMAD5, SMAD8, pSMAD 1/5/8) and UPS proteins (p97/VCP, ubiquitin, Jab1/CSN5) were mainly expressed in gonocytes and Sertoli cells. In 15-, 30- and 60-day-old rat these proteins expressed in spermatogonia, spermatocytes, spermatids and Leydig cells. p97/VCP and SMAD1 proteins were overlapped in spermatogonia, Sertoli cells, and spermatocytes. Immunoreexpression of p97/VCP and ubiquitin was negatively correlated with infertility and the sperm quality in human.

The interaction between some of SMAD proteins and p97/VCP in the postnatal rat testis suggests that UPS may play important roles in mediating BMP signaling during spermatogenesis. Additionally, the differences between the percentages of ubiquitin and p97/VCP immunoreactivity in fertile and infertile and the relationship between these percentages and semen parameters indicate that ubiquitin and p97/VCP may be a marker to evaluate the male fertility.

Key words: TGF- β , UPS, SMAD, Testis, Sperm, Infertility

TEŐEKKÖR

Çalışmalarım boyunca bilgilerini benimle büyük bir sabırla paylaőan değerli hocam Doç.Dr.Sevil Çaylı'ya, her türlü desteğini benden esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız Doç.Dr.Hüseyin Aslan'a, tüm Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı çalışanlarına, projemizi destekleyen BAP yöneticilerine ve çalışanlarına, Üroloji ABD'dan Fikret Erdemir'e ve her zaman ve her konuda destek veren eőim Ekrem Ocaklı ve beni bu dönemde sabırla bekleyen oğlum Ahmet Krem Ocaklı'ya sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	4
2.1. Testis Embriyolojisi	4
2.2. Testisin Anatomisi	6
2.3. Testisin Histofizyolojisi	8
2.4. Postnatal Testis Gelişimi	10
2.4.1. Germ Hücrelerinin Gelişimi	10
2.4.2. Somatik Hücrelerin Gelişimi	11
2.5. Testis Histolojisi	13
2.5.1. Seminifer Tübüller ve Hücreleri	15
2.5.1.1. Sertoli Hücreleri	16
2.5.1.2. Spermatogonyumlar	18
2.5.1.3. Primer ve Sekonder Spermatozoidler	18
2.5.1.4. Erken ve Geç Dönem Spermatozoidler	19
2.5.1.5. Spermatozoa	19
2.5.1.5.1. Kuyruk	20
2.5.1.5.2. Baş	22
2.5.2. İnterstisyel Alan ve Hücreleri	26
2.5.2.1. Leydig Hücreleri	27
2.5.2.2. Miyoid Hücreler	28
2.5.3. Spermatogenez	29
2.6. Sperm Analizi	32
2.6.1. Spermilerin Morfolojik Açıdan Sınıflandırılması	32
2.6.2. Sperm Morfolojik Bozukluklarının Önemi	33
2.7. TGF- β Süperailisi	35
2.7.1. SMAD Alt Grupları ve Fonksiyonları	36
2.7.2. SMAD Proteinleri Aracılığı ile Sinyal İletimi	37
2.8. Protein Yıkımı	38
2.8.1. Übikülin Protazom Sistemi (UPS)	38
2.8.1.1. VCP Bağımlı Protein Yıkımı	40
2.8.1.1.1. p97/VCP'in Otofagozom Oluşumundaki Rolü	41
2.8.1.1.2. p97/VCP'nin Selektif Otofajiyi Yönetmesi	42
2.8.1.1.3. p97/VCP ve Patolojisi	43
2.8.1.1.4. p97/VCP ile İlişkide Olan Proteinler ve Fonksiyonları	43
2.8.1.2. COP9 Signalozom (CSN)	44
2.8.1.2.1. CSN'in Metalloproteaz Ve Denedilaz Aktivitesi	45
2.8.1.2.2. CSN İlişkili Protein Kinaz Ve Deübikülinasyon Aktivitesi	46

MATERYAL ve METOD	47
3.1. MATERYAL	47
3.1.1. Kimyasallar ve Ait Olduğu Kaynaklar	47
3.1.2. Kromojenler	48
3.1.3. Antikorlar, Ait oldukları Kaynaklar Ve Kullanım Oranları	48
3.1.4. Deney Aletleri ve Markaları	48
3.2. METOD	49
3.2.1. Deneylerde Kullanılan Örneklerin Elde Edilmesi	49
3.2.2. Deneylerde Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması	49
3.2.3. Kullanılan Teknikler	49
3.2.3.1. Histokimya	50
3.2.3.2. İmmünohistokimya	50
3.2.3.3. İmmunofloresan	52
3.2.3.4. Çiftli İmmunofloresan Boyama	52
3.3. İstatiksel Analiz	53
3.3.1. Semiquantitative HSCORE analizi	53
BULGULAR	54
4.1. Postnatal Sıçan Testisinin Genel Morfolojik Özellikleri	54
4.2. Postnatal Sıçan Testisinde Übikütin Proteazom Sistemi (UPS) Proteinlerinin İmmünohistokimyasal Ekspresyonları	56
4.2.1. p97/VCP Ekspresyonunun Belirlenmesi	56
4.2.2. Jab1/CSN5 Ekspresyonunun Belirlenmesi	57
4.2.3. Übikütin Ekspresyonunun Belirlenmesi	59
4.2.4. Postnatal Sıçan Testisinde UPS Proteinlerinin İmmünoaktivitelerinin Gelişimlerine Göre Değerlendirilmesi	60
4.3. Postnatal Sıçan Testisinde Bone (Kemik) Morfogenetik Protein (BMP) Ailesi Üyelerinin Ekspresyonları	62
4.3.1. BMP2 Ekspresyonunun Belirlenmesi	62
4.3.2. BMP4 Ekspresyonunun Belirlenmesi	63
4.3.3. Postnatal Sıçan Testisinde BMP Ailesi Proteinlerinin İmmünoaktivitelerinin Gelişimlerine Göre Değerlendirilmesi	64
4.4. Postnatal Sıçan Testisinde SMAD (Sma and Mad-related Protein) Ailesi Üyelerinin Ekspresyonları	66
4.4.1. SMAD1 ekspresyonunun belirlenmesi	66
4.4.2. Postnatal Sıçan Testisinde SMAD5 Ekspresyonunun Belirlenmesi	67
4.4.3. Postnatal Sıçan Testisinde SMAD8 Ekspresyonunun Belirlenmesi	68
4.4.4. Postnatal Sıçan Testisinde pSMAD1/5/8 Ekspresyonunun Belirlenmesi	70
4.4.5. Postnatal Sıçan Testisinde SMAD Ailesi Proteinlerinin İmmünoaktivitelerinin Gelişimlerine Göre Değerlendirilmesi	71
4.5. Postnatal sıçan testisinde SMAD1 ve p97/VCP Proteinlerinin Birlikte Lokalizasyonlarının Belirlenmesi	73
4.6. İnsan Sperminde Übikütin Proteazom Sistemi Proteinlerinin Belirlenmesi	75
4.6.1. İnsan Sperminde p97/VCP ve Übikütin Ekspresyonunun Belirlenmesi	76
4.6.2. p97/VCP ve Übikütin Ekspresyonlarının Semen parametreleri ile korelasyonu	78
SONUÇ ve TARTIŞMA	79
KAYNAKLAR	86
ÖZGEÇMİŞ	96

SİMGELER VE KISALTMALAR

aa	:	Aminoasit
APS	:	Amonyum persülfat
ATP	:	Adenosin 5'-trifosfat
bp	:	Baz çifti
BMP	:	Bone Morphogenetic Protein
BSA	:	Sığır serum albumin
cDNA	:	Komplementer DNA
COP	:	Sürekli fotomorfogenez
cPLA2	:	sitosolik fosfolipaz
DAPI	:	Diaminido-2-phenylindole
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
DTT	:	Ditiotereitol
DUB	:	Deübikütinaz
ECL	:	Kemiluminisans
EDTA	:	Etil diamin tetraasetik asit
ERAD	:	Endoplasmik retikulum ilişkili yıkım
ERK1/2	:	Ekstrasellular sinyal-regüle edici kinaz1/2
FCS	:	Fetal sığır serumu
FITC	:	Fluorescein isothiocyanate
HRP	:	Horse radish peroksidaz
JAB1	:	c-Jun-aktivasyon domain-bağlayıcı protein 1
JAMM	:	Jab1/MPN domain-ilşkili metaloizopeptidaz)
JNK	:	c-Jun N-terminal kinaz
kb	:	Kilo baz.
kD	:	Kilo Dalton
LPS	:	Lipopolisakkarid
M	:	Molar
MAPK	:	Mitojen-aktive edici protein kinaz
MES	:	Morfolin etan sülfonik asit
MIF	:	Makrofaj göçünü engelleyici faktör
MOPS	:	3-(N-Morpolin)-propan sülfonik asit
mRNA	:	<i>haberci</i> RNA
NaCl	:	Sodyum klorit
NCBI	:	Uluslararası Biyoteknoloji Bilgi Servisi
NHS	:	Normal at serumu
PBS	:	Fosfat buferli tuz
PCR	:	Polimeraz zincir reaksiyonu
PFA	:	Paraformaldehit
pH	:	$-\log c[H^+]$
PMSF	:	Fenilmetilsülfonil florit
RNA	:	Ribonükleik asit
RNAi	:	RNA interferans
RNase	:	Ribonükleaz
rpm	:	Revolutions per minute
SMAD	:	Sma and Mad Protein

SDS	:	Sodyum dodesilsülfat
SRY	:	Sex-determination Region Y
TNF- α	:	Tümör nekroz faktörü alfa
TGF- β	:	Transforming Growth Faktor- β
UPS	:	Übikülin protazom sistem
UV	:	Ultraviolet
V	:	Volt
VCP	:	Valosin-içeren protein
wt	:	vahşi tip
μ	:	Mikro

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Testis gelişiminin şematik gösterimi	5
Şekil 2.2. Erkek genital sistemi	13
Şekil 2.3. Testis ve genital kanallar	14
Şekil 2.4. Seminifer tübülün şematik gösterimi	15
Şekil 2.5. Normal bir spermatozoonun şematik gösterimi	34
Şekil 2.6. Spermatozoon morfoloji bozuklukları	34
Şekil 2.7. Omurgalı SMAD'larının filogenetik ağacı ve yapılarının şeması	37
Şekil 2.8. SMAD proteinleri aracılığı ile sinyal iletimi	38
Şekil 2.9. Übikütün Sinyali	39
Şekil 2.10. VCP'nin yapısal domainleri	40
Şekil 2.11. p97/VCP'nin çoklu fonksiyonları	44
Şekil 2.12. CSN subunitelerinin birbiriyle ilişkileri	45
Şekil 4.1. Postnatal 0, 5, 15, 30 ve 60 günlük sıçan testisinin Pas boyası ile morfojik yapısının gösterilmesi	55
Şekil 4.2. Postnatal 0 (A), 5 (B), 15 (C), 30(D) ve 60 (E) günlük sıçan testisinde p97/VCP lokalizasyonları	57
Şekil 4.3. Postnatal 0 (A), 5 (B), 15 (C), 30 (D) ve 60 (E) günlük sıçan testisinde Jab1/CSN5 lokalizasyonları	58
Şekil 4.4. Postnatal 0 (A), 5 (B), 15 (C), 30 (D) ve 60 (E) günlük sıçan testisinde übikütün lokalizasyonları	59
Şekil 4.5. Gelişmekte olan sıçan testisinde p97/VCP, Jab1/CSN5 ve übikütün karşılaştırmalı H-SCORE değeri	60
Şekil 4.6. Postnatal 0 (A), 5 (B), 15 (C), 30 (D) ve 60 (E) günlük sıçan testisinde BMP2 lokalizasyonları	62
Şekil 4.7. Postnatal 0 (A), 5 (B), 15 (C), 30 (D) ve 60 (E) günlük sıçan testisinde BMP4 lokalizasyonları	63
Şekil 4.8. Gelişmekte olan sıçan testisinde BMP2 ve BMP4'ün karşılaştırmalı H-SCORE değeri	64

Şekil	<u>Sayfa</u>
Şekil 4.9. Postnatal 0 (A), 5 (B), 15 (C), 30 (D) ve 60 (E) günlük sıçan testisinde SMAD1 lokalizasyonları	67
Şekil 4.10. Postnatal 0 (A), 5 (B), 15 (C), 30 (D) ve 60 (E) günlük sıçan testisinde SMAD5 lokalizasyonları	68
Şekil 4.11. Postnatal 0 (A), 5 (B), 15 (C), 30 (D) ve 60 (E) günlük sıçan testisinde SMAD8 lokalizasyonları	69
Şekil 4.12. Postnatal 0(A), 5 (B), 15 (C), 30 (D) ve 60 (E) günlük sıçan testisinde pSMAD1/5/8 lokalizasyonları	70
Şekil 4.13. Gelişmekte olan sıçan testisinde SMAD1, SMAD5, SMAD8 ve psmad1/5/8'in karşılaştırmalı H-SCORE değeri	71
Şekil 4.14. Postnatal sıçan testisinde SMAD1 ve p97/VCP proteinlerinin birlikte lokalizasyonlarının belirlenmesi	74
Şekil 4.15. İnsan sperminde p97/VCP lokalizasyonu	76
Şekil 4.16. İnsan sperminde übikütin lokalizasyonu	77
Şekil 4.17. Fertil ve infertil bireylerdeki übikütin ve p97/VCP' nin karşılaştırmalı değerleri	77
Şekil 4.18. p97/VCP'nin insan sperm konsantrasyonu, motilitesi ve morfolojisi ile olan ilişkisi	78
Şekil 4.19. Übikütinin insan sperm konsantrasyonu, motilitesi ve morfolojisi ile olan ilişkisi	78

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. p97/VCP ile İlişkili Patolojiler	43
Çizelge 4.1. Postnatal Sıçan Testisinde Hücresel Organizasyon	54
Çizelge 4.2. Sıçan testisinde p97/VCP, Jab1/CSN5 ve Übikütinin Lokalizasyonu	61
Çizelge 4.3. Sıçan testisinde BMP2 ve BMP4 Lokalizasyonu	65
Çizelge 4.4. Sıçan testisinde SMAD1, SMAD5, SMAD8 ve pSMAD1/5/8 Lokalizasyonu	72
Çizelge 4.5. Fertil ve İnfertil bireylere ait semen analizi sonuçları	75

GİRİŞ VE AMAÇ

Postnatal testis gelişimi; proliferasyonu, farklılaşmayı, germ hücreleri ve somatik hücrelerin apoptotik ölümünü kontrol eden, çok iyi organize olmuş parakrin iletişimi içerir. Erişkin testislerinin normal fonksiyon görebilmesi için testiküler hücrelerin uygun bir şekilde gelişimine ihtiyaç vardır. Doğumda, seminifer kordlar içerisine yerleşmiş gonositler spermatogoniyal kök hücre havuzunu oluştururlar ve daha ileride tip A spermatogonyuma farklılaşırlar (Beaumont ve ark., 1963; Novi ve ark., 1968; McGuinness ve ark., 1992). Sıçanlarda, neonatal dönemin bitişi; pubertenin başlangıcı ile çakışır. Puberte döneminde germ hücre sayısı, tübüler uzunluk ve testis hacmi artar. Puberte başlangıcında, germ hücreleri daha yüksek oranda proliferere olmaya başlarlar (Muller ve ark., 1983). Erişkin testisi spermatogonya, primer ve sekonder spermatositler, uzamış ve yuvarlak spermatidler ve spermiyumları içerir. Spermatogenik hücreler, tübüllerde birbirlerini dalgalı biçimde ve zaman içinde dairesel biçimde izleyen belirgin hücresel ortaklık içinde düzenlenmiştir (Clermont ve ark., 1965). Testislerde germ hücrelerinden farklı olarak ayrıca somatik hücrelerde vardır ki bunlar intertisyel hücreler ve peritübüler hücrelerdir.

Übikütin proteazom sistemi (UPS), ökaryotlarda hücreiçi düzenleyici proteinlerin seviyelerini kontrol etmede önemli bir fonksiyona sahiptir. Erkek üreme sisteminde UPS gamet kontrol mekanizmalarına, spermatogenez boyunca protein ve organel degradasyonuna ve kusurlu spermatozoaları übikütinleyerek işaretlenmesine katkıda bulunur (Kwon ve ark., 2005). UPS'in übikütinleme ve übikütinlenmiş proteinlerin yıkımı olmak üzere iki temel fazı vardır. 97-kDa'luk Valosin-içeren protein (p97 veya VCP), übikütin-proteazom sistemine bağlı proteolizde önemli fonksiyonlara sahiptir. Bu proteoliz, VCP'nin, übikütin ve kofaktörleri ile ilişkisine bağlıdır. VCP, UPS'de şaperon protein olarak görev yapmaktadır. Toplam hücresel proteinin 1% den fazlasının VCP olduğu bilinmektedir. Jab1/CSN5 UPS'in en önemli üyelerinden birisidir. Bu proteinin hücre çoğalması, apoptozis, DNA tamiri ve TGF- β sinyal yolağı gibi birçok sinyal mekanizmasının düzenlenmesinde rol oynadığı bilinmektedir (Shackelford ve ark., 2010). Küçük bir protein olan übikütine UPS'de protein yıkımının yanısıra endositoz, sinyal iletimi ve DNA tamirinde ihtiyaç duyulur (Pickart, C.M., 2001).

Transforme edici büyüme faktörü- β ailesi (TGF- β) farklı biyolojik etkileri kullanan çok fonksiyonlu peptid salgılayan ve farklı hücre tiplerinden oluşan büyük bir ailedir. Organizmanın tüm dokularının gelişiminde, homeostazisinde ve onarımında çok önemli rol oynayan TGF- β ailesi, yapısal olarak ilişkili çok sayıda polipeptid büyüme faktörleri içerir, bunların her biri hücre proliferasyonu, farklılaşması, motilitesi, adhezyonu ve ölümü gibi hücresel süreçleri düzenleme yeteneğine sahiptir. (Massague, J., 1998; Shi ve ark., 2003). Testiste TGF- β üyelerinden bazıları bazı faktörlerle ilişkilidir; örneğin aktivinler, inhibitörler ve BMP'ler spermatogenezin devamlılığında yer alan testiküler fonksiyonlara etki eder. Transgenik fareler üzerinde yapılan çalışmalarda bu genlerin ortadan kaldırılmasının hayvanların üremeyle ilgili fonksiyonlarını etkilediğini göstermiştir. TGF- β ve ilgili faktörler, 2 tip reseptör olan serin/tireonin protein kinazları bir araya getirerek gen ekspresyonunu düzenlerler. Bu kinazlardan biri diğerini fosforlar, bu fosforlanan kinaz Smad ve Mad-related Proteinlerine (SMAD) dönüşür. SMAD'lar, hücre çekirdeği içine sinyal taşıyan ve özel olarak DNA'ya bağlanma kabiliyeti ile transkripsiyonel kompleks oluşturan orijinal bir protein ailesidir (Massague, J., 1998; Liu, F., 2006).

UPS'de çalışan p97/VCP, Jab1/CSN5 ve übikülinin ve TGF- β süperailisine ait proteinlerin yukarıdaki bölümde detaylı bir şekilde anlatıldığı gibi hücreiçi birçok temel fonksiyonu yerine getirdiği bilinmektedir. Bugüne kadar TGF- β ve UPS ailesine ait bazı proteinlerin gelişmekte olan testis dokusundaki varlığı birçok araştırmacı tarafından belirlenmiştir. Fakat TGF- β ailesine ait Smad proteinlerinin UPS'de çalışan proteinlerle olan etkileşimleri bilinmemektedir. Smad proteinleri übikütilendikten sonra proteazomda degrade edilmektedir. Bu übikütilenmeyi sağlayan veya übikütilendikten sonra proteasoma taşıyıp degrade olmalarını sağlayan proteinler hakkında sınırlı sayıda bilgi vardır. Özellikle de gelişmekte olan testis ve epididimis dokularında Smad proteinlerinin UPS'de çalışan hangi proteinlerle etkileştiği araştırma konusudur. Öncelikle bu çalışma, sıçan gelişimine bağlı olarak belirtilen proteinlerin testise ait hangi hücrelerde ve hangi gelişim dönemlerinde ekspre edilip edilmediğini ortaya koyacaktır. Aynı zamanda Smad proteinlerinin, UPS'de hangi proteinlerle etkileştiğini ve Smad proteinlerinin hangi proteinler sayesinde proteazomda degrade olduğunu

belirleyecektir. Bu nedenle çalışmanın birinci amacı; gelişmekte olan sıçan testisinde TGF- β /Smad sinyal proteinleri ile UPS'de çalışan proteinlerden p97/Valosin içeren protein (VCP) ve Jab1/CSN5'nin etkileşiminin gösterilmesidir.

Erkek infertilitesinde semenin değerlendirilmesi ışık mikroskobu altında sperm sayısı, morfolojisi ve motilitesinin ölçümlerine dayanır ve bu ölçümler infertilite tedavisi görmek isteyen çiftler için kliniksel bilgi sağlar. Fakat, klinik semen parametreleri ve fertilité arasındaki korelasyon düşük seviyededir. Bu yüzden semenin değerlendirilmesi için ek objektif belirteçler aranmaktadır. Übikütin, 8,5 kDa lık bir proteindir ve kovalent olarak birbirine bağı poliübikütin zincirleri işaretlenmiş proteinler proteolitik yıkım için proteazoma hedeflenir. p97/VCP (Valosin-içeren protein), poliübikütinlenmiş proteinleri proteazoma taşıyan bir şaperondur. Übikütinlenmiş proteinlerin, epididimide elimine edildiğini gösteren çalışmalar vardır. Fakat, semen parametreleri ile p97/VCP ve übikütin ekspresyonları arasındaki ilişki belirlenmemiştir. Bu nedenle çalışmamızın ikinci amacı ise fertil ve infertil bireylerde übikütin ve p97/VCP ekspresyonlarına bakarak bu proteinlerin erkek infertilitesini değerlendirmesinde bir belirteç olarak kullanılabilineceğini göstermektir.

GENEL BİLGİLER

2.1. Testis Embriyolojisi

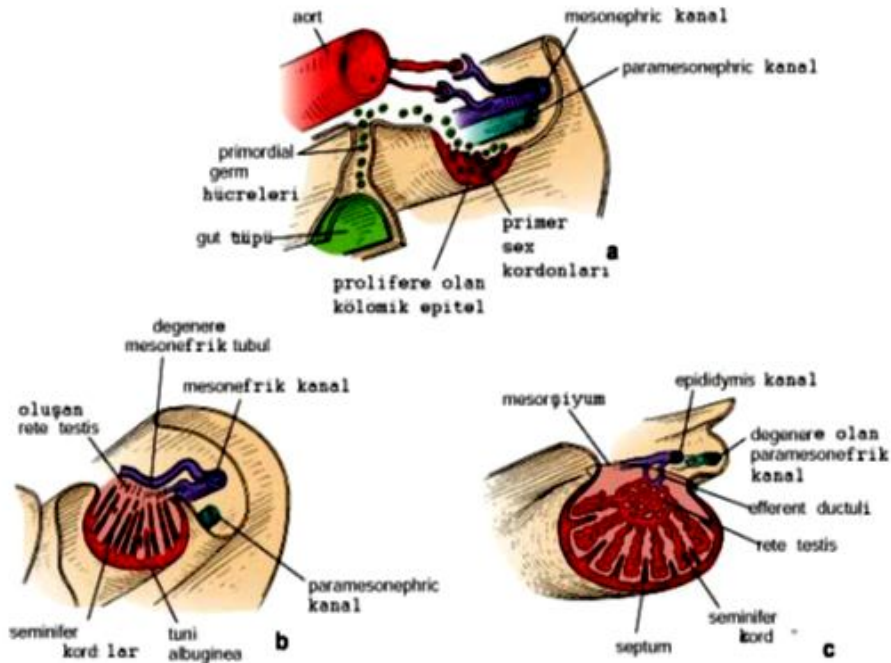
Embriyonun kromozomal ve genetik cinsiyeti fertilizasyon sırasında sekonder oositi dölleyen sperm türüne bağlı olarak belirlenir. Embriyonun cinsiyeti, X kromozomuna sahip ovumu dölleyen spermin X veya Y kromozomu taşımasına bağlıdır. Gelişmekte olan gonadlar XX veya XY kromozom kompleksine sahip olurlar. Yedinci haftadan önce gonadların görünümü her iki cinste de birbirine benzer, bu nedenle farklanmamış gonadlar olarak adlandırılırlar. Erkek fenotipinin gelişimi için gerekli olan Y kromozomu, farklanmamış gonadın medullası üzerinde testis belirleyici etkiye sahiptir. Testis belirleyici faktör (TDF) için gerekli olan SRY geni Y kromozomunun kısa kolu üzerindeki cinsiyet belirleyici bölgesinde yerleşiktir. Y kromozomu tarafından düzenlenen, TDF, farklanmamış gonadın primer seks kordonlarındaki hücrelerde sentezlendiğinde taslak gonadlar testislere farklanırlar. Y kromozomunun yokluğu over gelişimiyle sonuçlanır. Sonuç olarak fertilizasyonda saptanan cins kromozom kompleksi gonadın tipini belirler ve farklanmamış gonadın testis ya da ovaryumlara farklanmasını sağlar (Moore ve ark., 2008).

Gonadlar üç kaynaktan köken alırlar.

- Posterior abdominal duvarın mezotel epitelyumu (mezodermal epitel)
- Altındaki mezenşim (embriyonik bağ dokusu)
- Primordial germ hücreleri

Gonadal gelişimin ilk safhaları 5. haftada ortaya çıkar, mezonefrozun medialinde, sağ ve solda, mezotel epitelinde çoğalma meydana gelir. Bu epitelin ve altındaki mezenşimin proliferasyonu ile mezonefrozun medialinde bir kabarıklık –gonadal (genital) kabartı- oluşur. Parmak şeklindeki epitelyal kordonlar ya da primer seks kordonları altındaki mezenşim içerisine doğru kısa sürede büyürler. Bu aşamada farklanmamış gonad dışta yer alan bir medulladan oluşmaktadır. Eğer embriyo XX seks kromozom kompleksine sahip ise, farklanmamış gonadın korteksi overe diferensiyel olur, medullası geriler. Embriyo XY seks kromozom kompleksini içermekteyse, medulla testise farklanır, korteks bir takım kalıntıları dışında geriler ve dejenere olur (Langman ve ark., 1996).

Büyük yuvarlak primordial germ hücreleri gelişimin 4. haftasında, allantoisin başlangıç yerine yakın, vitellüs kesesi duvarında, endodermal hücreler arasında görülmeye başlarlar. Embriyonun katlanması sırasında vitellüs kesesinin dorsal parçası embriyo içerisine dahil olur ve de primordial germ hücreleri, son bağırsağın dorsal mezenteri ile ameboid hareketlerle gonadal kabartılara göç ederler. Altıncı haftada primordial germ hücreleri altındaki mezenşim içerisine girerek primer seks kordonlarına dahil olurlar (Şekil 2.1) (Moore ve ark., 2008).



Şekil 2.1: Testis gelişiminin şematik gösterimi (Histology: A text and atlas, 2003)

Y kromozomuna sahip embriyolarda testislerin gelişimi koordineli bir seri genin indüksiyonu ile sağlanır. SRY geni Y kromozomunun kısa kolu üzerindeki testis belirleyici faktörler için farklanmamış gonadın testis olarak gelişiminde bir anahtar fonksiyonu görmektedir. Testis belirleyici faktör (TDF), primer seks kordonlarını uyararak, onların farklanmamış gonadın medulla derinlerine doğru uzamasına neden olur, kordonlar burada dallanarak birbirleriyle anastomoz yaparlar ve böylece rete testis oluşur. Kalın bir fibröz kapsül olan tunika albuginea gelişimi fötusta testiküler gelişim için oldukça karakteristiktir ve tunika albuginea geliştikten sonra seks kordonlarının yüzey epiteli ile olan bağlantıları kaybolur. Testis aşamalı olarak dejenere olan

mezonefrozdandan ayrılır ve kendi mezenteri olan mesorşiyum ile asılı hale geçer. Seminifer kordonlar, seminifer tübüllere, *tubuli rekti* ve *rete testise* farklılıklar (Moore ve ark., 2008).

Seminifer tübüller, interstisyel hücreleri (Leydig hücreleri) oluşturan mezenşimden ayrılırlar. Leydig hücreleri sekizinci haftadan itibaren testosteron ve andosteron salgılamaya başlarlar ve bu hormonlar mezonefrik duktusların ve dış genitalerin maskulin olarak farklılaşmasını indüklerler. Testosteron üretimini insan koryonik gonodotropin (hCG) hormonu stimüle eder ve hormonun miktarı 8-12 haftalık periyotta en yüksek değerine ulaşır. Ayrıca fetal testisler glikoprotein bir hormon olan antimüllerian hormon (AMH) veya müllerian inhibitör madde (MIS) adı verilen bir hormonu da salgılamaktadır. Antimüllerian hormon, Sertoli hücreleri tarafından salgılanır ve bu salgılanma puberteye kadar devam eder fakat daha sonra seviyesi azalır. AMH, paramezonefrik duktusların gelişimini baskılar (Moore ve ark., 2008).

Puberteye kadar solid halde kalan seminifer tübüllerde puberteden itibaren lümen gelişir. Seminifer tübül duvarında iki tip hücre bulunur; Sertoli ve spermatogenetik hücreler. Destek hücreleri olan Sertoli hücreleri testisin yüzey epitelinden gelişirler. Spermatogonya, primordial sperm hücreleri olan bu hücreler, primordial germ hücrelerinden farklılıklar. Fetal testise ait seminifer tübüllerde Sertoli hücreleri çoğunluğu oluşturur. Daha sonraki gelişme sırasında, testisin yüzey epiteli düzleşir ve yetişkin testisin dış yüzeyindeki mezoteli oluşturur. Rete testis, efferent duktusları oluşturan 15-20 adet mezonefrik tübüller ile devam eder. Bu duktuslar, duktus epididimisi oluşturan mezonefrik duktus ile bağlantılılar (Moore ve ark., 2008).

2.2. Testisin Anatomisi

Erkek üreme hücrelerinin yapıldığı bir çift organ olan testisler; oval şekilli, yetişkin insanlarda yaklaşık 4-5 cm uzunluğunda, 2,5 cm eninde, 20-30 g ağırlığında ve funiculus spermaticusa asılı olarak skrotum içinde yerleşmişlerdir. Kıvrımlı bir deri kesesi olan skrotumun iç yüzü, skrotal septum (septum scrotum) ile iki ayrı bölüme ayrılır. Testisler bu boşluklarda bulunur (Yıldırım M., 1999; Cumhuriyet M., 2001; Yücel H.A., 2003; Moore ve ark., 2006; Moore ve ark., 2007).

Testisler, karın boşluğunun arka duvarında retroperitoneal olarak gelişirler. Erken fetal dönemde karın boşluğu içerisinde böbreklere yakın olarak yerleşen testisler fetus geliştikçe aşağıya doğru hareket ederek doğumdan hemen önce kanalis inguinalis aracılığıyla skrotuma inerler. Testislerin temel fonksiyonlarını yapabilmeleri için bu iniş zorunludur. Testisler bu inişleri sırasında karın ön duvarı tabakalarını da sürüklediklerinden dolayı deri, Tunika dartos, Fasia spermatika eksterna, Fasia kremasterika, Fasia spermatika interna, Tunika vaginalis testis tabakalarıyla kaplıdır (Oder I.V., 1986; Kalaycı S., 1986; Kayalı ve ark., 1992; Yıldırım M., 1999; Arıncı K., 2006).

Skrotum içindeki duruşları vertikal olmayan testislerin uzun ekseni yukarıdan aşağı ve önden arkaya eğik, biri (genellikle sol testis) diğerine göre 1 cm kadar daha aşağıda bulunur (Snel, R.S., 1998). Her bir testisin facies medialis ve facies lateralis olmak üzere iki yüzü; margo anterior ve margo posterior olmak üzere iki kenarı, extremitas superior ve extremitas inferior olmak üzere de iki ucu vardır (Yıldırım, M., 1999; Arıncı ve ark., 2000; Cumhuriyet, M., 2001; Yücel, H.A., 2003).

Testis dıştan içe; tunica vaginalis'in lamina visceralis'i (epiorchium), tunica albuginea ve tunica vasculosa olarak üç tabaka ile sarılıdır. Testisin büyük bölümünü saran Tunica vaginalis periton katlantısı olup, embriyonik processus vaginalis'in distal kalıntısıdır. Tunica vaginalis; skrotum'un iç yüzünü döşeyen lamina parietalis (periorchium) ve testisi saran lamina visceralis (epiorchium) olarak iki katmandan oluşur (Cumhuriyet M., 2001; Ozan H., 2006). Epididimisin büyük kısmı ile arka kenarının mediyal bölümü dışında, testisi saran Lamina visceralis (epiorchium) ve bu iki yapıyı birbirine bağlar. Lamina parietalis (periorchium), peritonun fascia spermatica interna'yı döşeyen kısmıdır. Tunica vaginalis'in iki katmanı arasında kalan aralığa cavum serosum scroti denir. Cavum serosum scroti denilen bu aralıkta eklem sıvısına benzer, testislerin serbest hareketini sağlayan kaygan bir sıvı bulunur (Arıncı ve ark., 2006; Moore ve ark., 2006; Moore ve ark., 2007).

Tunica albuginea, lamina visceralis'in altında testisi dıştan saran mavimsi beyaz renkli, fibröz bir katmandır. Tunica albuginea arka kenarında mediastinum testis adı verilen

kalın ve vertikal bir bölme oluşturur. Mediastinum testis, organa damar, sinir ve kanalların girip çıktığı bölgedir. Mediastinum testisten testis içine giren uzantılara septula testis denir (Yıldırım, M., 1999; Cumhuriyet, M., 2001; Arıncı ve ark., 2006; Ozan, H., 2006). Septumlar, testisin derinliklerine doğru ışımsal uzanarak organı piramidal şekilli 250-300 lobçuğa (lobuli testis) ayırır. Lobuli testislerin taban kısımları periferde, tepe kısımları ise mediastinum testise yönelmiştir. Her lobçuk 1-4 tubuli seminiferi contorti (seminifer tübül) denilen kıvrıntılı tüplerden oluşmaktadır (Snell, R.S., 1998; Yıldırım, M., 1999; Cumhuriyet, M., 2001; Arıncı ve ark., 2006; Ozan, H., 2006; Ross ve ark., 2006).

Testisteki 250-300 lobçukta yaklaşık 600-1000 adet seminifer tübül bulunmaktadır. Bu tübüllerin uzunlukları 30-70 cm, çapları 150-250 μm 'dir. Tübüli seminiferi recti denilen bu kısa düz kanalların çapları genişleyerek 0,5 mm olur. Tübüli seminiferi rectiler mediastinum testise uzanarak ve birbirleriyle anastomoz yaparak rete testisi (Haller ağı) oluştururlar. Rete testis, mediastinum testisin üst bölümünde sayıları 12-15 arasında değişen efferent kanalcıklara açılır ve bu efferent kanalcıklar, tunica albuginea'yı delerek testis dışına çıkarlar (Yıldırım, M., 1999; Yücel, H.A., 2003; Arıncı ve ark., 2006; Ross ve ark., 2006; Gartner ve ark., 2007).

Tunica albuginea'nın iç yüzünü ve lobçukları döşeyen damar ağı katmanına Tunica vasculosa denir. Bu damarlar arasında gevşek bağ doku bulunur. Testis ve epididimis, aortanın dalı olan arteria testikularisten beslenirler. Testis ve epididimisin venleri, önce funiculus spermaticusun saran bir ağ şeklinde plexus pampiniformisi, daha sonra da birbirleriyle birleşerek vena testikularisi oluştururlar. Bunlar da sağ tarafta vena cava inferior, sol tarafta vena renalis sinistraya açılır (Arıncı ve ark., 2006; Oder I.V., 1986; Yıldırım, M., 1999; Yücel, H.A., 2003).

2.3. Testisin Histofizyolojisi

Spermatogenezin düzenlenmesinde sıcaklık önemlidir çünkü spermatogenez 37°C olan vücut içi sıcaklığının altındaki sıcaklıklarda meydana gelir. Testis sıcaklığı yaklaşık olarak 35°C'dir. Zengin bir venöz ağ olan pampiniform plexus testis arterlerinin etrafını sarar. Bu ağlar testis sıcaklığının sürdürülmesinde önemlidir ve sıcaklığı

dağıtmak için ters yönlü akımla sıcaklık değişimini sağlamaktadır. Soğuk günlerde, skrotum kası refleks olarak kasılarak testisleri yukarı doğru çeker, testislerin vücuda yaklaştırılması ile 2°C'lik farkın sürekliliği sağlanabilir. Bu şekilde, skrotum teorik olarak, testislere özgül soğutma mekanizması olarak görev yapar. Spermatogenez üzerinde endokrin faktörler de etkilidir (Ganong, W.F., 1995; Guyton, A.C., 1996; Hassa ve ark., 2003; Larsen, W.J., 2003; Ross ve ark., 2006, Kierszenbaum AL., 2006).

- Testosteron: Leydig hücreleri tarafından salınır ve spermatogenik hücrelerin gelişmesi için gereklidir.
- Folikül Uyarıcı Hormon (FSH): Ön hipofizden salınır. Sertoli hücrelerini etkiler. Adenil siklaz yapımını, dögüsel adenzin trifosfat (cAMP) artışını uyarır. Aynı zamanda ABP'nin (androjen bağlayıcı protein) sentez ve salgılanmasını harekete geçirir. Daha sonra ABP testosterona bağlanarak bu hormonu seminifer tübül lümenine taşır. Böylece spermatogenez uyarılmış olur.
- Östrojen: FSH ile uyarılan Sertoli hücrelerinde testosterondan yapılmaktadır.
- Luteinleştirici Hormon (LH): Leydig hücrelerini etkileyerek spermatogenik hücrelerin gelişimi için gerekli olan testosteron yapımını uyarır. Hipofizden LH salgılanması negatif geri besleme ile düzenlenir. Testosteron sentezinin artması LH salımını başkılar.
- İnhibin: Bu hormon Sertoli hücrelerinde yapılır ve FSH salınımını geri besleme mekanizmasıyla düzenler. İnhibin sürekli salınırsa FSH baskılanır. Üreme hücresi sayısı azalınca da FSH artar. İnsanda günlük sperm üretimi testis başına 94,6 milyon olarak hesaplanmıştır. Spermier dışı üreme yollarında normalde mevcut olan sıvı akıntısına karşı hareket etme yeteneğine sahiptir ve bu özelliğine pozitif reotaksis denir. Spermier dışı üreme yollarında bazı kimyasal maddeler tarafından ise kendisine doğru çekilir ve bu özelliğe de pozitif kemotaksis denir (Ganong, W.F., 1995; Guyton, A.C., 1996; Fawcett, D.W., 2002; Hassa ve ark., 2003;).

Kan ve seminifer tübüllerin iç bölgesi arasında bir bariyerin olması, testiküler sıvı içinde kandan birkaç maddenin bulunduğu anlamına gelmektedir. Kan testis bariyerinden Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar sorumludurlar ve erkek germ

hücreleri kandan gelecek zararlı maddelere karşı bu şekilde korunurlar. Sertoli hücrelerinin farklılaşması ile sperme özgü proteinler ortaya çıkar. Cinsel olgunlaşmanın immünokompetansın gelişmesinden uzun bir süre sonra ortaya çıkması sebebiyle farklılaşan sperm hücreleri yabancı olarak tanınabilir ve germ hücrelerinin ölümüne sebep olabilecek bir bağışıklık yanıtını tetikleyebilirler. Gelişen spermler ve bağışıklık sistemi arasındaki herhangi bir etkileşimi önleyen kan testis bariyeri sayesinde seminifer tübüllere immünoglobulinlerin geçmesi önlenir ki bu durumu serumlarında çok yüksek düzeylerde sperm antikorları bulunan hastalarda olan döllenmede bozukluğu açıklar. Sertoli hücre bariyeri böylece seminifer epiteli herhangi bir otoimmün tepkiden de korumuş olur (Ganong, W.F., 1995; Guyton, A.C., 1996; Fawcett, D.W., 2002; Kierszenbaum AL., 2006).

2.4. Postnatal Testis Gelişimi

Postnatal testis gelişimi; proliferasyonu, farklılaşmayı ve germ hücrelerinin, Sertoli hücrelerinin, miyoid hücrelerin ve intertisyel Leydig hücrelerinin apoptotik ölümünü kontrol eden, çok iyi organize olmuş parakrin iletişimi içerir. Erişkin testislerinin normal fonksiyon görebilmesi için testiküler hücrelerin uygun bir şekilde gelişimine ihtiyaç vardır (Nurmio, M., 2009).

2.4.1. Germ Hücrelerinin Gelişimi

Doğumda, sıçan gonositleri seminifer kordlar içinde merkezi olarak yerleşmiştir ve mitotik olarak postnatal dönemde 3-8. günlerde mitozu tekrar başlatana ve bazal membrana göç etmeye başlayana kadar sessizdirler (Beaumont ve ark., 1963; Novi ve ark., 1968; McGuinness ve ark., 1992). Yeni yerine geçen gonositler spermatogonyal kök hücre havuzunu oluştururlar ve daha ileride tip A spermatogonyaya farklılaşırlar. Tip A spermatogonyanın proliferasyonu spermatogenezin başlangıcına işaret eder.

Sıçanlarda, neonatal dönemin bitişi; pubertenin başlangıcı ile çakışır. İnsanlarda ise, doğum ile pubertenin başlaması arasında uzun bir süre vardır. Bazı gelişimsel olaylar klinik olarak fark edilmese de bu uzun puberte öncesi dönem durgun değildir. Kemiricilerde olduğu gibi, insan fetal gonositleri doğumda kordun merkezinde yerleşirler ve bazal membrana doğru hareket ederler. 0-10 yaş arası çocuklukta germ

hücre sayısı, tübüler uzunluk ve testis hacmi artar (Muller ve ark., 1983). Puberte başlangıcında, germ hücreleri ki artık spermatogonya adını alırlar, daha yüksek oranda prolifer olmaya başlarlar (Chemes ve ark., 2001).

Erişkin testisi, kök spermatogonya, farklılaşan spermatogonya, primer ve sekonder spermatositler ve spermatidleri içerir. Spermatogonyumlar, bazal membranın bitişiğinde lokalize olmuştur. Tübüler lümene ilerlerken, spermatogonyumlar, spermatoditlere ve en son olarak da spermatidlere dönüşür. Bu gelişim süreci, üç aşamaya bölünebilir; spermatogoniyanın bir seri mitotik bölünmeye gittiği spermatogonyal çoğalma, ilk mayotik bölünmenin sekonder spermatositleri oluşturduğu ikinci mayotik bölünme esnasında spermatidlerin oluştuğu mayoz bölünme ve spermatidlerin sperm benzeri olgun spermatidlere dönüştüğü spermiyogenez. Sıçanlarda, spermatogenezin devam süresi 52 gündür (Clermont ve ark., 1965) ve insanlarda ise 64-74 gündür (Heller ve ark., 2004; Amann ve ark.,2008). Spermatogenik hücreler, tübüllerde birbirlerini dalgalı biçimde ve zaman içinde dairesel biçimde izleyen belirgin hücresel ortaklık içinde düzenlenmiştir. Bunlar seminifer epitelyal döngünün aşamaları olarak bilinir. Sıçanlarda, 14 aşama vardır (Leblond ve ark., 1952) ve insanlarda 6 aşama (Clermont ve ark., 1966) vardır. Her bir aşama gelişmekte olan germ hücrelerinin benzersiz ve özel bileşimine sahiptir.

2.4.2. Somatik Hücrelerin Gelişimi

Sertoli hücrelerinin germ hücre gelişim sürecinde besinleri ve büyüme faktörlerini sağlayarak destekleyici görevleri vardır. Her bir Sertoli hücresi belirli sayıda germ hücresinin gelişimini destekleyebilir. Sertoli hücre sayısının testiküler hacim ve sperm çıkışı ile yakından ilişkili olmasından dolayı; gelecekteki doğurganlık açısından bu hücrelerin sayısı önemlidir (Orth ve ark., 1988).

Sertoli hücreleri doğumdan sonra aktif olarak bölünür, fakat sıçanlarda postnatal 15-18. günlerde bölünme durur (Clermont ve ark.,1957, Steinberger ve ark., 1971). Bundan sonra, Sertoli hücre sayısı sabit kabul edilir. Postnatal dönemde, Sertoli hücreleri ilk olarak testiste eşit olmayan biçimde dağıtılır. Ama gelişim ilerledikçe daha organize, sütun biçimli hale gelirler ve erişkin Sertoli hücre özelliklerini kazanırlar. Sıçanlarda,

postnatal 35. günde Sertoli hücreleri erişkin Sertoli hücresi için gerekli tüm karakteristikleri kazanmış olurlar (Ramos ve ark.,1979).

Primatlarda, bebeklik dönemi klasik olarak sessiz dönem olarak tanımlanmıştır ki bu dönemde testis hacmi ya da Sertoli hücre sayısı artmaz (Nistal ve ark., 1982; Paniagua ve ark., 1984). Diğer yandan, seminifer kord uzunluğundaki artışı ve testisin hacimsel artışını göz önüne alan değişkenler kullanılırsa, bu dönemdeki Sertoli hücre farklılaşması ve aktif proliferasyonu açıklığa kavuşmuş olur (Cortes ve ark., 1987; Rey ve ark., 1993). Yüksek primatların, iki Sertoli hücre proliferasyon periyoduna sahip oldukları bildirilmiştir (Cortes ve ark., 1987; Marshall ve ark.,1996). Birincisi fetal dönemde başlar ve prepubertal dönem boyunca devam eder. İkincisi pubertede başlar. Puberteye kadar testiküler gelişim esas olarak Sertoli hücreleri çoğalırken artmış tübüler uzunluk sebebiyle olduğuna dikkat etmek önemlidir. Puberte esnasında, testis büyümesi germ hücre sayısındaki artışa bağlıdır. Seminifer tübüllerin çapı; germ hücreleri çoğalırken ve tübüler lümen gelişmeye başlarken artar.

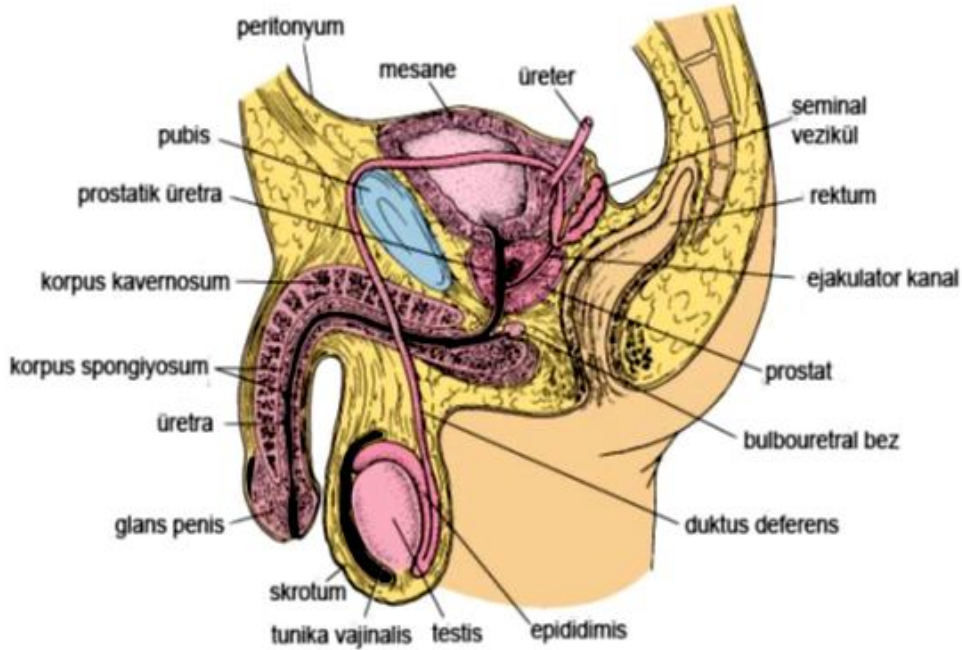
Leydig hücreleri, erkek fenotipin gelişimi ve devamlılığı için ihtiyaç duyulan testesteron ve insülin benzeri büyüme faktörü 3 'ü salgılar. Memelilerde iki nesil Leydig hücreleri vardır: fetal ve erişkin tip Leydig hücreleri. Sıçanlarda, embriyonik 15,5. günde fetal-tip Leydig hücreler ortaya çıkar (Roosen-Runge ve ark.,1959; Magre ve ark., 1980). Bu hücrelerin orijini belirsizdir ama mezonefor ya da gonadal yükseltiden gelişmekte olan testise hareket eden mezenkimal-benzeri hücrelerden orijin aldıkları ileri sürülmüştür (Haider ve ark., 2004). Yetişkin tip Leydig hücreleri postnatal ikinci haftadan itibaren farklılaşmaya ve fetal tip Leydig hücrelerin yerini almaya başlar (Lording ve ark., 1972). Bu yetişkin tip Leydig hücrelerinin sayısı postnatal gelişimin beşinci haftasına kadar artar (Lording ve ark., 1972) ve testesteron üretimi aynı şekilde devam eder (Lee ve ark., 1975).

Bütün memeli türlerinde seminifer tübüllerin etrafını kuşatan peritübüler miyoid hücreler mezenşimden köken alır. Sıçanlarda ve farelerde tek katlı bir tabaka iken insanlarda bu tabaka 1 ila 6 tabakalıdır (Bustos-Obregon ve ark., 1973). Peritübüler miyoid hücreler kasılabilir ve onların hareketi spermatozoanın ve seminifer tübüllerdeki

testiküler sıvının taşınmasını kolaylaştırır (Kormano ve ark., 1972). Sıçanlarda peritübüler miyoid hücreler yaklaşık postnatal 15. günde kasılmaya başlar (Kormano ve ark., 1972). Miyoid hücreler yapısal destek ve hareketin yanında seminifer epitelin düzenlenmesinde aktif olarak katılır. Sıçanlarda postnatal testisin büyüme fazı boyunca peritübüler miyoid hücreler Sertoli hücreleri ile uyum içerisindedir ve gelişim boyunca onların yakın ilişkisi bilinir (Palombi ve ark., 1992)

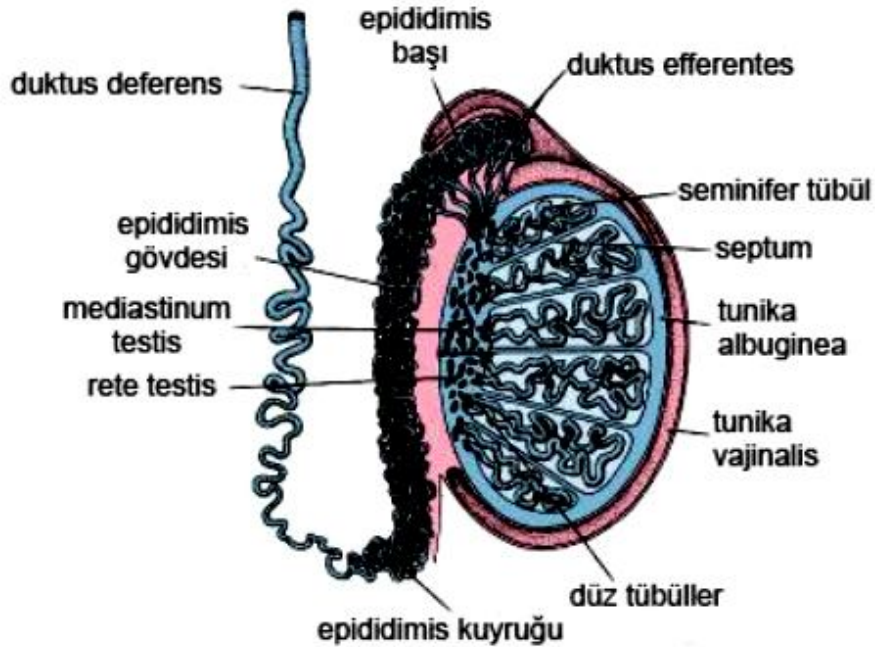
2.5. Testis Histolojisi

Erkek üreme sistemi; sperm üreten, sentezleyen ve androjenleri salgılayan testislerden, dışarıya spermatozoa taşınmasından sorumlu olan dış kanallar sistemini oluşturan epididimis, duktus deferens, ejakulatuar kanal ve erkek üretrasının bir parçasından, salgıları semen kitlesini oluşturan ve ejaküle spermatozoaya besinler sağlayan aksesuar bezler olan seminal vezikül, prostat bezi, bülboüretal bezler ve erektil dokudan oluşan çiftleşme organı penisten oluşur (Şekil 2.2). Testis, epididimis ve duktus deferensin başlangıç kısmı tunika vajinalis denilen mezotelyum ile döşeli boşluğu içine alan deriyle kaplı bir cep olan skrotal kese içinde yer alırlar. Bu yerleşim testislerin vücut ısısından 2-3°C düşük ısıda olmalarını sağlar (Kierszenbaum AL., 2006).



Şekil 2.2: Erkek genital sistemi (Histology: A text and atlas, 2003)

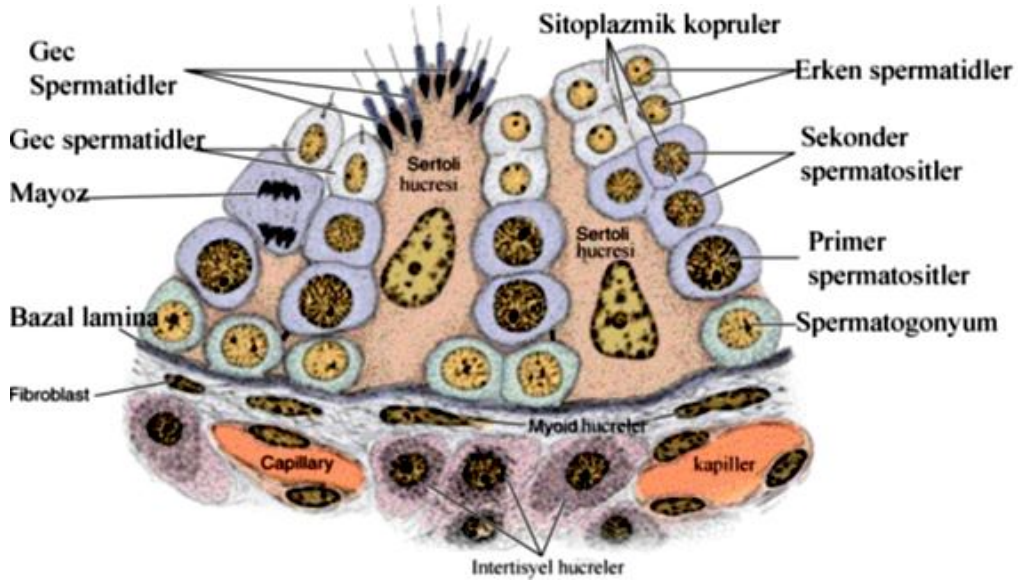
Her bir testis yoğun bağ dokusundan oluşan kalın bir kapsül olan tunika albuginea tarafından çevrelenmiştir. Tunika albuginea testisin posterior yüzünde kalınlaşır ve bu kalınlaşan bölgeye mediastinum testis adı verilir. Bu fibröz septa beze doğru ilerler ve testiküler lobül adı verilen yaklaşık 250 ila 300 piramidal lobüle böler. Aralarında çoğunlukla iletişim olan bu herbir lobülden biri gevşek bağ dokusu ile sarılı 1-4 seminifer tübül içerir. Bu bağ dokusunda bol miktarda kan ve lenf damarları, sinirler, makrofajlar ve androjen üreten Leydig hücreleri gibi interstisyel hücreler bulunur. Erkek üreme hücreleri olan spermatozoonları oluşturan her bir seminifer tübül yaklaşık 150-250 µm çapında ve 50 cm uzunlukta iki ucu U şeklinde olan ve rete testise açılan tüplerdir. Karmaşık yapıda çok katlı bir epitelyum ile döşelidir. Kıvrımlı tübüller bir şebeke oluştururlar ve bu şebekedeki her tübül başlangıçta kör uçludur ve dallara ayrılır. Her bir tübül sonlanırken lümeni daralır ve tubuli rekti denilen düz tübüller halinde devam eder. Bu düz tübüller, seminifer tübülleri rete testise bağlar. Rete testis, seminifer epitelyumun ürünlerini (testiküler sperm, salgısal proteinler ve iyonlar) toplayan kanallar ağıdır. 10-20 duktuli efferentes ile epididimisin baş kısmını bağlar (Şekil 2.3) (Jangueria ve ark., 1998; Kierszenbaum AL., 2006; Ross ve ark., 2003).



Şekil 2.3: Testis ve genital kanallar (Histology: A text and atlas, 2003)

2.5.1. Seminifer Tübüller ve Hücreleri

Somatik hücreler ve germ hücrelerinden oluşan özelleşmiş seminifer epitelyum ile döşeli merkezi bir lümeden oluşan seminifer tübüller 30-70 cm uzunluğunda, 150-200 mikron genişliğinde çok kıvrıntılı kanalcıklardır. Seminifer epitelyum bir bazal membran ile kollajen lifler, fibroblastlar ve kasılabilir miyoid hücrelerden oluşan tunika propria ile çevrilidir. Kıvrımlı tübüller lobülün apeksine doğru kıvrımlarını kaybederek düz tüp biçimi alır. Bunlar tubuli rekti olarak adlandırılırlar. Boşaltıcı duktusların ilki tubuli rektilerdir. Düz tübüller mediastinumda bulunan anastomozlaşan kanallar olan rete testis ile devam eder. Rete testis, duktus deferens ile epididimisin baş kısmına bağlanmıştır (Aktümsek A., 2004; Jangueria ve ark., 1998). Seminifer tübüller bir fibröz bağ dokusu kılıfı, bazal lamina ve kompleks bir germinal veya seminifer epitelden oluşur. Seminifer epitelde germ hücreleri olan spermatogenik hücreler ve germ hücrelerine destek olan ve onları besleyen Sertoli hücreleri vardır (Şekil 2.4). Birbiri üzerine sıralanmış farklı gelişim aşamasında olan spermatogenetik hücrelerden bazal membrana en yakın olanı spermatogonyumlardır. Spermatidler ise lümen en yakın bulunan, daha olgun hücrelerdir. Lümende spermiumlar izlenir. Spermatogenik hücrelerin biçimleri farklı olduğundan tübül lümeni düzensiz görünümündedir (Jangueria ve ark., 1998; Eşrefoğlu M., 2009).



Şekil 2.4: Seminifer tübülün şematik gösterimi (Jangueria ve ark., 1998)

2.5.1.1. Sertoli Hücreleri

Sertoli hücreleri bazal laminadan lümene doğru uzanan çok yönlü ve spermatogenik serideki hücreleri kısmi olarak saran uzamış piramidal hücrelerdir. Sertoli hücrelerinin tabanları bazal laminaya tutunur, apikal uçları ise sıklıkla seminifer tübülün lümenine uzanır. Tübüller arası boşluk ve seminifer tübül lümeni arasında köprü hücreler olarak görev yaparlar. Sitoplazmaları eozinofilik, bazale yerleşmiş bir iki çentikli oval çekirdekleri vardır ve çekirdekçik belirgindir. Sertoli hücrelerinin apikal ve lateral hücre membranlarının sınırları düzensizdir. Elektron mikroskopu ile yapılan incelemelerde geniş bir nükleolus ve heterokromatine sahip üçgen biçiminde olan uzamış oluklu nükleus, sitoplazmada bol miktarda düz endoplazmik retikulum, bir miktar granüllü endoplazmik retikulum, iyi gelişmiş Golgi kompleksi, çok sayıda mitokondrion, lizozomlar ve vimentin, aktin ve mikrotübüllerden oluşan zengin bir hücre iskeleti görülür. Sertoli hücrelerinin çoğalamamalarının nedeni erginde mitotik aktivitelerinin olmamasıdır. Sertoli hücreleri özellikle enfeksiyon, kötü beslenme, x-ışını ışınımı gibi olumsuz koşullara karşı oldukça dayanıklıdır ve bu zararlı etkiler karşısında spermatogenik seri hücrelerine göre çok daha dirençlidirler.

Komşu Sertoli hücrelerinin uzantıları birbirlerine sıkı bağlantılarla bağlanmıştır ki bu sıkı bağlantılar sayesinde kan-testis bariyerini oluşturur ve epitelyum tabakayı bölmelere (kompartman) ayırır. Spermatogonyumlar ve erken primer spermatositler, içine kanda bulunan materyallerin serbestçe girebildiği bazal kompartmanda yerleşirler. Spermatogenez sırasında spermatogonyum serisi, bu bağlantılardan bir şekilde geçerek adluminal kompartmana çıkarlar. Sertoli hücrelerinin arasındaki sıkı bağlantıların oluşturduğu kan-testis bariyeri ile gelişmekte olan spermatositler ve spermatidler kandan gelen ürünlerden ve otoimmün reaksiyonlardan korunurlar. Spermatositler ve spermatidler, Sertoli hücrelerinin apikal ve lateral kenarlarındaki derin girintilerde yerleşmişlerdir. Spermatidlerin flagellar kuyrukları geliştikçe bunlar Sertoli hücrelerinin apikal uçlarından çıkan püsküller şeklindeki çıkıntılar halinde görülürler. Sertoli hücreleri 'gap junction' denilen birleşmelerle de ilişki kurar ve bu yolla hücrelerin iyonik ve kimyasal alışverişi sağlanır. Bu da seminifer epitelyum siklusunun koordinasyonunda önemlidir.

Sertoli hücrelerinin önemli fonksiyonları vardır;

- Gelişmekte olan spermatogenik seriye ait hücreleri desteklemek, korumak ve beslemek.
- Komşu sertoli hücrelerinin oluşturdukları bariyer ile sperm hücrelerini immünolojik saldırıdan korumak.
- Seminifer tübül lümenine genital kanallar yönünde akan ve sperm hücrelerinin kolay bir şekilde taşınması için kullanılan bir sıvı salgılamak.
- Seminifer tübül içinde spermatogenez için gerekli olan testosteronunun yoğunlaşmasını sağlayan androjen-bağlayıcı proteini (ABP) salgılamak. Androjen bağlayıcı protein (ABP) sekresyonu Sertoli hücreleri tarafından FSH ve testosteron kontrolü altında gerçekleştirilir. Bu protein, gelişen spermatogenik hücrelerin çevresinde spermatogenez için gerekli olan testosteron yoğunluğunu sağlar.
- Testosteronu östradiol haline çevirmek.
- Spermiyogenezin son evresinde spermatidler tarafından atılan artık cisimcikler olarak adlandırılan fazla hücre kısımlarının lizozomlar tarafından fagositoz ile sindirilmesi.
- Hipotalamus ve ön hipofiz bezinden Folikül uyarıcı hormon (FSH) sentez ve salınmasını önleyen inhibin adlı peptidi ve FSH salınımı üzerine olumlu bir etki gösteren aktivini salgılamak.
- Embriyonun gelişimi sırasında AMH (Anti Müllerian Hormon)'u salgılamak. Anti Müllerian hormon embriyonik gelişme sırasında erkek fetusta Müller (paramezonefrik) kanalların gerilemesini sağlayan bir glikoproteindir. Testosteron ise Wolf (mezonefrik) kanallardan köken alan yapıların gelişmesini sağlar.
- Erkek üreme hücrelerine demir taşıdığına inanılan testiküler transferinin sentezlenmesi ve salgılanmasında görev almak (Çanilloğlu Y., 2008; Bozdoğan S., 2012;)

2.5.1.2. Spermatogonyumlar

Spermatogonyumlar bazal kompartmanda yerleşik bazal lamina ile direkt ilişkide olan 12 µm çapında diploid spermatogenik hücrelerdir. Kan-testis bariyerinin dışında yer almalarının nedeni Sertoli hücreleri arasındaki tıkaçıcı bağlantıların altında yer almalarıdır. Spermatogonyal kök hücrelerin erkek fertilitesinde önemli etkileri vardır. Bu hücreler kısmen sessiz hücrelerdir ve bu nedenle radyasyon ve kanser kemoterapisine dirençlidirler. Mitotik olarak bölünen spermatogonyumlar, mayotik bölünen spermatisitler ve farklılaşmakta olan spermatidler kanser kemoterapisine ve radyasyona duyarlıdır. Spermatogonyal kök hücreleri radyoterapi ve antikanser kemoterapisinin sonlandırılmasından sonra spermatogenik süreci yeniden oluşturabilirler. Bunlar çekirdeğin büyüklüğü, kromatin dağılımı ve histokimyasal özelliklerine göre iki tipdir Jangueria ve ark., 1998; Kierszenbaum AL., 2002 Gartner ve ark., 2003; Cooper ve ark., 2007);

1. Tip A (Kök hücre): Seminifer tübülün bazal laminası üzerine oturmuş yassı çekirdekli hücrelerdir. Kromatin içeriğine göre koyu ve açık olarak ayrılmakta ve koyu olanlar rezerv hücreler olarak kabul edilmektedir. Mitozla çoğalınca yarısı Tip A olarak kalır, yarısı büyüyerek Tip B'ye dönüşür. Tip A spermatogonyum spermatogenik serinin kök hücreleridir.

2. Tip B: Ana spermatogonyumlardan daha büyük hücrelerdir. Çekirdeği çok yuvarlaktır, koyu boyanır. Tip B'nin mitozla çoğalmasıyla oluşan hücrelerin hepsi farklılaşarak primer spermatisiti yapar (Rıhtım T., 2011)

2.5.1.3. Primer ve Sekonder Spermatisitler

Tip B spermatogonyumlar mitotik bölünmeler geçirdikten sonra son S fazını (DNA sentezi) tamamladıktan hemen sonra mayoz bölünmenin profaz aşamasına girerler. Spermatogenik hücrelerin esas DNA sentez aktivitesinin bu son aşaması mayozun profaz I aşamasına başlayan bir primer spermatisitin spermatogonyuma göre iki kat DNA miktarına sahip olacağını belirler. İki başarılı mayotik hücre bölünmesi geçiren spermatisitler Sertoli hücreleri arasındaki tıkaçıcı bağlantıların hemen üzerinde, seminifer tübülün adluminal kompartmanında yer alırlar. Dolayısıyla, mayoz bölünmeler kan-testis bariyerinin içinde gerçekleşir (Jangueria ve ark., 1998;

Kierszenbaum AL., 2002 Gartner ve ark., 2003; Kierszenbaum AL., 2006; Cooper ve ark., 2007).

Primer spermatositler seminifer epitelin orta bölümünde bulunan, küre ya da oval biçimli hacmi en büyük olan hücredir ve iki adet sekonder spermatositi oluşturmak üzere birinci mayoz bölünmeye giderler. Primer spermatositlerin mayoz bölünmesi sonucu oluşan haploid kromozumlu küçük hücreler olan sekonder spermatositler çok hızlı bir şekilde interfaz aşaması ve belirgin bir DNA sentezi olmayan (sadece tamir DNA sentezi meydana gelir) ikinci mayoz bölünmeye giderler. Sekonder spermatosiler herhangi bir hücre bölünmesi göstermeden sperm şeklinde olgunlaşan iki adet spermatid meydana getirir. Birinci mayoz bölünmenin sonunda, primer spermatositin 4C DNA miktarı sekonder spermatositte 2C'ye düşer. İkinci mayoz bölünme sonucunda 2C DNA miktarı 1C'ye düşer. Meydana gelen spermatidler haploid spermatidlerdir ve spermiyogenez denilen karmaşık bir farklılaşma sürecini başlatırlar (Kierszenbaum AL., 2006).

2.5.1.4. Erken ve Geç Dönem Spermatidler

Spermatidler seminifer tübül lümenine yakın adlüminal kompartımda bulunan mayoz bölünme sonucunda oluşan haploid hücrelerdir ve spermatogenez aşamasında spermatozoanın oluşumundan önceki en son hücrelerdir. Sertoli hücreleri tarafından beslenerek yeniden şekillenirler (Kierszenbaum AL., 2006). Erken spermatidler, yuvarlak ve poligonal şekillidirler ve çekirdeklerinde heterokromatin bulunmaz ve belirgin bir golgi kompleksleri bulunur. Akrozom gelişmesinin kep aşamasında Periyodik asit Schiff (PAS) ile pozitif reaksiyon göstererek yuvarlak şekilli görünürken geç spermatidler ise yine PAS pozitif reaksiyon göstererek akrozomlarının uzamış haliyle görünürler (Zhengwei ve ark., 1990; Cooper ve ark., 2007).

2.5.1.5. Spermatozoa

Kompleks fonksiyonlarını yerine getirebilmek için oldukça özelleşmiş bir morfolojiye sahip olan spermium temel olarak enerji üretilmesinden ve hareketlilikten sorumlu olan kuyruk ile DNA'yı içeren ve ovositin zona pellusidasını tanıyarak sperm-ovosit

birleşmesini sağlayan baş bölgesinden oluşur. Bu her iki temel bölge de kendi içlerinde fonksiyonlarına göre alt bölgelere ayrılmışlardır.

2.5.1.5.1. Kuyruk

Enerji üretim bölgesi olan spermiyumun kuyruk bölgesi sperm hareketinden sorumludur. Fertilizasyonun gerçekleşmesi için hareketlilik gerekli bir özelliktir. Spermiyum öncelikle epididimide hareketli hale gelir ve hareketliliğe postejakulasyonun erken dönemlerinden başlayıp, servikal mukusu geçmek, utero-tubal birleşimi geçmek ve ovosite ulaşmak için ihtiyaç duyar. İnsan spermiyumu kuyruğu dört ana bölgeye ayrılabilir; kısa bir bağlantı parçası, orta parça, esas parça ve son (terminal) parça. Fonksiyonuna bağlı olarak her bir bölgenin farklı yapısı vardır. Bu dört bölgeye aksonom ve dış yoğun fibriller denilen iki diğer yapı eşlik eder. Dört parçanın bazılarında ortak olduklarından dolayı bu yapılar ayrı yapılar olarak değerlendirilirler.

Spermiyumun kuyruğunun dört parçasında da aksonom ya da aksiyel filaman mevcuttur ve bu filamanlar kuyruğun motor parçasını oluşturur. Aksonom yapısı tüm ökaryotik hücrelerde bulunan silya ve flagellum yapısına benzer. İki adet merkezi mikrotübül ve eşit aralıklarla dizilmiş dokuz adet mikrotübül çiftinden oluşur. Dokuz adet periferik mikrotübül çifti saat yönünde birden dokuza kadar numaralanır. Burada bulunan dinein kolları aralıklarla dizilirler ve pozisyonlarına göre iç ya da dış adını alırlar. Bu kollar kuyruk hareketinde önemli role sahiptirler çünkü mitokondriyonlarda oluşan kimyasal enerjiyi kinetik enerjiye çevirerek hareketi sağlarlar. Bu kolların temel molekülü Ca^{+2} Mg^{+} bağımlı ATPaz izomer proteini olan “dinein”dir. Komşu tübüllerin birbirine göreceli olarak kaymalarını sağlayan dinein kolları kas kasılmasında gözlenen kayan filamanlara benzer bir mekanizma ile kuyruk hareketini meydana getirir (Farrell, K.W., 1982).

Kuyruk ile sperm başı arasında 0.5 μm uzunluğunda kısa parçaya bağlantı parçası denir. Ana parçaları; “kapitulum (başçık)” denilen sıkı, kubbe şeklinde bir fibröz yapı ile segmentli kolonlardır. Kafa-kuyruk bağlantısı, kapitulum ve nükleusun kuyruğa bakan yüzeyinde uzanan bazal plâk arasında yer alan çeşitli proteinöz filamanlar tarafından

sağlanır. Proksimalde yer alan iki parçalı kolon yapısı kaynaşarak, kapitulumu gömülen iki büyük ve beş küçük kolonları meydana getirirken, distaldeki dokuz kolon üst üste gelerek orta parçadaki dış yoğun fibrillere tutunurlar (Curry MR, W.P., 1995). Bu kolonların üzerinde, birbirleriyle 6,5 nm aralıklarla dizili enine çizgilenmeler vardır. Bu kolonların fonksiyonu henüz net olarak bilinmemekle birlikte, bunların adeta bir eklem gibi bir arada olduğu, dolayısıyla spermin boyun bükme hareketlerine kapitulum-bazal plâk bağlantısına zarar vermeden esneklik sağladığı düşünülmektedir (Curry MR, W.P., 1995).

Bir dış yoğun fibril ile ilişkide olan her bir mikrotübül çifti parçalı kolonların distalinden başlayarak esas parça kısmında sonlanırlar. Dış yoğun fibriller enine kesitlerde gözyaşı damlası şeklinde izlenirler. Dış yoğun fibrillerin yuvarlak, geniş kısımları dışta yer alırken daralan kısımları ise aksonom tarafındadır. Her biri içte medulla ve dışta onu saran korteksten oluşur. Kesintili olan kortekse rağmen medulla oldukça kararlı bir yapıdır. Ancak, korteks az stabil olup Sodyum Dödesil Sülfat (SDS) uygulaması ile çözünür. Bu fibriller, kasılabilir proteinler içermezler ancak ATPaz ya da Ca²⁺ bağlayıcı rolleri nedeniyle hareketliliğin kontrolünde bir rolleri olabileceği gibi bunların kuyruğun sert yapısını destekleyerek asimetric dizilimlerinin kuyruğun hareketlerine izin verdiği düşünülmektedir (Serres ve ark., 1983).

Orta parçası kuyruğun 3,5 µm uzunluktaki parçası olup bağlantı parçasının en distalindeki anulus hizasına kadar uzanır. Anulus orta parça ve esas parça arasındaki bağlantıyı işaretleyen çevresel banttır. Çeşitli sayıda sarmal dizimli mitokondriyonlara sahip olması orta parçanın en önemli karakteristik özelliğidir. İnsan sperminin mitokondriyonları düzensiz aralıklarla diziliyken, diğer türlerde bu dizilim yüksek bir organizasyon gösterir. Sperm mitokondrisinin dış membranı oldukça stabil bir yapı gösterirken, iç membran yapısı diğer hücrelerdekilere benzer. Bunun nedeni disülfid bağlarının varlığı olabilir. Bu tür bir dış membranın fonksiyonunun kuyruk hareketi sırasındaki gerilmelere dayanıklılık olabileceği düşünülmektedir (Curry MR, W.P., 1995; Phillips, D., 1970).

Esas parça kuyruğun en uzun parçasıdır (55 μm) ve anulustan terminal parçanın proksimaline kadar uzanır. Aksonom ve dış yoğun fibrilleri saran sitoiskelet yapısındaki fibröz kılıf içermesi karakteristik özelliğidir. Fibröz kılıf merkezi mikrotübül çiftinin düzleminde bulunan 2 periferel, longitüdünel kolona sahiptir ve bu kolonlar sıkı paketlenmiş filamanlar olan kurdele benzeri yapılarla birbirlerine bağlanırlar. Fibröz kılıfın yapısal proteinleri arasındaki disülfid bağları bütün yapıyı oldukça stabil bir hale getirirler. Görevlerinin aynı dış yoğun fibrillerin de olduğu gibi elastik bir korse yapısını sağlayarak kuyruk hareketini kontrol etmek olduğu düşünülmektedir (Curry MR, W.P., 1995).

Fibröz kılıfın ilerisinde kuyruğun 3 μm uzunluğundaki terminal parçası yer alır. Bu parçada aksonomun mikrotübül elemanları sonlanır. Ortada yer alan mikrotübül çifti yok olur ve dış mikrotübül çiftlerinden iki tanesi merkeze hareket ederek, 7 adet rastgele dağılmış mikrotübül çifti tarafından sarılır. Çiftler ayrılır ve B tübülleri yok olarak, sadece 1 mikrotübülden oluşan ve yalnızca hücre membranı ile çevrelenmiş yapıyı oluşturur. Dolayısıyla, kuyruğun ucuna doğru gidildikçe kalan tübüllerin mükemmel bir şekilde sonlandırılması gerçekleşir (Pedersen, H., 1972).

2.5.1.5.2. Baş

Sperm başının fonksiyonları; DNA'yı içermesi, koruması ve fertilizasyon sırasında içeriğini ovosite aktarmasıdır. Bunu gerçekleştirmek için; DNA erkek pronükleusunun oluşmasına kadar stabil bir formda tutulmalıdır, spermiyum ovositin etrafındaki tabakaları geçmeli ve ovosite ulaşmalıdır, sperm ve ovosit tanınması için türe özgü bir mekânizma olmalıdır ve ovosit membranı ile füzyon yeteneğinde olmalıdır. Bu fonksiyonlarını gerçekleştirmek için sperm hücresinin baş kısmı az sayıda organelle sahiptir. Bu organeller nükleus dışında baş bölgesinde bulunan akrozom ve postakrozomal kılıftır. Bütün memelilerde ortak olan sperm başının temel organizasyonuna rağmen hem nükleusun hem de akrozomun dolayısıyla sperm başının şekli ve boyutu farklı ve türe özgüdür. İnsan spermiyumunda baş şekli pleomorfik olarak tanımlanır ve bu tanım heterojen tipteki sperm şeklini ifade eder ve sonuçta normal şekil ve boyut tanımını oldukça güçleştirir. Bununla birlikte, normal sperm

başının yaklaşık 4–5 µm uzunluğunda ve yaklaşık 3 µm genişliğinde olduğu kabul edilir (Siegel ve ark., 1987).

Akrozom spermiyum nükleusunun ön kısmını çevreler ve bir takke benzeri membrana bağlı veziküldür. Nükleusun yaklaşık üçte ikisini kaplayan akrozom insan spermiyumunda göreceli olarak küçüktür ve ön kenarın ucuna kadar uzanmaz. Dış akrozomal membran hemen hücre membranı altında uzanır ve akrozom şapkasının arka kenarlarında nükleer kılıfın üzerine uzanan iç akrozomal membran ile devam eder. Birbirine paralel uzanan bu iki membran araları dar bir boşluk olan akrozomal matriks ile doludur. Bu matriks çok sayıda çeşitli hidrolitik enzimleri içerir. Bunlardan en önemli iki tanesi ve en iyi tanımlananları hiyalüronidaz ve proakrozin denilen inaktif zimojen formunda bulunan tripsin benzeri proteinaz akrozindir (Siegel ve ark., 1987).

Asit fosfataz, fosfolipazlar, N-asetilglukozaminidaz ve kollajenaz ise akrozomal matriksteki diğer enzimlerdir. Bazı hayvan türlerinde yapılan çalışmalarda bu çeşitli enzimlerin akrozomda rastgele dağılmadıkları aksine paketlenmiş bir halde buldukları dolayısıyla sıralı bir aktivasyon mekanizmasıyla salındıkları hakkında kanıtlar vardır. Bu enzimler akrozom reaksiyonu denilen temel bir ekzositotik olayla salınırlar. Spermiyumun belirgin bir özelliği, ekvatoryal bölge denilen akrozomal kılıfın arka sınırında yer alan stabil bölgenin varlığıdır ve ön akrozomun enzim içeren matriks yapısı bu bölgede mevcut değildir. İnsan spermiyumunda ekvatoryal bölge aynı zamanda vimentin birikimine sahip bir alandır. Bu özellik sitoskeletal elemanların varlığı ile güçlenen oldukça stabil bir membran yapısını akla getirir. Akrozomal reaksiyonun ardından ekvatoryal bölge bozulmadan kalır. Ön akrozom ve ekvatoryal bölge arasındaki sınırdaki dış akrozomal membran hücre mebranı ile birleşerek akrozomal şapka kaybının ardından hücre bütünlüğünü korur. Ekvatoryal bölgenin üzerini örten plazma membranı bölgesi sperm-ovosit tanınmasının ve füzyonunun gerçekleştiği alandır. Bu nedenle akrozomun ekvatoryal bölgesi bu kritik membran alanında özellikle zona pellusida penetrasyonu sırasında sıkıca stabilize edilmiştir (Holt, W.V., 1979; Virtanen ve ark., 1984; Curry MR, W.P., 1995; Morales ve ark., 2004).

Plazma membranı sperm başının ön bölgesini çevreler ve iki önemli işlemde yer alır. Bunlar; zona pellusidayı tanıma ve bağlanma ile ekzositotik akrozom reaksiyonu sırasında alttaki dış akrozomal membranla birleşmedir. Bu fonksiyonların her ikisi de kapasitasyonla birlikte meydana gelen membran yapısının belirgin özelliklerin değişmesiyle ilişkili olabilir. Zonaya bağlanma muhtemelen bu bölgede yoğun olan membran glikokaliksinde bulunan kompleks glikokonjugatlar aracılığı ile gerçekleşir. Bununla birlikte spesifik karbonhidrat kısımlarını tanımları nedeniyle lektinler hücre yüzey proteinlerinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılırlar (Elgavish ve ark., 1997).

Ovosit ile sperm membranlarının birleşmesinin gerçekleştiği tek olan bölge ekvatoryal bölgedir. Bununla birlikte, sperm-ovosit birleşmesi ancak akrozomal reaksiyon tamamlandıktan sonra gerçekleşebilir ve buna dayalı olarak akrozomal reaksiyon sırasında ekvatoryal bölgede önemli fizyolojik membran değişikliklerinin görüldüğü söylenebilir fakat bu fikri destekleyecek önemli bir yapısal değişikliğin membranda olmadığı anlaşılmıştır. Ekvatoryal bölgedeki membran büyük oranda stabildir ve muhtemelen ön ve arka postakrozomal membran bölgeleri arasındaki intramembranöz partikül geçişini önleyen bir bariyer görevi yapar (Yanagimachi, R., 1988).

Akrozomun hemen altında olan perinükleer materyal akrozomu nükleustan ayıran ince bir tabakadır. Bu tabaka disülfid köprüleri ile sağlamlaştırılmış nükleusu örten devamlı bir tabaka oluşturur. Akrozom ve nükleus arasında çimento benzeri bir madde olarak rol alır. Bu madde akrozomun arka kısmında postakrozomal kılıfı oluşturur. Yapısı kompleks olmasına rağmen postakrozomal kılıfın fonksiyonu hakkında belirgin bir bilgi henüz bilinmemektedir.

Sperm nükleusunun kromatini DNA ile arjinin ve sisteinden zengin ve protaminler denilen bazik proteinler içerir. Somatik hücrelerden farklı olarak sperm nükleoproteinleri türler arasında farklılıklar gösterir. Birçok memeli türünde bir adet predominant protamin mevcutken insan ve fare spermlerinde iki adettir. Protaminler DNA'daki fosfat-ester çatısının yükünü nötralize ederek kromatinin sıkı paketlenmesini sağlar. Protaminlerin sistein içeriği serbest tiyoller arasındaki disülfid çapraz

köprülerinin oluşmasına izin verir. Nükleusa oldukça stabil keratinoid karakterini veren bu çapraz bağlanma spermiyogenezin geç basamaklarında başlar ancak esasen epididimisten geçiş sırasında tamamlanır. Nükleusun bu yüksek stabilitesi ve bu stabiliteyi bozmak için gerekli olan ciddi uygulamalar kromatin paketlenmesinin düzenlenmesinin anlaşılmasını zorlaştırır. Nükleus haploid sayıda kromozom sayısına sahiptir ve her bir kromozom çiftinin bir tanesini içerir. DNA tamamen inaktiftir ve spermin ovositin içine girmesinden sonra protaminlerin yer değiştirmesine kadar replike olmaz (Kolk ve ark., 1975).

Sperm genotipi tarafından belirlenen nükleusun şekli birçok türde tek tip olan türe özgü karakterdedir. Uzayarak incelenden, kısa yuvarlak nükleuslara kadar değişen çeşitlilikler göstermesi nedeniyle insan spermatozoası bu kuralın istisnasını oluşturur. Nükleus şeklinin değişkenliği morfolojik olarak normal yani oval şekilli insan sperm çekirdeğini tanımlamayı zorlaştırır. Nükleusun şeklindeki bu değişkenlik kromatin kondenzasyonundaki değişkenliğe bağlanabilir. Çünkü birçok nükleusta çeşitli vakuoller ve zayıf kondanze olmuş kromatin alanları bulunabilir. Bu vakuollerin ve diğer kondanzasyon defektlerinin spermiyumun fertilizasyon kabiliyetini olumsuz yönde etkileyip etkilemediği henüz bilinmemektedir. Plazma membranı ve nükleus zarı arasındaki çevresel bir bağlantı noktası olan posteriyor halka küçük membran partiküllerinden oluşan bir seri çizgilenmelerden meydana gelir. Posteriyor halka kuyruğun annulus yapısına benzer olarak membran bölgeleri arasında fiziksel bir bariyer olup, kuyruk ile baş bölgelerini ayıran temel bir bölünme noktası olarak görev yapar. Bu çizgili bandların ön tarafında yer alan ve nükleer delikler içermeyen nükleer kılıf, iç ve dış laminaları arasında daralır. Bu sıra dışı özellikler muhtemelen yüksek oranda kondanze olmuş kromatin yapısı ile sperm nükleusunun kararlı yapısını yansıtır (Pedersen, H., 1972; Bedford JM, HD.,1990).

Sitoplazmik damla, spermiyogenez sırasındaki hücrenin morfolojik olarak yeniden şekillenmesinden sonra, arta kalan (rezidüel) sitoplazma kalıntılarını içerir. İnsan spermiyumu kuyruğun orta parça ve bağlantı parçası çevresinde çok sayıda ribozom ve mitokondri gibi organel fazlalıklarını içeren sitoplazmik bir damla içerir (Bedford JM, HD.,1990).

Sperm plazma membranı birçok hücre tiplerinin aksine yapı ve fonksiyon olarak oldukça heterojendir ve keskin sınırlarla ayrılmış çok sayıda membran bölgesi içerir. Sperm plazma membranı membranın hem yüzey özelliklerini hem de üç boyutlu yapısını yansıtır ama farklı olarak erkek üreme yollarından geçiş sırasında oluşturulan membran bölgelerinin bileşenleri ve yapıları sabit değildir ve buna bağlı olarak dişi üreme yollarındaki kapasitasyon sırasında yeniden organize olur. Sperm yüzeyi beş belirgin membran bölgesine sahiptir, her biri altındaki hücre kompartmanı ile yakından ilişkili olup her biri hücre fonksiyonunun değişik aşamalarında görev alır.

Kuyruk orta parçası ve esas parçası üzerinde iki farklı plazma membranı bölgesi vardır. Baş bölgesinde ise, ekvatoryal bölge, postakrozomal bölge ve akrozomu örten bölge olmak üzere üç belirgin plazma membranı bölgeleri mevcuttur. Ayrıca, membran yüzeyinde elektriksel yükler açısından da farklılıklar vardır. Birbirinden farklı bölgelerin sınırlanması görevini üstlendiği düşünülen ve plazma membranının altında yer alan hücre iskeleti elemanlarının da bölgesel özelleşmeleri olduğu yönünde kanıtlar vardır. Hücre ölümüyle birlikte bölgesel yapıların kaybolması membran bölgelerinin bütünlüğünün devamında en azından kısmen hücre içindeki aktif bir sürecin rol aldığını gösterir. Özgün bölgesel membran içeriği, kapasitasyon ve hareketlilik gibi birçok hücre işlevinin aynı anda başarılmasını kolaylaştırır (Friend ve ark., 1974).

2.5.2. İnterstisyel Alan ve Hücreleri

Testis kütlelerinin %25-30'unu gevşek bağ dokusu oluşturur. Seminifer tübüllerin arasında yer alan interstisyel bağ dokusu, kollajen lifler, kan ve lenfatik damarlar, sinirlerden zengin gevşek bağ dokusudur. Bu dokuda fibroblastlar, makrofajlar, mast hücreleri ve farklılaşmamış mezenşimal hücreler bulunur. Leydig hücreleri veya interstisyel hücreler olarak adlandırılan yuvarlak veya poligonal şekilli, yuvarlak nükleuslu, asidofil sitoplazmalı hücreler bağ dokusu içerisinde tek tek veya gruplar şeklinde görülürler (Leeson ve ark., 1988; Eşrefoğlu M., 2009).

2.5.2.1. Leydig Hücreleri

Leydig hücreleri veya interstisyel hücreler olarak adlandırılan bu hücreler yuvarlak veya poligonal şekilli, yuvarlak nükleuslu, asidofil sitoplazmalı olup bağ dokusu içerisinde tek tek veya gruplar şeklinde görülürler. Testisleri meydana getiren lobüller arasındaki bağ dokusu bölmelerinde bulunurlar (Leeson ve ark., 1988). Leydig hücreleri testosteron hormonu üretimi ve salgılanmasından ve ikincil cinsiyet karakterlerinin gelişmesinden sorumludur. Bu hücreler salgıladıkları testosteron hormonu ile spermatogenezi devam ettirir ki testosteronun yaklaşık olarak % 95'ini üretirler (Bakalska ve ark., 1999; Kim ve ark., 2000; Fujisava M., 2011).

Leydig hücreleri steroid sentezleyen hücre özelliği gösterirler ve bu hücrelerin sitoplazmalarının en karakteristik özelliği çok sayıda lipid damlasının bulunmasıdır. Bu hücrelerinin sitoplazmalarında çok sayıda agranüler endoplazmik retikulum bulunur. Sitoplazmada ayrıca çok miktarda mitokondri, lipofuksin pigmenti, çubuk şeklinde bir inklüzyon olan Reinke Kristalleri görülür. Yaşla birlikte Reinke kristalleri ve lipokrom pigmentinin miktarları çoğalır. Bu kristaller genel histolojik boyalarla boyanmazlar ve ışık mikroskopunda görülmezler. Elektron mikroskobu ile yapıları ayrıntılı olarak görülebilir (Leeson ve ark., 1988; Eşrefoğlu M., 2009). Leydig hücrelerinin ergenlik sırasında belirgin hale gelen, yuvarlak, poligonal şekilli merkezi bir nükleusu, küçük lipid damlacıklarından oluşan zengin eozinofilik bir sitoplazması bulunmaktadır. İki çekirdekli hücrelere sıklıkla rastlanabilir. Golgi kompleksi çekirdeğe yakındır. Salgısını, testosteron ihtiyacına göre sentezler ve biriktirmeden salgılar. Daha sonra bekletilmeden kana verildiğinden salgı granülleri yoktur. Çok sayıda tübüler kristal mitokondriyonlara sahiptir ve asidofil sitoplazmalarında yağ damlacıkları içerirler. Karakteristik özelliklerinden birisi geniş granülsüz endoplazma retikulumudur ve granülsüz endoplazmik retikulum sitoplazmalarında androjenik steroidlerin biyosentezi için gerekli enzimler bulunur. Sitoplazmalarında, ayrıca peroksizom, lizozomlar ve yaşla artan miktarlarda lipokrom pigment birikintileri de mevcuttur. Tüm bu özellikleri ile Leydig hücreleri steroid salgısı yapan hücrelere benzerler (Jangueria ve ark., 1998; Gartner ve ark., 2003; Moore ve ark., 2002).

Spermatogenezin devamı ikincil seks karakterlerinin gelişmesinden sorumlu erkeklik hormonu olan testosteronu üreten Leydig hücrelerine bağlıdır. Testosteron, mitokondri ve granülsüz endoplazma retikulumunda bulunan enzimlerce sentezlenir. İnterstisyel hücrelerin hem aktiviteleri, hem de miktarları hormonal uyarımlara bağlıdır. Plasental gonadotropik hormon embriyonik gelişim sırasında anne kanından fetusa geçerek, androjenik hormonları üreten fetal testiküler interstisyel hücreleri uyarır. Hormonlar, embriyonik farklılaşmada erkek genital organlarının gelişmesi için gereklidir. Embriyonik interstisyel hücreler insan hamileliğinin 4,5 ayına kadar farklılaşmış olarak kalırlar. Daha sonra ise testosteron sentezindeki azalmaya bağlı olarak gerilerler. Hücreler, gebelik boyunca ve hipofizden salınan luteinizan hormon (LH) uyarımı altında testosteron sentezini yeniden yapmaya başladıkları ergenlik öncesi döneme kadar dinlenmede kalırlar (Guyton AC., 1996; Jangueria ve ark., 1998; Kierszenbaum AL., 2006).

Olgun Leydig hücreleri doğumdan sonraki birkaç hafta dışında, 10 yaşına kadar erkek çocuk testisinde bulunmaz. Leydig hücrelerinin sayıları, ergenlikle birlikte artarak ileri yaşlarda azalır. Leydig hücre sayısı, 60 yaşındaki bir erkekte 20 yaşındaki bir erkekteki sayının yarısından da az sayıdadır (Guyton AC., 1996; Fawcett D.W., 2002).

2.5.2.2. Miyoid Hücreler

Seminifer tübül epitelini çevreleyen lamina propria bağ dokusundan oluşan miyoid hücreler ya da peritübüler kontraktıl hücreler ve kollajen lifler seminifer epitelin dış bazal laminasında yer alır. Kemirgenlerde spermatogenez ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda lamina propriyanın tek katlı miyoid hücrelerden oluştuğu bildirilmiştir (Kierszenbaum AL., 2002; Ross ve ark., 2003).

Elektron mikroskopi incelemelerinde miyoid hücrelerin sitoplazmasında aktin filamentlerini içerdiği ve bazal zarının olmasından dolayı düz kas hücrelerine benzediği gösterilmiştir. Fibroblastlarda bulunan granüllü endoplazma retikulumları sayesinde kollajen sentezinde görev almaktadırlar. Miyoid hücreler, hareketsiz spermleri rete testise iletten ritmik kasılma hareketlerinden sorumludur. Spermler bu sayede duktus

epididimise ulaşır ve daha sonra hareket etme özelliklerini kazanırlar (Kierszenbaum AL., 2002; Ross ve ark., 2003).

2.5.3. Spermatogenez

Spermatogenez puberteden sonra olgun erkek germ hücrelerinin oluşmasına denir. Spermatogenez spermatogonyumdan sperm oluşumu sırasındaki çoğalma ve hücrel değişiklikleri kapsamaktadır. Spermatogenez süreci başlıca üç döneme sahiptir.

İlk aşama olan spermatositogenez spermatogonyumların mitozlarla çoğalması ve primer spermatosite farklılaşması dönemine denir. Tip A spermatogonyumlar, 4 kez mitoz bölünme geçirerek 16 adet daha ileri Tip B spermatogonyumları meydana getirir. Bu evrede spermatogonyuya Sertoli hücrelerine doğru ilerleyerek, Sertoli hücreleriyle taban ve yan yüzlerinden sıkı bir bariyer oluşturur. Sertoli bariyerinden geçen her spermatogonyum büyüyerek, daha büyük yuvarlak hücreler olan primer spermatositler halini alır. Tip B spermatogonyumdan oluşan primer spermatositler, birinci mayozun profazına girerler (Atabenli E., 2002; Hassa H., 2003; Ross ve ark., 2003; Kierszenbaum AL., 2006).

Spermatositlerin ardı ardına iki bölünme geçirerek kromozom sayılarını ve DNA miktarını yarıya düşürerek spermatidleri oluşturduğu evre mayoz adını alır. Primer spermatositin birinci mayoz bölünmeyi geçirmesiyle iki sekonder spermatosit oluşur. Bu bölünme ile diploid sayıda kromozom içeren primer spermatositlerden haploid sayıda kromozom içeren sekonder spermatositler oluşur. Sekonder spermatositlerin ikinci mayoz bölünmesi sonucunda ise spermatidler oluşur. Bu hücreler haploid kromozom ve DNA içerisine sahiptirler. Bu da döllenme olursa yeni oluşacak olan zigotta türe özgü kromozom sayısının korunmasını sağlar (Eşrefoğlu M., 2009).

Spermatidin şekil değiştirerek spermiyumu oluşturmasına ise Spermiyogenez denir. Spermiyogenezde seminifer tübüllerde yer alan Sertoli hücreleri önemli rol oynar. Değişim süresince spermatidler Sertoli hücre membranına bağlı kalırlar. Spermiyogenez dört faza ayrılabilir;

- **Golgi Fazı:** Bu evrede küçük, yuvarlak şekilli spermatidlerin sitoplazmalarında bulunan granüllü endoplazma retikulumunda üretilen hidrolitik enzimler, Golgi kompleksinin trans yüzünden zarla çevrili küçük proakrozomal granüller olarak sitoplazmaya verilirler ve PAS pozitif boyanırlar. Bu granüller birleşerek akrozom vezikülünü yaparlar ve içlerindeki yoğun olarak boyanan enzimler ise akrozom granülünü oluşturur. Bu vezikül çekirdek zarına yapışır. Bu bölge ilerde oluşacak olan spermatozoonun çekirdeğinin tepesini işaret eder. Bu sırada sentriyoller hücrenin ters kutbuna doğru hareket eder. Arka arkaya durarak proksimal ve distal sentriyolleri yaparlar (Atabenli E., 2002).

- **Başlık (Cap) Dönemi:** Başlık döneminde akrozomal vezikül nükleusun ön bölümünü kaplayacak şekilde genişleyip şapka gibi bu bölümü kuşatır. Nüklear kılıfın buraya bakan bölümünün porları kaybolur, kılıf kalınlaşır, nükleus yoğunlaşır (Eşrefoğlu M., 2009).

- **Akrozom Dönemi:** Bu dönemde sperm başı Sertoli hücrelerinin sitoplazmasının derinlerine gömülür ve kuyruk flagellumu uzatarak lümende belirgin olarak görülmeye başlar. Yoğunlaşan nükleus yassılaşıp uzar. Akrozom apikal plazma membranına iyice yaklaşır. Sitoplazmik mirotübüller akrozomun arka yüzünden spermatidin arka kutbuna uzanan silindirik bir kılıf şeklinde organize olurlar. Akrozomal vezikül çekirdeğe doğru ilerleyerek çekirdek dış zarına yapışır ve akrozomal vezikülün içerdiği sıvı resorbe olunca, büzülür ve çekirdeği kep gibi saran iki yapraklı bir kese durumuna geçer. Birçok hidrolitik enzim bulundurması nedeniyle akrozom, özel tip lizozom olarak yorumlanabilir. Bu enzimlerin hücreleri korona radiatadan ayırdığı ve zona pellusidayı sindirdiği bilinmektedir (Jangueria ve ark., 1998; Yakan B., 2005; Eşrefoğlu M., 2009).

Olgunlaşma Dönemi: Sitoplazmanın azaldığı ve fazla sitoplazmanın Sertoli hücreleri tarafından fagositoz edildiği dönemdir. Spermatidler birbirleri ile bağlantılarını kaybederler, Sertoli hücrelerinden ayrılarak lümene düşerler (Eşrefoğlu M., 2009)

Seminifer epitelde belirli spermatogenik hücreler sadece diğer belirli spermatogenik hücrelerle bağlantılıdır. Belirgin bir seminifer tübül alanında, aynı hücresel gruplaşmanın, iki defa ortaya çıkması arasındaki ardışık basamaklar serisi, seminifer tübül döngüsüdür. Bu döngü farklı hücre gruplarının bir serisi bir döngü tamamlanmaya kadar devam eder. İnsanda her biri 16 gün süren 6 evre vardır. Bir

spermatogonyumun olgun bir sperm haline gelebilmesi için 4 döngü sonunda 64 gün geçirmesi gereklidir. Canlı sıçanda ise bir seminifer tübül şeridi boyunca bir döngü 14 basamaktan oluşur ve 12–14 gün sürer. 3H timidin ile yapılan çalışmalar sonucunda spermatogonyumdan spermin meydana gelme süresi toplam 54 gün olarak hesaplanmıştır (Hassa H., 2003; Ross ve ark., 2003; Larsen W.J., 2003; Kierszenbaum AL., 2006).

Belli başlı spermatogenik hücreler sadece belli başlı diğer hücreler ile ilişki halindedir. Örneğin; farelerde her bir spermatogonyum bir diğeri ile aynı anda gelişir, dolayısıyla herhangi bir zaman aralığında seminifer tübül kesiti incelenirse, spermatogonyumdan spermiyuma kadar tüm bir hücre serisi bir arada görülebilir. Bu hücre ilişkisine spermatogenik siklus denir. Gelişmeye başlayan her bir spermatogonyumdan potansiyel olarak 64 spermiyum üretilebilir. İnsanda her bir saniyede 20 adet spermatogonyum spermatogenik sürece dahil olur. Spermatogenik siklus, spermatogonyumdan spermiyumun atılmasına dek dört ya da beş kez tekrarlanır (Barrat, C.,1995). Türlerde her bir spermatogenik siklusun süresi sabittir ve 8 ile 16 gün arasında değişir. Örneğin;bu süre farelerde 9 gün, insanlarda ise 16 gündür.

İnsanlarda tüm evre ortalama 64 gündür. Yukarıda tanımlanan türdeki seminifer epitel modeli birçok hayvan türünde mevcut iken, insanda bu model bu denli açık değildir. İnsan seminifer tübül kesitlerinde, birden fazla değişik spermatogenik siklus seviyesinde olan hücre varlığı ya da bazı germ hücrelerinin birbirleriyle olan ilişkisinin varlığı ya da yokluğu gibi birçok düzensizlikler göze çarpar. Bu düzensizlik insanda gerçekleşen spermatogenezin daha düzensiz ya da en azından daha az koordine olduğunu düşündürür. 1984 yılında, Schulze ve arkadaşları, insan seminifer epitelinin düzeni hakkında bazı kanıtlar ortaya koymuşlar ve spermatogenezin basamaklarının, seminifer tübülün uzun eksenine heliks şeklinde bir uyum gösterdiğini söylemişlerdir. Yani seminifer epitelin organizasyonu, biyolojide büyüme ve farklılaşmanın temel prensibi olan “spiral geometrisi” plânına uyum gösterir. Sonuç olarak insanlardaki seminifer epitelin yapısı, düzensiz ya da kaotik değildir, aksine kompleks bir organizasyon gösterir.

2.6. Sperm Analizi

Semen analizi hem tedavi amaçlı hemde bilimsel araştırmalarda infertiliteyi belirleme kriterlerinden birisidir. Bunun için en az 48 saatlik (insan için) cinsel perhizden sonra alınan taze semen makroskopik ve mikroskopik değerlendirmeye tabi tutulur. Analiz sonucunda spermin sayısı, hareketliliği ve morfolojisi değerlendirilir. Semen analizi, infertil erkek bireyin değerlendirilmesinde ve fertilitte potansiyelini belirlemede önemli bir yere sahip olmakla birlikte klinikte tedavinin planlanmasında ve alınan cevabın değerlendirilmesinde de kullanılmaktadır. Bilimsel araştırmalarda spermin hareketliliği, sayısı veya şekli ile ilgili detaylı çalışmalar da kullanılmaktadır (Carrell, 2000; Irvine, 2000). Geleneksel semen analizinde, ejakulat alındıktan sonra en fazla 60 dakikaya kadar likefikasyonu için beklenir ve daha sonra incelemeye geçilir. WHO (World Health Organization, 2010) 'un manüel olarak değerlendirdiği semen analizi için referans aralıkları aşağıdaki gibidir.

Hacim: $\geq 2,0$ ml

Likefikasyon süresi: 60 dk içinde

Ph: $\geq 7,2$

Sperm konsantrasyonu: ml'de ≥ 20 milyon

Total sperm sayısı: ejakülatta ≥ 40 milyon

Hareketlilik: 30 ve 60 dk sonra hareketlilik oranı sırasıyla, $\geq \%50$, $\geq \%25$

Canlılık: $\%75$ veya daha fazla canlı

Lökosit: ml'de 1 milyondan daha az

Normal morfoloji: en az $\geq \%30$

2.6.1. Spermilerin Morfolojik Açıdan Sınıflandırması

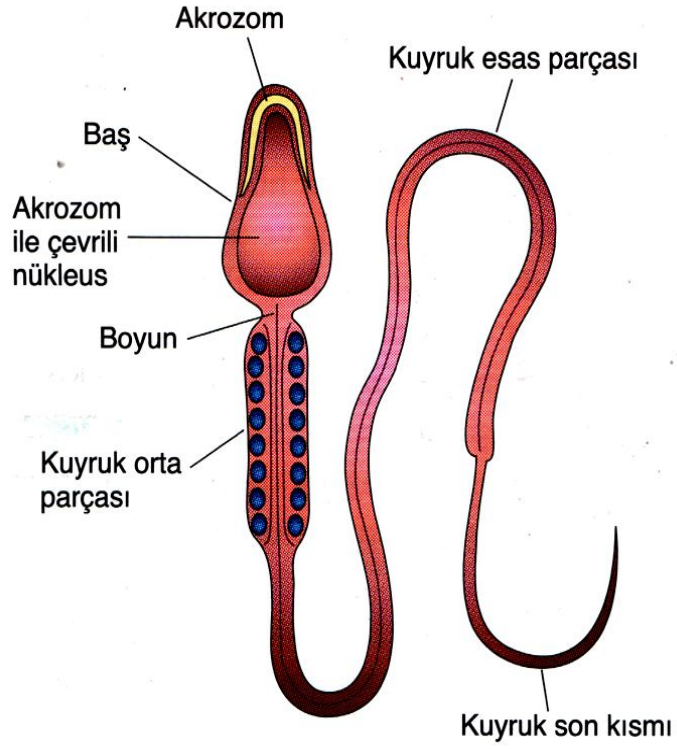
İnsan spermeleri diğer memelilere kıyasla yapı ve büyüklük açısından büyük değişiklik gösterirler. Normal fertil ejakülatta dahi spermatozoonlar arası şekil, büyüklük, baş ve akrozom şekli yönünden farklılıklar bulunur. Fertil erkeklerin ejakulatında da nüklear vakualizasyon, sitoplazmik damlacıkların varlığı, kuyruk anomaliliği görülebilir (Ombelet ve ark., 1995). Bir spermatozoonun anormal veya normal olduğunu belirleyen kriterleri standardize etmek için pek çok girişim yapılmıştır (Guzick ve ark., 2005). İlk Dünya Sağlık Örgütü (WHO: World Health Organisation, 1980) sınıflaması, sperm morfolojisinin değerlendirilmesi yönünde büyük bir adım olmuştur. Arkasından

Hofmann ve Haider, Dusseldorf sınıflaması adı altında yeni bir morfoloji sınıflaması ortaya koymuştur (1985). Bu sınıflamada spermatozoonun uzaması ve akrozom hasarları üzerine daha fazla önem verilmiştir. 1987'deki ikinci WHO kılavuzu ile semen analiz kriterleri yeniden düzenlenmiştir. 1992'deki üçüncü WHO sınıflamasında ise sperm morfolojisinin değerlendirilmesi daha ayrıntılı olarak ele alınmıştır. Morfolojik olarak normal grubun yanı sıra 4 sınıf halinde anomaliler sınıflandırılmış ve teratozoospermi indeksi hazırlanmıştır.

Bu sınıflandırmada spesifik infertilite nedenlerinin ayrıca belirtilmesi gerekmektedir. Bu son sınıflamada normal morfolojiye sahip olma sınırı %50'den %30'a çekilmiştir. Kruger ve Menkveld, sperm morfolojisine yönelik kesin Tygerberg kriterlerini tanımlamıştır (Aydos, 2005). Bu sınıflandırmada, spermatozoon bir bütün olarak incelenir ve düzensiz sınır hatları ve hafifçe anormal sperm başlarının hepsi anormal olarak değerlendirilir. Tygerberg kriterlerine göre, morfolojik değerlendirmenin sonuçları üç kategoride ele alınabilir: 1. Normal morfolojiye sahip grup (%14'den fazla normal form mevcut), 2. İyi prognozlu grup (%4-14 arası normal form mevcut), 3. Kötü prognozlu grup (%4'den az normal form mevcut) (Aydos, 2005).

2.6.2. Sperm Morfolojik Bozukluklarının Önemi

Kruger sınıflamasına göre spermlerin baş, orta bölüm ve kuyruk yapısındaki bozuklukları esas alan bir değerlendirme yapılmaktadır (Şekil 2.5). Özellikle baş yapısındaki makrosefal, çift baş, globozoospermia gibi bazı formların baskın oluşu bu erkeklerin spermlerinin mikro enjeksiyon uygulamalarında başarısızlık olasılığının yüksek olabileceğinin bir göstergesidir. Çünkü bu anormal baş yapısında spermlerin içerisindeki DNA yapısında da anormallikler tespit edilmiştir. Kısa kuyruk gibi sperm kuyruk yapısındaki bir takım bozukluklar da spermin hareket kabiliyetini bozarak infertiliteye neden olur. Bu bilgiyle uyumlu olarak morfolojide kısa kuyruk anomalisi (tail stump) yoğun olarak görülen erkeklerde, mikroenjeksiyon sonrası başarı şansı düşük olmaktadır (Aydos, 2005). Sperm morfolojik bozuklukları; büyük başlı, küçük başlı, çift başlı, çift kuyruklu, amorf ve uzamış başlı, birlikte görülen baş ve gövde anomalisi ve akrozom hasarları olarak sınıflandırılabilir (Şekil 2.6).



Şekil 2.5: Normal bir spermatozoonun şematik gösterimi(Moore, 2008)



Şekil 2.6: Spermatozoon morfoloji bozuklukları (<http://www.emrebakircioglu.com>)

2.7. TGF- β Süperailisi

TGF- β süperailisi gelişimi çok yönlü kontrol eden ekstrasellüler büyüme faktörlerinin büyük bir grubudur. Organizmanın tüm dokularının gelişiminde, homeostazisinde ve onarımında çok önemli rol oynayan TGF- β ailesi, yapısal olarak ilişkili çok sayıda polipeptid büyüme faktörleri içerir, bunların her biri hücre proliferasyonu, farklılaşması, motilitesi, adezyonu ve ölümü gibi hücresel süreçleri düzenleme yeteneğine sahiptir. TGF- β ailesi, hedef hücrenin uyarıya verdiği yanıtın çeşidine bağlı etkileri olan çok fonksiyonlu agonistlerdir (Massague, J., 1998; Shi ve ark., 2003).

TGF- β ve ilgili faktörler, 2 tip reseptör olan serin/treonin protein kinazları bir araya getirerek gen ekspresyonunu düzenlerler. Bu kinazlardan biri diğerini fosforlar, bu fosforlanan kinaz Sma ve Mad-related Protein (SMAD) proteinlerine dönüşür. SMAD'lar, hücre çekirdeği içine sinyal taşıyan ve özel olarak DNA'ya bağlanma kabiliyeti ile transkripsiyonel kompleks oluşturan orijinal bir protein ailesidir (Massague, J., 1998; Liu, F., 2006).

TGF- β ailesi üyeleri serin/treonin kinaz aktivitesine sahip reseptörlere bağlanarak hücrenel hareketlerini başlatırlar. TGF- β ailesi üyeleri, transmembran protein ailesinden olan serin/treonin kinaz aktivitesine sahip TGF- β reseptör ailesine sinyal iletirler. TGF- β reseptör ailesi, yapısal ve fonksiyonel özellikleri göz önünde tutularak tip I ve tip II reseptörler olmak üzere 2 alt gruba ayrılmıştır (Mathews ve ark., 1991).

TGF- β ve ilgili faktörler, tip I ve tip II reseptör çiftlerine bağlanır ve bunları birleştirerek sinyalin aktivasyonunu sağlarlar. İki farklı ligand bağlanma çeşidi gözlenmiştir. TGF- β ve aktivin reseptörleri için karakteristik olan 1. bağlanma çeşidi ligandın tip II reseptöre direkt bağlanması suretiyle gerçekleşir, daha sonra tip I reseptör ile bu kompleks (ligand-tip II reseptör) arasında etkileşim olur. Tip I reseptörler ligandı tanır ve tip II reseptöre bağlanır. İkinci bağlanma çeşidi ise "Bone Morphogenetic Protein (BMP)" reseptörleri ve bu gruba dahil olanlar için tipiktir, tip I ve tip II BMP reseptörleri liganda beraber bağlanırlar. Öncelikle aktif, ligand-tip I/tip II reseptör kompleksi oluşur, tip II reseptör fosforilasyon ile tip I reseptörü aktive eder, daha sonra

tip I reseptör sitoplazmadan hücre çekirdeğine sinyal ileten SMAD proteinlerini fosforlar (Bassing ve ark., 1994; Nishitoh ve ark., 1996; Heldin ve ark., 1997; Massaque, J., 1998; Shi ve ark., 2003).

Tip II reseptörün aracılık yaparak tip I reseptörü aktive etmesi TGF- β sinyallerinin başlamasına neden olur. Bu aktive olan tip I reseptör, hücre çekirdeğine sinyal taşıyan SMAD proteinlerini fosforlar ve aktive eder. SMAD ailesine ait proteinler, tip I reseptör kinazların tanımlanmış ilk substratlarıdır ve reseptör sinyallerinin hücre çekirdeği içindeki hedef genlere iletiminde merkezi bir rol oynar (Heldin ve ark., 1997).

2.7.1. SMAD Alt Grupları ve Fonksiyonları

Yapısal ve fonksiyonel etkenler göz önünde tutulduğunda, SMAD'lar 3 ayrı alt gruba ayrılırlar:

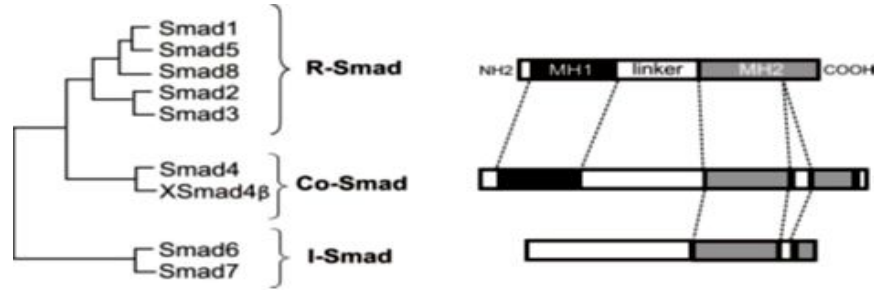
- Reseptör ile regüle edilen SMAD'lar (R-Smad'lar); TGF- β ailesi reseptör kinazlarının direkt substratlarıdır.
- Common-partner SMAD'lar (Co- Smad'lar); R-Smad'larla birleşerek sinyal iletimine katılan SMAD'lar
- İnhibitör SMAD'lar (ISmad'lar); diğer 2 grubun sinyal foksiyonunu inhibe eden antagonist SMAD'lardır (Itoh ve ark., 2000).

R-Smad'larda kendi içlerinde 2 gruba ayrılırlar, bunlar; BMP Smad'lar ve TGF β /aktivin Smad'lar. BMP Smad'lar, Smad1 ve birbirine yakın homologlardan Smad5 ve Smad8, "Bone Morphogenetic Protein Receptor-I (BMPR-I)'in substratları ve BMP sinyallerin aracılarıdır. TGF- β /aktivin Smad'lar ise Smad2 ve 3, T β R-I'in substratları ayrıca TGF- β ve aktivin sinyallerinin aracılarıdır. Memeli epitel hücrelerinde Smad2 ve 3, gelişimin inhibisyonuna ve haberci genlerden TGF- β ve aktivinin transkripsiyonunun aktivasyonuna aracılık ederler (Lagna ve ark., 1996; Suzuki ve ark., 1997).

R-Smad'lar sinyal iletimi görevlerini yerine getirmek için diğer bir SMAD'a ihtiyaç duyarlar. Omurgalılarda, bu grubun üyelerinden bilineni Co- Smad'lar grubuna dahil Smad4'tür. Reseptör regüle eden SMAD'lar, benzer reseptörler tarafından fosforile olduğu zaman Smad4'lerle birleşirler. Smad4, yapısı itibari ile R-Smad'larla benzer

olmasına rağmen, agonistlerinden gelen yanıt ile normal olarak fosforile olamaz. Memeli hücrelerinde Smad2 veya 3'e bağlı gelişimi inhibe eden bir yanıt için Smad4 gereklidir. Ayrıca Smad4, TGF- β , aktivin ve BMP sinyal iletim yollarının da bir üyesidir (Lagna ve ark., 1996; Massague, J., 1998).

İnsan Smad'larından 6 ve 7, SMAD'lardan yapısal olarak ayrı olan diğer bir alt gruptur ve inhibitör SMAD'lar olarak adlandırılırlar. Bilinen tek aktivitesi, R-Smad'ların sinyal fonksiyonunu inhibe ettiğidir. Smad6 BMP sinyallerini inhibe ederken, Smad7, TGF- β ve BMP sinyallerinin her ikisini de inhibe edebilir (Massague, J., 1998; Itoh ve ark., 2000).

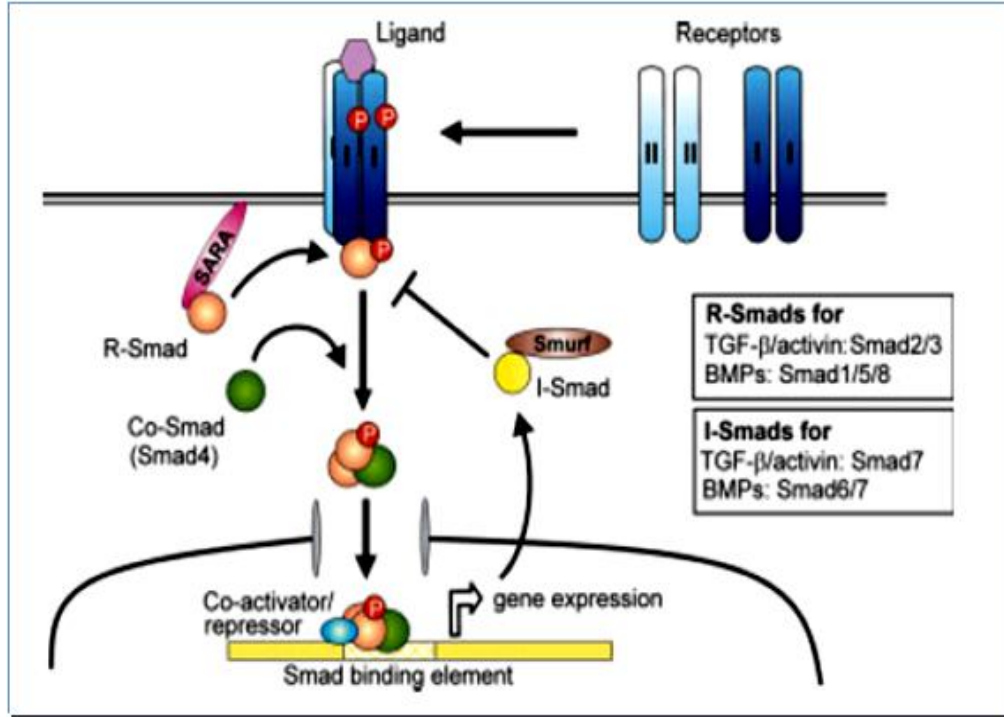


Şekil 2.7: Omurgalı SMAD'larının filogenetik ağacı ve yapılarının seması. Toplam 3 ayrı grup vardır: R Smad'lar, Co-Smad'lar ve ISmad'lar. XSmad4 β hariç belirtilen bütün SMAD'lar insanlarda bulunur (Itoh et al., 2000'den modifiye edilmiştir).

2. 7. 2. SMAD Proteinleri Aracılığı ile Sinyal İletimi

Bazal kısımda SMAD'lar homo-oligomerler olarak bulunurlar. Reseptör kompleksin ligand aktivasyonundan sonra tip I reseptör kinazlar spesifik SMAD'ları fosforile ederler, fosforile olan SMAD'lar daha sonra Smad4 ile birleşerek hücre çekirdeğine taşınırlar. Bu kompleksler çekirdek içinde yalnız veya DNA-bağlanma altbirimi ile birleşik halde bulunabilir ve spesifik promotor elemanlarına bağlanarak hedef genleri aktive eder (Massague, J., 1998; Shi ve ark., 2003; Itoh ve ark., 2000).

SMAD'lar agonistlerinin uyarısıyla serin fosforlarlar. Örneğin Smad1, BMP2 veya 4'ün; Smad2, TGF- β veya aktivinin; ve Smad3, TGF- β 'nın uyarısı ile serin fosforlarlar (Massague, J., 1998; Itoh ve ark., 2000).



Şekil 2.8: SMAD Proteinleri Aracılığı ile Sinyal İletimi (Leivonen and Kähäri, 2007)

2.8. Protein Yıkımı

Protein yıkımı, hücre içerisindeki proteinlerin steady-state diye adlandırılan normal düzeylerinde fonksiyon görmelerini sağlamak amacıyla işleyen düzenli bir mekânizmadır. Ökaryotlarda protein yıkımı, hem sitoplâzma hem de çekirdek Übikülin Protazom Sistemi (UPS) ve onun düzenleyici proteinleri sayesinde gerçekleşmektedir. Bu düzenleyici proteinler arasında hem COP9 signalozom (CSN) hem de p97/Valosin containing protein (VCP) belirli substratların yıkımını kontrol etmektedirler (Ye ve ark., 2001; Wei ve Deng, 2003).

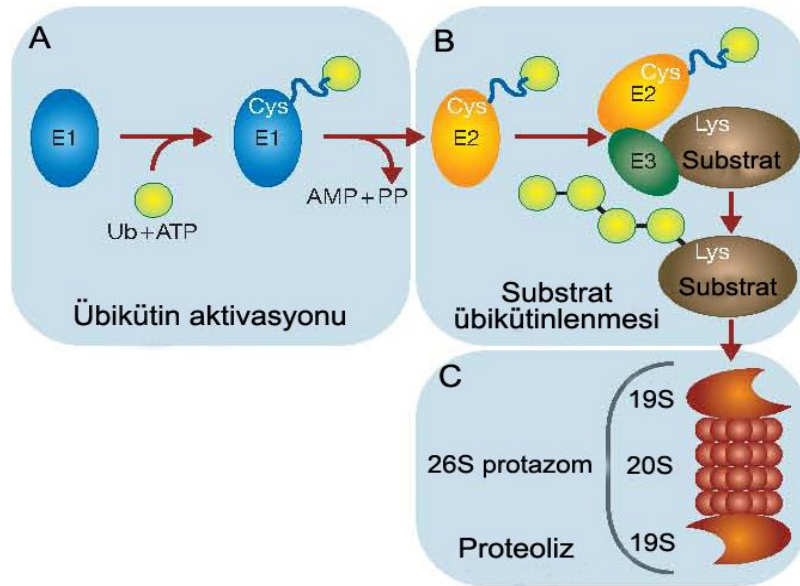
Jab1/CSN5; p27Kip, Lutenize edici hormon reseptörü (LHR), p53, östrojen reseptörü, Smad4, Smad7, Id1, Id3 ve IκBα gibi birçok proteinin proteazoma bağlı yıkımına yardımcı olmaktadır (Li ve ark., 2000; Wan ve ark., 2002; Berse ve ark., 2004; Kim ve ark., 2004; Yun ve ark., 2004; Callige ve ark., 2005).

2.8.1. Übikülin Protazom Sistemi (UPS)

UPS, ökaryotlarda hücre içi düzenleyici proteinlerin seviyelerini kontrol etmede önemli bir fonksiyona sahiptir. UPS'in übikülinleme ve übikülinlenmiş proteinlerin yıkımı

olmak üzere iki temel fazı vardır. İlk übikütleme fazında, übikütleme (Ub) ATP yardımıyla übikütleme aktive edici enzimin (E1) sistein kuyruğuna eklenir ve sonra übikütleme bağlayıcı edici enzimin (E2) sistein kuyruğuna transfer edilir. Son olarak ise, übikütleme, protein ligaz (E3) sayesinde substratın lizin kuyruğuna transfer edilir. Ub, substrata izopeptid bağı ile bağlanır. Ub aktivasyonu ve ligasyonu, Ub'nin son aminoasidinin (G76) karboksil grubunda gerçekleşir (Şekil 2.9) (Pickart., 2001a; Pickart., 2001b).

Tek bir übikütleme molekülünün substrata eklenmesi (monoübikütleme) ise, lizozomal sınıflandırma, gen ekspresyonu ve endositoz gibi substratın farklı görevlerde iş yapmasına neden olmaktadır (Schnell ve Hicke, 2003)



Şekil 2.9: Übikütleme Sinyali **A:** Übikütleme, übikütleme aktive edici enzim (E1) ile aktive edilir ve sonra übikütleme bağlayıcı enzime (E2) transfer edilir. Substrat (kahverengi kutu) ve E2 enzimi özgün olarak übikütleme protein ligaza bağlanabilirler ve de aktive olmuş übikütleme substrata transfer olur. **B:** E3, substrata ve E2'ye farklı alanlarda bağlanır. Substrat übikütleme sinyali ile tanınır. **C:** Proteolizin gerçekleştiği 26S proteazom, 19S kapak kısmı ve esas proteolitik aktiviteye sahip 20S kısmından oluşur. Proteoliz öncesi 19S kapakla bağlantılı deübikütleme enzimleri ile substratın übikütleme zincirlerinin uzaklaşması sağlanır (Meusser ve ark., 2005).

UPS siklusunun ikinci fazında, proteazom poliübikütleme zincirleri sayesinde, substratı tanır. Substrat, küçük peptidlerine yıkılır ve Ub'nin özgün deübikütleme enzimi

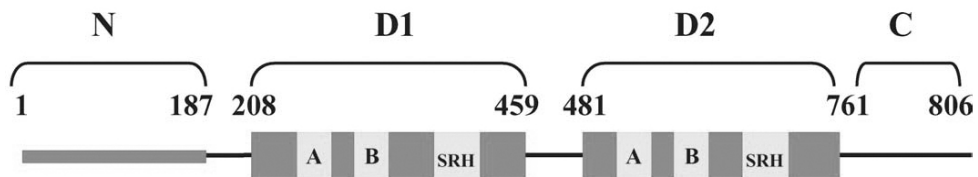
sayesinde geri eldesi sağlanır. Ub'nin subsrata konjugasyonu gibi, proteazomal yıkımı da ATP bağımlıdır. 26S proteazomun, hem übikütinlenmiş proteinlerin übikütinden ayrılması hem de onların yıkımlarının katalizlenmesinde önemli bir görevi vardır. Protazom, birbirine bağlı 2 farklı bölümden oluşmuştur (Şekil 2.9 C). 20S silindirik temel bölüm, proteolitik aktiviteye sahip iken, silindirik bölümün alt ve üst kısımlarına yerleşmiş 19S'lik proteazom kapakları poliübikütinlenmiş subsratın tanınması ve proteoliz görevini üstlenmişlerdir. 19S kompleksi, 6 tanesi ATP az aktivitesine sahip 15-20 subuniteden oluşmuştur (Schwechheimer ve Deng, 2001; Pickart ve Cohen, 2004).

2.8.1.1. VCP Bağımlı Protein Yıkımı

97-kDa'luk Valosin-içeren protein (p97 ve ya VCP), übikütin-protazom sistemine bağlı proteolizde önemli fonksiyonlara sahiptir. Bu proteoliz, VCP'nin, übikütin ve kofaktörleri ile ilişkisine bağlıdır. VCP, UPS'de şaperon protein olarak görev yapmaktadır. Toplam hücresel proteinin 1% den fazlasının VCP olduğu bilinmektedir.

VCP, tip II AAA (ATPases Associated with a variety of Activities: Birçok aktivitesi bulunan ATPazlar) ATPaz ailesine ait bir proteindir ve AAA domaini olarak adlandırılan iki ATPaz domainine sahiptir (Neuwald ve ark., 1999; Zwickl ve Baumeister, 1999; Vale, 2000; Maurizi ve Li, 2001; Ogura ve Wilkinson, 2001). VCP çeşitli türlerde farklı isimlerle anılmaktadır. Örneğin: arkebakteride VAT, mayada CDC48, Drosophilada TER94, memeli ve bitkilerde ise p97 ve ya VCP olarak bilinmektedir (Frohlich ve arkd., 1991; Pamnani ve arkd., 1997).

VCP, N-terminal domain (N), iki tane ATPaz domaini (D1 ve D2) ve de C-terminal domaini (C) olmak üzere dört domainden oluşmuştur. N terminal domaini, poliübikütin zincirlerine bağlanma ve subsrat tanınmasından sorumlu iken, D1 ve D2 domainleri, VCP'nin şaperon aktivitesinden sorumludur (Şekil 2.10) (Wang ve ark., 2003).



Şekil 2.10: VCP'nin yapısal domainleri.A: Walker A, B: Walker B ve SRH: VCP'nin D1 ve D2 domainlerindeki ikinci bölge homoloji motifleri. (Wang ve ark., 2004).

Elektron mikroskopu çalışmaları, VCP'nin silindirik şekilli homo hegzemerik yapıda olduğunu kanıtlamıştır (Wang ve ark., 2003).

VCP, hücre içerisinde birçok aktivitede görev yapmaktadır. Bu görevler içerisinde hücre siklusu gelişimi (Cao ve Zheng, 2004), mitoz sonrası membran kaynaşması ve iğ ipliklerinin ayrılması (Kondo ve ark., 1997; Cao ve ark., 2003; Wojcik ve ark., 2004), yanlış katlanmış proteinlerin ER'dan geri atılımı (Ye ve ark., 2001; Braun ve ark., 2002; Jarosch ve ark., 2002), proteazomda poliübikütinlenmiş proteinlerin degrade edilmesi (Ghislain ve ark., 1996; Dai ve Li, 2001) ve transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu (Hitchcock ve ark., 2001; Rape ve ark., 2001) yer almaktadır.

VCP, kofaktörlerinin de yardımıyla, übikütinlenmiş proteinlere özgün olarak bağlanır ve bu proteinlere 26S proteazomda degrade olmadan önce, şaperonluk yaparak onlara yol gösterir. Substrat übikütinlenmesinden sonra, VCP protein komplekslerini birbirinden ayırmak için ATP'yi kullanır ve proteinlerin proteazoma yönelmesini sağlar. Örneğin: Herhangi bir şekilde stimüle edilmeyen hücrelerde, NF- κ B sitoplazmada inaktif formda inhibitör I κ B proteini ile etkileşim halindedir (Karin ve Ben-Neriah, 2000); Santoro ve ark., 2003). Stimulasyona cevap olarak, NF- κ B aktive olur ve I κ B α hızlıca fosforile olup, poliübikütinlenir (Karin ve Ben-Neriah, 2000). Bunu takiben, VCP, poliübikütinlenmiş I κ B α 'ya bağlanır ve onu NF- κ B kompleksinden ayırır (Dai ve ark., 1998). I κ B α 'nın NF- κ B'dan ayrılmasından sonra, NF- κ B hedef genin regülasyonu nedeniyle nükleusa transfer edilir. Bu arada, VCP, poliübikütinlenmiş I κ B α 'ya şaperonluk yaparak, onun 26S proteazomda yıkımı için yol gösterir (Dai ve ark., 1998).

2.8.1.1.1. p97/VCP'in Otofagozom Oluşumundaki Rolü

Otofaji, uzun süreli hücrede depo edilen proteinleri, makromolekülleri veya hasarlı organelleri elimine etmek için ökaryotlarda görülen evrimsel olarak korunmuş bir süreçtir. Otofaji, genelde hücrenin yaşamını sürdürmesi amacıyla açlık, çeşitli stres ve hücrede emekliye ayrılmış dokuları ortadan kaldırmak amacıyla kullanılır. Otofajinin 3 tipi vardır. 1-Şaperon aracılı otofaji 2-Makrootofaji 3-Mikrootofaji. Şaperon aracılı otofaji, yüksek ökaryotik canlılarda görülür ve lizozomda sitosolik proteinlerin yıkımına

sebepler olur. Makrotofaji çift membranlı, sitoplazmik materyali yutup bu materyalin yıkımı için lizozom veya vakuol ile birleşebilen otofagozomun oluşumu ile karakterizedir. Mikrotofaji ise vakuol ya da lizozom oluşumu ile sitosolik kompartmanların direk yıkımı ile ilişkilidir. Bugüne kadar, mayada 35 tane Autophagy related genes (ATG) (ATG1 den ATG35 e kadar tanımlanmıştır. Bunlardan Atg8 (memelideki karşılığı LC3), otofagozom oluşumu için gereklidir.

p97/VCP'nin otofagozom maturasyonundaki rolü ilk memeli hücrelerinde, p97/VCP'nin N terminal ve D1 domainlerinde mutasyonunun neden olduğu IBMPFD hastalığında ortaya çıkmıştır. IBMPFD'li VCP mutasyonu gösteren hücrelerde otofagozom markerlerinin LC3II ve p62 nin fazlaca ekspres edildiği görülmüştür. p97/VCP, siRNA yöntemiyle nakdavn edildiğinde, p62 ve LC3II nin hücre sitoplazması içerisinde toplandığı saptanmıştır. Bütün bunlar p97/VCP'nin otofajik protein degradasyonunda gerekli bir protein olduğunu göstermektedir. Aynı zamanda, p97/VCP'nin otofagozom-lizozom füzyonunda ve otolizozom oluşumunda gerekli olduğu çalışılmıştır. p97/VCP mutant hücrelerin otofagozomlarında übikütinin toplandığı görülmüş ve p97/VCP'nin übikütinlenmiş substratların otofajik degradasyonları için gerekli olabileceğini önermektedir. Fakat p97/VCP aracılı otofagozom-lizozom füzyonunun mekanizması veya bazı otofagozom ilişkili proteinlerin übikütin benzeri domainler ile ilişkisi tam olarak açıklanamamıştır.

2.8.1.1.2. p97/VCP'nin Selektif Otofajiyi Yönetmesi

Mitokondri ve peroksizomlar mitofaji ve peksifaji olarak bilinen yöntem ile yıkılmaktadırlar. Nükleusun bir kısmı, 60S ribozomal ünite ve endoplazmik retikulum yine otofaji yöntemiyle yıkılmaktadır (Dargemont C, 2011). Maya hücrelerinde yapılan çalışmada, nitrojen yokluğunda olgun ribozomların 60S ünitelerinin degrade olduğu gösterilmiştir. Mitofaji ile ise hasarlı ve ya fonksiyon görmeyen mitokondrinin eliminasyonu sağlanmaktadır. Birçok mitokondriyal proteinin (Atg32, Atg11...) stress veya yaşlılık gibi durumlarda otofajik yıkım için devreye girdiği bilinmektedir. Memeli hücrelerinde mitokondrilerin iş görmemesi Parkinson hastalığı gibi önemli nörodejenaratif patolojiler ile ilişkilendirilmiştir. PARK2 gen ürünü olan Parkin'nin mutasyona uğraması ile Parkinson hastalığı ortaya çıkmaktadır. Parkin hasarlı

mitokondrilerin toplanması ve fonksiyon görmeyenlerin eliminasyonu için gereklidir. p97/VCP’inde, Parkin aracılı mitokondriyal yıkım için gerekli olduğu belirlenmiştir. p97/VCP’nin aynı zamanda, hasarlı mitokondriyal membranlarındaki übikütinlenmiş proteinleri membranlardan ayırıp proteasomda degrade olabilmelerini sağlamaktadır. p97/VCP’nin endoplasmik retikulumun ve nükleusun bir parçasının yıkımında da fonksiyon görebileceği gösterilmiştir (Dargemont C, 2011).

2.8.1.1.3. p97/VCP ve Patolojisi

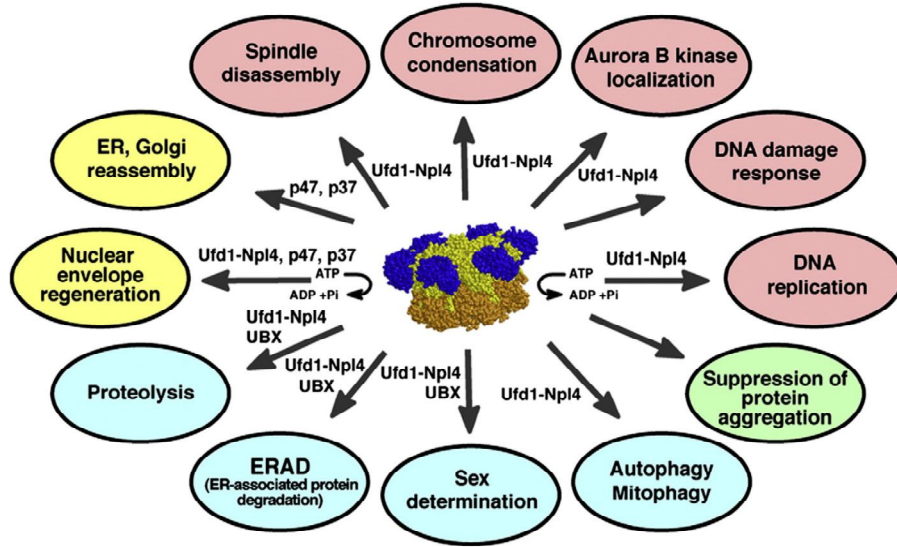
p97/VCP’nin birçok hastalığın patogenezinde rol oynamaktadır. p97/VCP ile ilişkili, birçok hastalığın farklı sistem ve organlardaki dağılımı Çizelge 2.1’de gösterilmiştir. Bu hastalıkların çoğunda VCP geninin ilgili bölgesinde mutasyonlar saptamıştır (Lue ve ark., 2002).

Çizelge 2.1: p97/VCP ile İlişkili Patolojiler

Sistem ve organlar	Patoloji
Kemik ve eklemler	Paget hastalığı
Kas	İnklüzyon cisimcik miyopati
Beyin	Frontotemporal demans
Göz	Katarak
Beyin	Parkinson, Alzhmeir, ALS

2.8.1.1.4. p97/VCP ile İlişkide Olan Proteinler ve Fonksiyonları

Birçok proteinle olan ilişkisi nedeniyle, p97/VCP hücrede çok çeşitli aktiviteler göstermektedir (Şekil 2.11). Bu şekilde, p97/VCP’nin protein degradasyonu, hücre siklusu kontrolü, otofaji gibi birçok önemli fonksiyonu yerine getirdiği özetlenmiştir (Yamanaka ve ark., 2011).



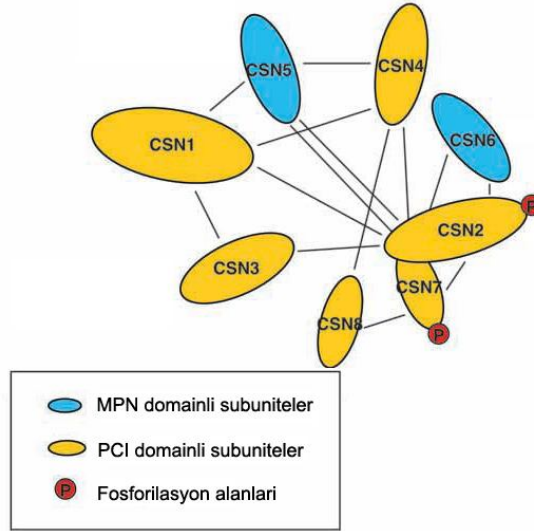
Şekil 2.11: p97/VCP'nin çoklu fonksiyonları. p97/VCP ve kofaktörleri birçok biyolojik fonksiyonun yerine getirilmesinde görev alırlar. **Sarı yuvarlak içindekiler:** membran oluşumu ile ilgili fonksiyonları. **Mavi ve yeşil yuvarlak içindekiler:** Protein yıkımı ile ilgili fonksiyonları, **Pembe daire içindekiler:** Hücre siklusu ve DNA'nın işlenmesi ile ilgili fonksiyonları göstermektedir (Yamanaka ve ark., 2011)

2.8.1.2. COP9 Signalozom (CSN)

CSN, UPS'in en önemli üyelerinden birisidir. Deng ve arkadaşları, 1994 ilk olarak, Arabidops'larda (COP: constitutive photomorphogenesis: sürekli ışıkla değişim), ışık bağımlı gelişimin baskılayıcısı olarak tanımlanmıştır (Wei ve ark., 1994; Wei ve Deng, 1999). Jab1/CSN5 içeren signalozom olarak da bilinen memeli CSN kompleksi, izole edilip, 26S proteazom ile birlikte saflaştırılmıştır (Seeger ve ark., 1998).

CSN, gel filtrasyon kolonlarında, 450-550 kDa moleküler ağırlığında olduğu saptanmış ve CSN1'den CSN8'e kadar 8 subuniteden oluşmuştur (Şekil 2.12). CSN subunitelerinin en belirgin karakteristik özellikleri, PCI/PINT (Proteazom, COP9 signalozom, Initiation factor 3/Proteazom subunits, Int-6, Nip-1, ve TRIP-15) ve MPN/MOV34 (Mpr1 Pad1-N-terminal) domainlerinin bulunmasıdır (Aravind ve Ponting, 1998). Bu iki domain aynı zamanda, CSN yanında, 26S proteazom kapak kompleksinde ve ökaryotik translasyon başlatıcı faktör 3 (eIF3)'de de bulunmuştur (Glickman ve ark., 1998; Wei ve ark., 1998). Ökaryotik hücrelerde, lizozomal olmayan protein yıkımından sorumlu 26S proteazom, 20S kor ve 19S düzenleyici iki kısımdan oluşmuştur. İlginç olarak, sekiz CSN subunitelerinin herbiri, 19S düzenleyici bölümün kapak kısmındaki ünitelerle homoloji göstermektedir. Bu homoloji, CSN ve proteazom

kapağının, evrimsel olarak aynı atadan gelebileceğini göstermektedir (Kapelari ve ark., 2000)



Şekil 2.12: CSN subunitelerinin birbiriyle ilişkileri. MPN domainine sahip olan subuniteler mavi, PCI domainine sahip olanlar ise sarı ile gösterilmiştir. CSN2 ve CSN7'nin fosforilasyonu ise kırmızı ile belirtilmiştir (Kapelari ve ark., 2000)

2.8.1.2.1. CSN'in Metalloproteaz Ve Denedilaz Aktivitesi

Jab1/CSN5, JAMM (Jab1/MPN domain-associated metalloisopeptidase: Jab1/MPN domain-ilişkili metaloizopeptidaz) ya da MPN olarak bilinen metalloproteaz motifini içerir. Bu motifdeki mutasyonun, metalloproteaz aktivitesini engellediği görülmüştür. Benzer bir şekilde, proteazom kapağında yer alan, Jab1/CSN5 paralogu olan ve 26S proteasomun deübikütinleme aktivitesinden sorumlu RPN 11'nin da, aynı motifi içerdiği bilinmektedir (Verma ve ark., 2002). Diğer bazı proteinlerde, JAMM/MPN motifine sahip olmalarına rağmen (Maytal-Kivity ve ark., 2002; McCullough ve ark., 2004; Bellare ve ark., 2006), bu proteinlerin metalloproteaz aktivitesi göstermedikleri saptanmıştır. Hem Jab1/CSN5 hem de RPN11, ancak CSN kompleksi ya da 26S proteazom yapısında buldukları zaman bu aktiviteyi gösterdikleri belirlenmiştir. Jab1/CSN5 ve RPN11'in metalloproteaz aktiviteleri, deübikütinleme ve denedilasyon aktiviteleri ile uyumlu bir şekilde yönetilmektedir (Cope ve ark., 2002).

Moleküler biyolojide ilgileri çeken CSN'nin diğer bir önemli fonksiyonu da, Jab1/CSN5'in MPN motifinden dolayı, SCF kompleksinin denedilasyonunda görev almasıdır. SCF übikütin ligaz kompleksi, CSN'nin temel hedefidir. SCF, hedef proteine

übikütinin eklenmesinde görev yapan bir E3 übikülin ligazdır. Übikülin eklenmesine benzer bir şekilde, nedilasyon, Nedd8 aktive edici enzimlerle katalize edilmektedir. Fakat, denedilasyon ise Jab1/CSN5'in metaloisopeptidaz aktivitesi ile katalize edilmektedir. Nedilasyon ve denedilasyonun aktif bir şekildeki bu siklusu, SCF aktivitesinin sağlanması için gereklidir (Cope ve ark., 2002).

2.8.1.2.2. CSN İlişkili Protein Kinaz Ve Deübikülinasyon Aktivitesi

CSN'nin c-Jun (Ser63 ve Ser73), I κ B α , NF- κ B prekürsörü p105'i ve de tümör supresörü p53 (Ser149, Thr 150 ve Thr 155)'ü fosforladığı *in vitro* olarak gösterilmiştir (Seeger ve ark., 1998; Bech-Otschir ve ark., 2001). Aynı zamanda, bazı CSN subuniteleri üzerinde fosforlanma alanları bulunmasından dolayı da, CSN'nin kendisi de fosforlanmaya hedefdir (Henke ve ark., 1999).

Son olarak, übikülin isopeptidaz aktivitelerinin CSN ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Groisman ve ark., 2003; Zhou ve ark., 2003; Hetfeld ve ark., 2005; Schweitzer ve ark., 2007). CSN'nin deübikülinleme aktivitesi iki yolla açıklanmaktadır: CSN ya mono-übikülinlenmiş substratlardan übikütinin ayrılmasını ya da poliübikülin zincirlerinin depolimerize olmasını sağlar (Groisman ve ark., 2003). CSN'nin bu ilk aktivitesi, Jab1/CSN5'teki metaloproteaz domainine ihtiyaç duyarken (Groisman ve ark., 2003), sonraki aktivitesi ise tüm CSN ile ilişkilidir (Zhou ve ark., 2003; Hetfeld ve ark., 2005; Schweitzer ve ark., 2007). Kısacası, CSN hem denedilasyon hem de deübikülinasyon aktivitelerine ya kendisi sahiptir ya da diğer deübikülinleyici enzimlerle ilişkide olması nedeniyle bu aktiviteleri yürütmektedir.

MATERYAL ve METOD

3.1. MATERYAL

3.1.1. Kimyasallar ve Ait Olduğu Kaynaklar

Bouin Fiksatif	Biooptica, İtalya
Etanol	Sigma-Aldrich, Almanya
Ksilen	Merck, Almanya
Methanol	Sigma-Aldrich, Almanya
Formaldehit	Merck, Almanya
Sitrik Asit	Carlo Erba, İtalya
NaOH	Sigma-Aldrich, Almanya
Endojen Peroksit	ScyTek, Amerika
Blok Solüsyonu	ScyTek, Amerika
PAS Boya Kiti	Biooptica, İtalya
NaCl	Carlo Erba, İtalya
K ₂ HPO ₄	Carlo Erba, İtalya
KH ₂ PO ₄	Carlo Erba, İtalya
Kapatma Solüsyonu	ScyTek, Amerika
DAPI	İnvitrogen, Amerika
Parafin	Sigma, Amerika
Lam	İnvitro, Almanya
Lamel	Menzel, İtalya
Polilizinli Lam	Leica, İngiltere
Pap pen	Leica, İngiltere
Mayer's Hematoksilen	Sigma-Aldrich, Almanya
Entellan	Merck, Almanya
BSA	Sigma-Aldrich, Almanya
Diff-Quik boya seti	MidAtlantik, İngiltere
Triton X	Merck, Almanya

3.1.2. Kromojenler

DAB (Diaminobenzidine)	Sigma, Almanya
AEC	ScyTek, Amerika

3.1.3. Antikorlar, Ait oldukları Kaynaklar Ve Kullanım Oranları

Primer antikorlar	Firması	Dilüsyon oranı
Rabbit α -Jab-1	Santa Cruz, Amerika	1:500
α -Biotin-HRP	Amersham, Freiburg	1:1500
Mouse α -VCP	ABR, Amerika	1:1000
Rabbit α -ubiquitin	Abcam, İngiltere	1:200
Rabbit α -SMAD1	Axxora, Amerika	1:500
Rabbit α -SMAD5	Lifespan Biosciences, Amerika	1:100
Rabbit α -SMAD8	Santa Cruz, Amerika	1:50
Rabbit α -pSMAD1/5/8	Millipore, Almanya	1:100
Mouse α -BMP2	Abcam, İngiltere	1:50
Rabbit α -BMP4	Abcam, İngiltere	1:50
Sekonder antikorlar		
Goat α -rabbit-HRP	ICN, Ohio, Amerika	1:10,000
α -rabbit IgG-Rhodamine	Chemicon, Hampshire, İngiltere	1:1,000
α -mouse IgG-FITC	Dianova, Hamburg	1:1,000
Rabbit α -mouse IgG	Cell Signaling, Amerika	1:100
Biotinylated Antibody	ScyTek, Amerika	
HRP Antibody	ScyTek, Amerika	

3.1.4. Deney Aletleri ve Markaları

Hassas terazi	Korn ABJ, Türkiye
Mikrodalga fırını	Arçelik, Türkiye
Mini santrifüj	Biosan, Türkiye
Floresan mikroskopu	Nikon, Almanya
Mikrotom	Leica, Almanya
Etüv	Nüve, EN500
Işık mikroskopu	Nikon, Almanya

3.2. METOD

3.2.1. Deneylerde Kullanılan Örneklerin Elde Edilmesi

Çalışmada hayvan etik kurulunun onayı ile 30 adet Wistar albino erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar postnatal gelişimlerine göre 0 günlük, 5 günlük, 15 günlük, 30 günlük ve 60 günlük olmak üzere beş gruba ayrıldı. Bütün gruptaki sıçanlar yüksek doz intraperitoneal pentobarbital (100mg/kg) ile sakrifiye edilip, testis dokuları bouin fiksatifine konuldu.

Bu çalışma grubuna ek olarak insan etik kurulunun onayı ile embriyoloji laboratuvarına rutin semen analizi için başvuran sağlıklı (10) ve infertil (10) bireylerden hasta onam formu imzalatılarak elde edilen ejakülatlardan sperm yayma preparatları yapıldı. Bu preparatlara immünohistokimya uygulandı.

3.2.2. Deneylerde Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması

Sitrat Solüsyonu Hazırlama: 2,1 gr toz halindeki sitrik asit 1000 ml distile suda çözdürülür. Solüsyonun Ph'ı NaOH ile ayarlandıktan sonra 0,1 M ve Ph=6 solüsyon elde edilir.

Fosfat Tampon Solüsyonu Hazırlama (PBS): 87,6 gr NaCl, 22,8 gr K₂HPO₄ ve 6,8 gr KH₂PO₄ 1lt distile su içinde çözdürülür.

BSA Solüsyonu Hazırlama: 0,1 gr BSA 10 ml PBS içinde çözdürülerek %1'lik BSA solüsyonu elde edilir

Triton X Solüsyonu Hazırlama: 25 ul Triton X 10 ml PBS içinde hazırlanır.

Formalin Hazırlama: 10 ml formaldehit distile su ile 100 ml'e tamamlanır.

3.2.3. Kullanılan Teknikler

Tezimde histokimya, immünohistokimya ve immünofloresan teknikleri kullanılmıştır.

3.2.3.1.Histokimya

Çalışmada dokuların genel morfolojik yapısını incelemek amacıyla histokimyasal teknik olarak Periyodik Asit Schiff (PAS) boyama yöntemi kullanıldı. 0, 5, 15, 30 ve 60 günlük sıçanlara ait dokularda histokimyasal teknikler uygulamak için öncelikle testis dokuları bouin çözeltisinde tespit edilip yıkandıktan sonra dereceli yükselen alkol serilerinde (%70, %80, %90, %100) 6-12 saat bekletildi. 3'lü ksilen serilerinde 10'ar dakika ksilenle muamele edilen dokular daha sonra 3'lü parafin serisinde 1'er saat bekletilip temiz parafine gömme uygulandı. Üzerinde rutin histolojik doku takipleri yapıldıktan sonra mikrotom ile alınan 5 mikronluk kesitler lamlara toplandı ve bir gece 56°C' da inkübe edildi. Alınan kesitler 3 kez 10'ar dakika ksilolde ve dereceli yükselen alkol serilerinde (%70, %80, %90, %100) 5'er dakika bekletilerek dehidrate edildi. Suya indirilen dokular üzerine 10 dakika peryodik asit solüsyonu uygulandı. Distile suda yıkanan preparatlar 20 dakika Schiff kimyasalında bekletildikten sonra distile suda yıkandı. Daha sonra potasyum metabisülfid solüsyonunda 2 dakika bekletilen preparatlar üzerindeki solüsyon yıkamadan süzülerek uzaklaştırıldı ve 2 dakika fiksatif solüsyonuna maruz bırakıldı. Takiben preparatlar 5 dakika Mayer's hematoksilende bekletildi ve akan su altında 5 dakika yıkandı. Boyanmış preparatları dehidrate etmek için %70 ve %80'lik alkollerde 1'er dakika, %90 ve %100'lük alkollerde ise 2'şer dakika bekletildikten sonra şeffaflaştırmak için 3 kez 5'er dakika ksilende bekletildi. Son olarak ksilenden çıkarılan preparatlar entellan ve lamel ile kapatıldı.

Spermlerin morfolojik olarak incelenmesi için ise diff-quick boyama yöntemi uygulandı. Fertil ve infertil bireylerden alınan semen örnekleri ile yapılan sperm yayma preparatları 5-15 dakika oda sıcaklığında bekletilerek kurutuldu. Daha sonra diff-quick boya setinde bulunan sırayla 1 dakika solüsyon 1' de (fiksatif solüsyonu), 3 dakika solüsyon 2'de (eozin solüsyonu) ve 1 dakika solüsyon 3'de (azur solüsyonu) bekletildikten sonra distile suda yıkandı. Kurutulan preparatlar entellan ve lamel ile kapatıldı.

3.2.3.2. İmmünohistokimya

Parafin dokulardan elde edilen kesitler ile sperm yayma preparat farklı immünohistokimyasal teknikler uygulanmıştır.

Parafin dokulara uygulanan immünohistokimyasal teknik için öncelikle 0 günlük, 5 günlük, 15 günlük, 30 günlük ve 60 günlük sıçanlardan elde edilen testislere histokimya için yapıla doku takibinin aynısı uygulandı. Üzerinde rutin histolojik doku takipleri yapıldıktan sonra, mikrotomla alınan 5 mikronluk kesitler poli-L-lizin kaplı lamlarda (Leica, İngiltere) toplandı ve bir gece 56°C’ da inkübe edildi. Alınan kesitler 3 kez 10’ar dakika ksilolde ve dereceli yükselen alkol serilerinde (%70, %80, %90, %100) 5’er dakika bekletilerek dehidrate edildi. Suya kadar indirilen dokular, 0.1M sitrik asit solusyonu (pH: 6) içerisinde 5’er dakika 2 kez mikrodalgada kaynatıldı. PBS ile 3 kez 5 er dakika yıkama işleminden sonra, endojen peroksidaz aktivitesi %3’lük hidrojen peroksidazla baskılandı. Tekrar PBS ile 3 kez 5 er dakika yıkama işleminden sonra, oda ısısında kesitler spesifik olmayan reaksiyonu engellemek için 10 dk. bloklama serumuyla (ScyTek Laboratuarları, Amerika) bloklandı. 10 dakikalık inkübasyon sonrası blok solüsyonu yıkamadan uzaklaştırıldı ve primer antikor uygulandı. Kullanılan primer antikorlar ve dilusyon oranları yukarıda 3.1.3. de verilmiştir. Primer antikor ile muamele edilen kesitler kapalı nemli bir PBS ile oda sıcaklığında yıkamadan sonra sırayla biotinlenmiş sekonder antikorlar (ScyTek Laboratuarları, Amerika) ve peroksidaz-işaretli streptavidin (ScyTek Laboratuarları, Amerika) ile toplam 50 dakika inkübe edildi. Peroksidaz aktivitesi, 3-amino-9-ethylcarbazol (AEC) (ScyTek Laboratuarları, Amerika) kromojeni ile inkübasyon sonucu görünür hale getirilip, Mayer’in hematoksileni (Sigma-Aldrich, Almanya) ile zıt boyama yapıldı. Sonrasında, slaytlar su bazlı kapatma solusyonu (ScyTek, Amerika) ile kapatıldı. Kontroller için, kesitler primer antikorla benzer konsantrasyonda normal tavşan serumuyla inkübe edildi. Boyanan kesitler Leica mikroskop (Leica DM2500, Nussloch, Almanya) altında fotoğraflandırıldı. Sekonder antikorun horseradish peroxidase (HRP) ya da alkaline fosfotaz (AP) ile konjuge olma durumuna göre, AEC nin yanında, DAB veya Fast red gibi kromojenler de kullanılarak immunopositif bölgeler görünür hale getirildi.

Sperm yayma preparatlarına immünohistokimyasal teknikler uygulamak için fertil ve infertil bireylerden alınan semen örnekleri ile yapılan sperm yayma preparatları 5-15 dakika oda sıcaklığında bekletilerek kurutuldu. Daha sonra 5 dakika %4’lük formalinde bekletildikten sonra tekrar kurumaya bırakıldı. Takiben PBS’de yıkanan preparatlar %

0,0025'lik Triton X solüsyonunda yıkandıktan sonra tekrar PBS' de yıkanır. Bloklama ajanı BSA ile hazırlanan %1'lik BSA çözeltisinde oda sıcaklığında 15 dakika bekletilen preparatlar PBS ile yıkandıktan sonra primer antikora bir gece maruz bırakılır. Primer antikor ile muamele edilen kesitler kapalı nemli bir PBS ile oda sıcaklığında yıkamadan sonra sırayla biotinlenmiş sekonder antikorlar (ScyTek Laboratuvarları, Amerika) ve peroksidaz-işaretili streptavidin (ScyTek Laboratuvarları, Amerika) ile toplam 50 dakika inkübe edildi. Peroksidaz aktivitesi, DAB kromojeni ile inkübasyon sonucu görünür hale getirilip slaytlar entellan ile kapatıldı. Boyanan kesitler Leica mikroskop (Leica DM2500, Nussloch, Almanya) altında fotoğraflandırıldı..

3.2.3.3. İmmunofloresan

Bir önceki bölümde anlatılan immunohistokimya yönteminin temel başamakları aynı olmak şartıyla, kullanılan sekonder antikorların rhodamine ve FITC gibi belli dalga boylarında floresan renk vermesi nedeniyle özellikle çiftli boyamalarda immunofloresan işaretleme yöntemi tercih edilir. Kısaca tezimde, primer antikorlarla inkübasyondan sonra, rhodamine ile işaretli anti mouse ve FITC ile işaretli anti rabbit sekonder antikorları ile 1 saat oda ısısında inkübasyon gerçekleştirildi. Floresana uygun kapatma medyumunu (İnvitrogen, Amerika) ile preparatlar kapatılarak, Nikon microscope (Nikon E600, Almanya) altında fotoğraflar çekildi.

3.2.3.4. Çiftli İmmunofloresan Boyama

Çalışmamızda iki farklı proteinin aynı bölgede lokalizasyonunu göstermek amacıyla testiküler dokular üzerinde çiftli boyamalar yapıldı. Her iki primer antikor (SMAD1 ile p97/VCP) 3.1.3' de belirlenen dilusyon oranlarında aynı zamanda uygulanıp, geceboyu 4°C'de inkübe edildi. Ertesi gün, yıkama işleminden sonra, rhodamine-konjuge anti-mouse-Ig ile 1 saat oda ısısında inkübe edilip, ardından PBS ile yıkamaya geçildi ve sonrasında, FITC-konjuge anti-rabbit-Ig ile 1 saat inkübe edildi. Yıkama işlemlerinden sonra, nüklear boyanmaları görüntülemek amacıyla DAPI (İnvitrogen, Amerika) boyasıyla preparatlar 5 dakika inkübe edildi ve özel kapatma solüsyonuyla kapatılıp, floresan mikroskobu altında incelendi.

3.3. İstatiksel Analiz

3.3.1. Semiquantitative HSCORE analizi

Herbir kesit için ışık mikroskobu altında 40X büyütmede birbirinden habersiz iki araştırmacı tarafından rastgele beş alan seçildi ve bu alanlar içinde hücrelerin boyanma yoğunluğuna göre [0 (boyanma yok), +1 (zayıf, fakat tespit edilebilir boyanma), +2 (orta şiddetli boyanma) ve +3 (yoğun boyanma)] hücre sayımı yapıldı. Hesaplama için HSCORE formülü kullanıldı [$\sum P_i(i+ 1)$]: i boyanma yoğunluğu skorunu, P_i boyanan hücrelerin yüzdesini gösterir]. İki gözlemcinin hesapladığı skorların ortalaması alındı ve HSCORE değerleri grafikte gösterildi.

İstatiksel değerlendirmeler SigmaStat versiyon 3.5 (Jandel Scientific Corp., San Rafael, CA) kullanılarak ve anlamlılık $p < 0.05$ olarak değerlendirilmiştir. Farklı postnatal günlerde elde edilen dokularda ortaya çıkabilecek muhtemel farklılıklar karşılaştırmalı testler (ANOVA, t-test) ve korelasyon regresyon analizleri (Pearson, Spearman) ile değerlendirildi.

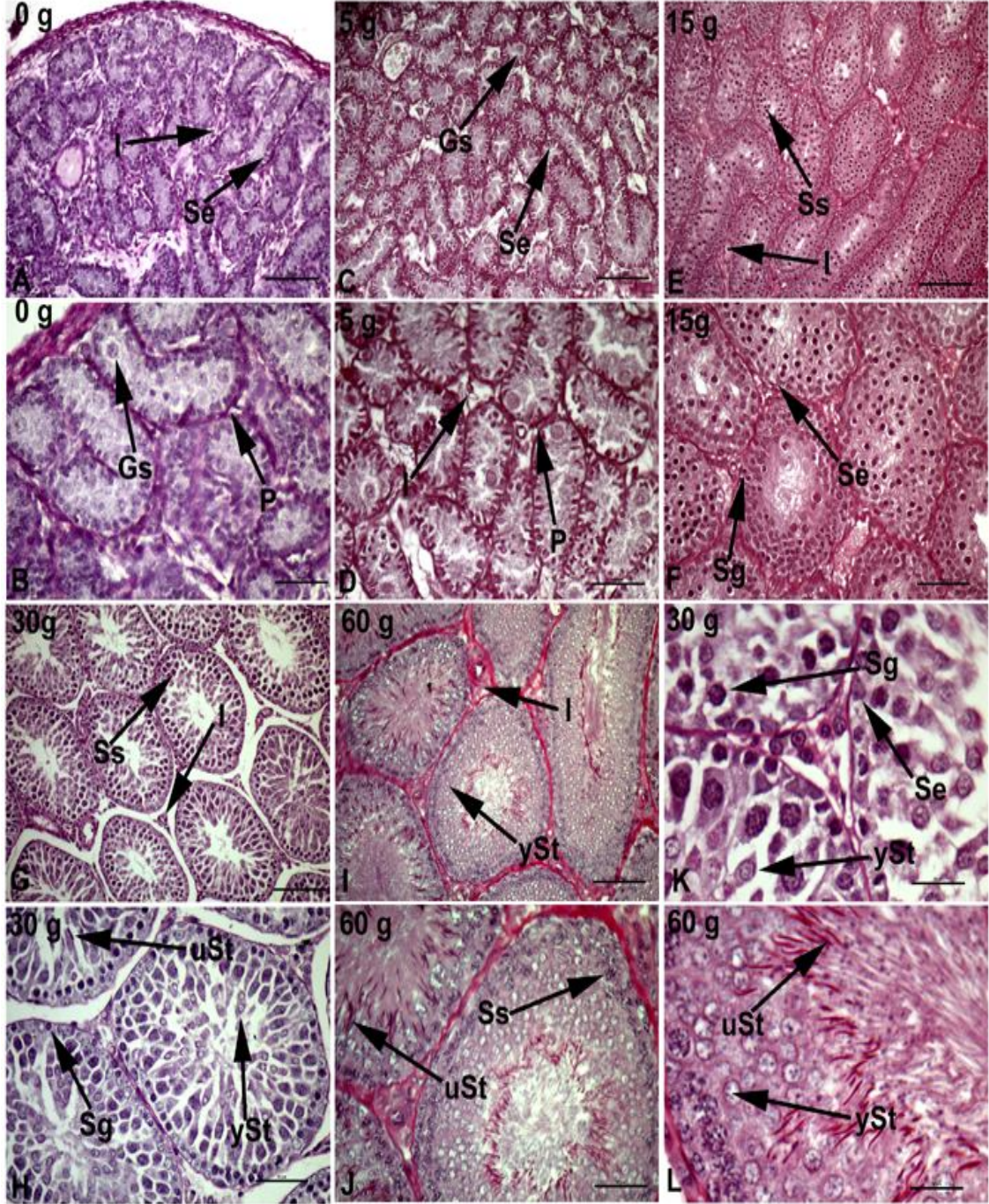
BULGULAR

4.1. Postnatal Sıçan Testisinin Genel Morfolojik Özellikleri

0, 5, 15, 30 ve 60 günlük postnatal sıçan testislerinin parafin doku takiplerinden sonra elde edilen kesitler üzerinde PAS boyaları yapıldı ve her postnatal günün hücresel düzeyde genel morfolojik özellikleri belirlendi (Şekil 4.1, Çizelge 4.1). 0 ve 5 günlük sıçan testisinde gonositler, Sertoli hücreleri ve somatik hücreler gözlemlendi. 15 günlük sıçan testisinde spermatogonya, Sertoli hücresi, spermatozoid ve somatik hücreler gözlemlendi. 30 günlük sıçan testisinde Sertoli hücresi, spermatogonya, spermatozoid, yuvarlak spermatozoid ve uzamış spermatozoidler gözlemlendi. 60 günlük sıçan testisinde Sertoli hücresi, spermatogonya, spermatozoid, yuvarlak spermatozoid ve uzamış spermatozoidler ve spermatozoalar gözlemlendi.

Çizelge 4.1: Postnatal Sıçan Testisinde Hücresel Organizasyon

Postnatal Gelişim Günü	Hücresel Organizasyon
0	Gonosit, Sertoli hücresi ve somatik hücreler
5	Gonosit, Sertoli hücresi ve somatik hücreler
15	Spermatogonya, Sertoli hücresi, spermatozoid ve somatik hücreler
30	Spermatogonya, Sertoli hücresi, somatik hücreler, spermatozoid, yuvarlak ve uzamış spermatozoidler
60	Spermatogonya, Sertoli hücresi, somatik hücreler, spermatozoid, yuvarlak ve uzamış spermatozoidler, spermatozoa



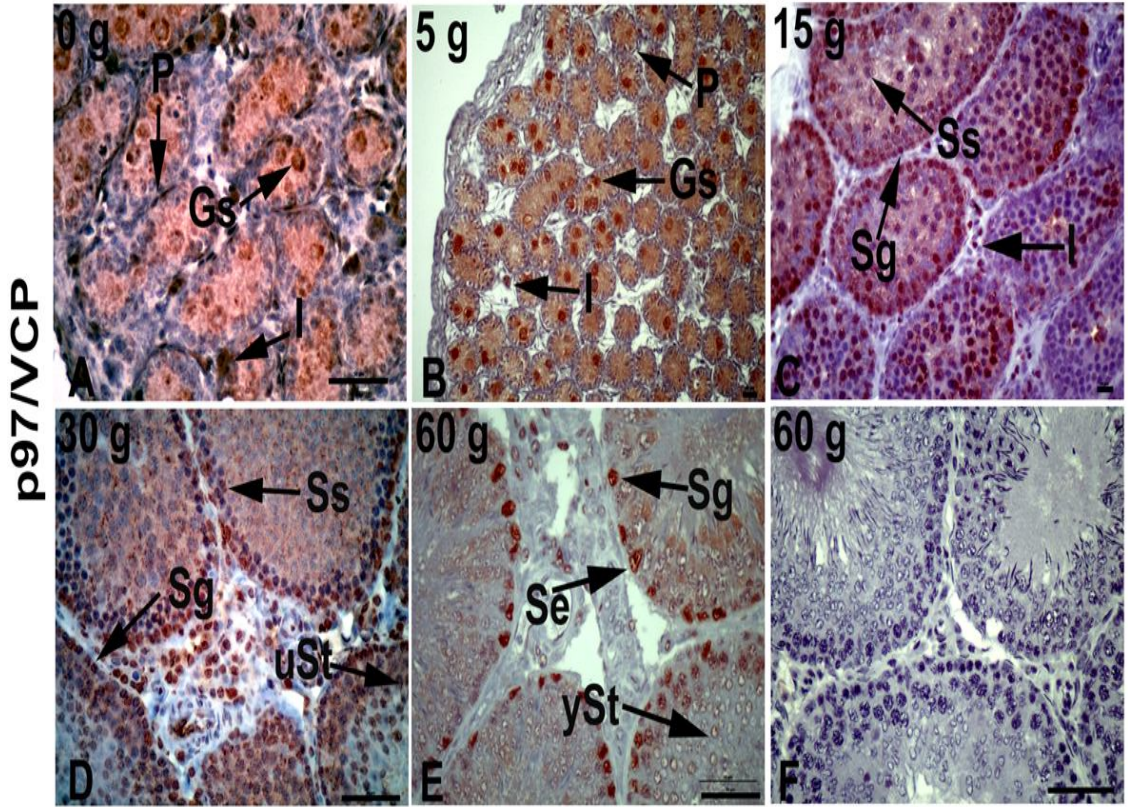
Şekil 4.1.: Postnatal 0, 5, 15, 30 ve 60 günlük sıçan testisinin Pas boyası ile morfojik yapısının gösterilmesi: A-B: 0 günlük sıçan testisinde gonositler, Sertoli hücreleri ve somatik hücreler gözlemlendi. C-D: 5 günlük sıçan testisinde gonositler, Sertoli hücreleri ve somatik hücreler gözlemlendi. E-F: 15 günlük sıçan testisinde spermatogonya, Sertoli hücreleri spermatosit ve somatik hücreler gözlemlendi. G-H: 30 günlük sıçan testisinde Sertoli hücreleri, spermatogonya, spermatosit, yuvarlak spermatid ve uzamış spermatidler gözlemlendi. I-J: 60 günlük sıçan testisinde Sertoli hücreleri, spermatogonya, spermatosit, yuvarlak spermatid ve uzamış spermatidler ve spermatozoalar gözlemlendi. Bar:50 µm.

4.2. Postnatal Sıçan Testisinde Übikütün Proteazom Sistemi (UPS) Proteinlerinin İmmunohistokimyasal Ekspresyonları

Übikütün Proteazom Sistemi (UPS) proteinlerinden sırasıyla p97/VCP, Jab1/CSN5 ve übikütünün immunohistokimyasal lokalizasyonları 0, 5, 15, 30 ve 60 günlük postnatal sıçan testislerinde belirlendi.

4.2.1. p97/VCP Ekspresyonunun Belirlenmesi

0, 5, 15, 30 ve 60 günlük postnatal sıçan testislerinden elde edilen kesitler ile yapılan immünohistokimya sonucunda, p97/VCP proteinin gelişmekte olan sıçan testisinde en fazla ve en güçlü olarak gonosit, Sertoli hücreleri, spermatositler ve uzamış spermatidlerde immünoreaktivite gösterdiği belirlendi (Şekil 4.2). Postnatal 0. ve 5.günde p97/VCP immünoreaktivitesi gonosit ve peritübüler hücrelerde gözlemlendi (Şekil 4.2A-B). Ayrıca intertisyel alanlarda p97/VCP immunopozitif somatik hücrelere rastlandı. 15.gün, 30.gün ve 60.günlerde en güçlü p97/VCP immünoreaktivitesi spermatogonyalardaydı (4.2C-E). 15 günlük sıçan testisinde, spermatositlerde saptanan p97/VCP immünoreaktivitesinin 30 ve 60. günlerde azaldığı saptandı. 30. günde beliren yuvarlak ve uzamış spermatidlerde de p97/VCP immünoreaktivitesi gözlemlendi, fakat 30. ve 60. günlerde en yoğun olarak spermatogonya ve Sertoli hücrelerinde bulundu (4.2D-E). Sertoli ve intertisyel hücrelerde ise postnatal gelişime bağlı olarak artan bir immünoreaktivite belirlendi.

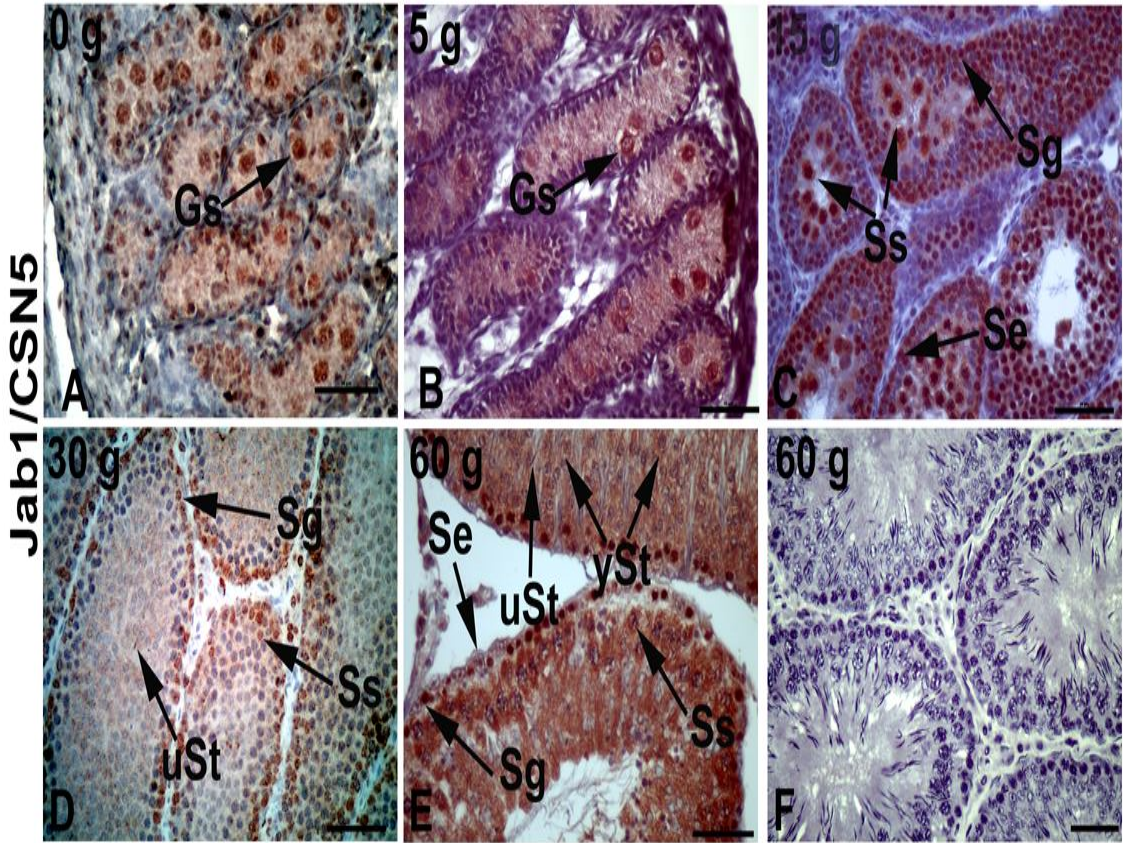


Şekil 4.2: Postnatal 0 (A), 5 (B), 15 (C), 30(D) ve 60 (E) günlük sıçan testisinde p97/VCP lokalizasyonları: A: 0 günlük sıçan testisinde p97/VCP'nin gonositlerde(Gs) ve daha az olarak da intertitsiyal hücrelerde (İ) immünoreaktivitesi gözlenmektedir. B: 5 günlük sıçan testisinde 0 günlüğe göre artmış p97/VCP immünoreaktivitesi gözlenmektedir. En fazla gonositlerde(Gs) ve daha az olarakta interstisyel hücrelerde (İ) immünoreaktivite izlenmektedir. C: 15 günlük testislerde ise Sertoli (Se) ve spermatogonya (Sg) hücrelerinde nüklear, spermatoisitlerde (Ss) ise sitoplazmik immünoreaktivite gözlenmektedir. Ayrıca intertitsiyal hücrelerde de (İ) immünoreaktivite belirlendi. D: 30 günlük sıçan testisinde Sertoli (Se), Spermatogonya (Sg), Spermatoisit (Ss), uzamış spermatidler (uSt) ve interstisyel hücrelerde (İ) immünoreaktivite gözlendi. E: 60 günlük ergin sıçan testisinde en belirgin Sertoli (Se) hücresi ve spermatogonyalarda (Sg), daha az olarak da Spermatoisit(Ss) ve uzamış spermatidlerde (uSt) p97/VCP immünoreaktivitesi izlenmektedir. F: Negatif kontrol. Bar:50 μm.

4.2.2. Jab1/CSN5 Ekspresyonunun Belirlenmesi

UPS'de çalışan ve p97/VCP ile ilişkili proteinlerden biri olan Jab1/CSN5'in lokalizasyonunu belirlemek amacıyla yapılan immünohistokimyasal çalışmalar sonucunda Jab1/CSN5'in başlıca gonosit, spermatogonyum, spermatoisit, Sertoli hücreleri ve uzamış spermatidlerde immunopozitif reaksiyonu saptandı (Şekil 4.3A-F). Jab1/CSN5 ekspresyonunun postnatal gelişime bağlı olarak (0. günden 60. güne doğru) dereceli bir şekilde arttığı belirlendi. 0. ve 5. günlerde en yoğun gonositlerde Jab1/CSN5 immünoreaktivitesi saptanırken (Şekil 4.3A-B), 15. günde bu

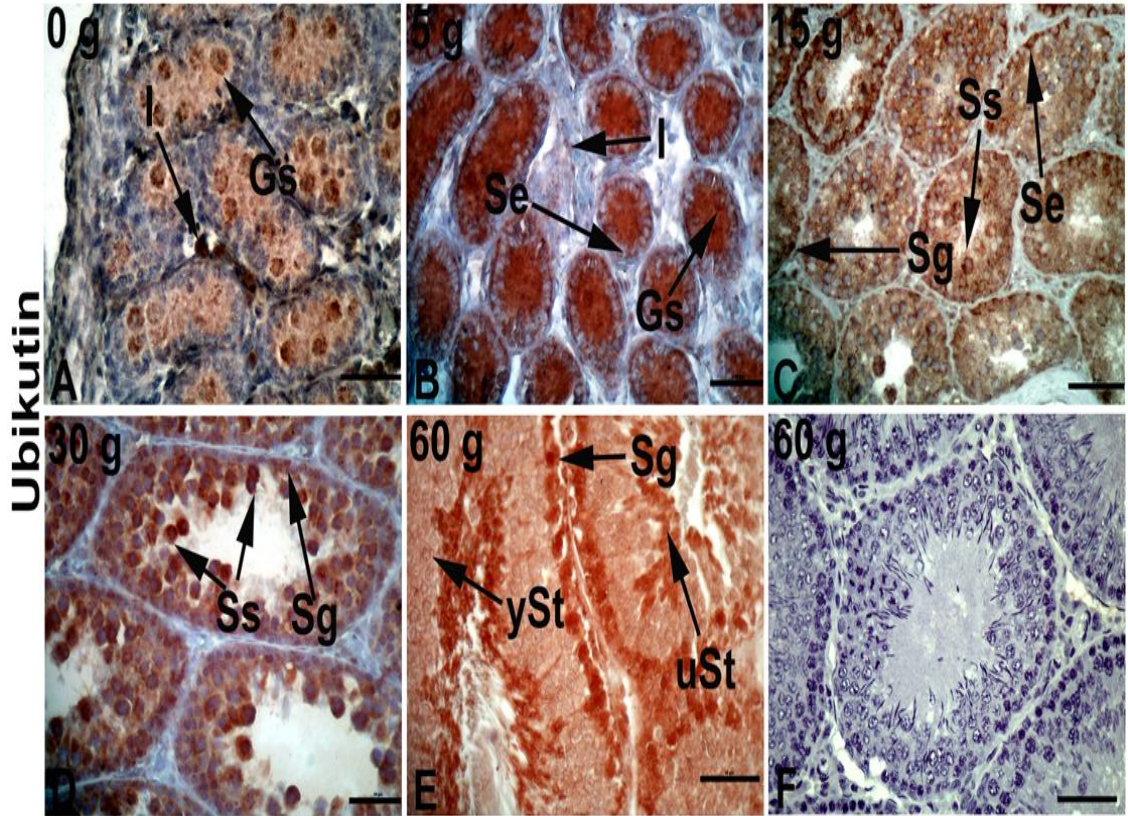
immunoreaktivitenin çok belirgin bir şekilde spermatogonya ve spermatisitlerde arttığı saptandı (Şekil 4.3C). 30.gün ve 60.günlerde ise en güçlü immümoreaktivite yine spermatogonyum ve spermatisitlerde gözlemlendi, fakat yuvarlak ve uzamış spermatidlerde orta şiddetli Jab1/CSN5 immunoreaktivitesi belirlendi (Şekil 4.3D-E). Sertoli hücrelerindeki Jab1/CSN5 immunoreaktivitesi 15.gün ve 30.günlerde, 60. güne göre daha yoğundu. İnterstitiyel hücrelerde ise 15.günden itibaren artan ekspresyon saptandı.



Şekil 4.3: Postnatal 0 (A), 5 (B), 15 (C), 30 (D) ve 60 (E) günlük sıçan testisinde Jab1/CSN5 lokalizasyonları: A: 0 günlük sıçan testisinde Jab1/CSN5 en yoğun gonositlerde (Gs) immunoreaktivitesi gözlenmektedir. B: 5 günlük sıçan testisinde sadece gonositlerde (Gs) immunoreaktivite belirlenmiştir. C: 15 günlük sıçan testisinde spermatogonya (Sg) ve spermatisitlerde (Ss) güçlü bir immunoreaktivite gözlenirken, Sertoli hücreleri (Se) ve interstitiyel (İ) hücrelerde daha zayıf bir immümoreaktivite gözlemlendi. D: 30 günlük sıçan testisinde en güçlü immunoreaktivite spermatogonyada (Sg) izlenirken, Sertoli (Se), Spermatisit (Ss), spermatid (St) ve interstitiyel hücrelerde de (İ) orta şiddetli Jab1/CSN5 immunolokalizasyonu saptanmıştır. E: 60 günlük ergin sıçan testisinde en yoğun Jab1/CSN5 immunoreaktivitesi spermatogonya (Sg) ve spermatisitlerde (Ss) izlenirken, Sertoli (Se) hücresi, uzamış (uSt) ve yuvarlak spermatidlerde (ySt) de zayıf bir immümoreaktivite gözlemlendi. F: Negatif kontrol. Bar:50 µm.

4.2.3. Übikütin Ekspresyonunun Belirlenmesi

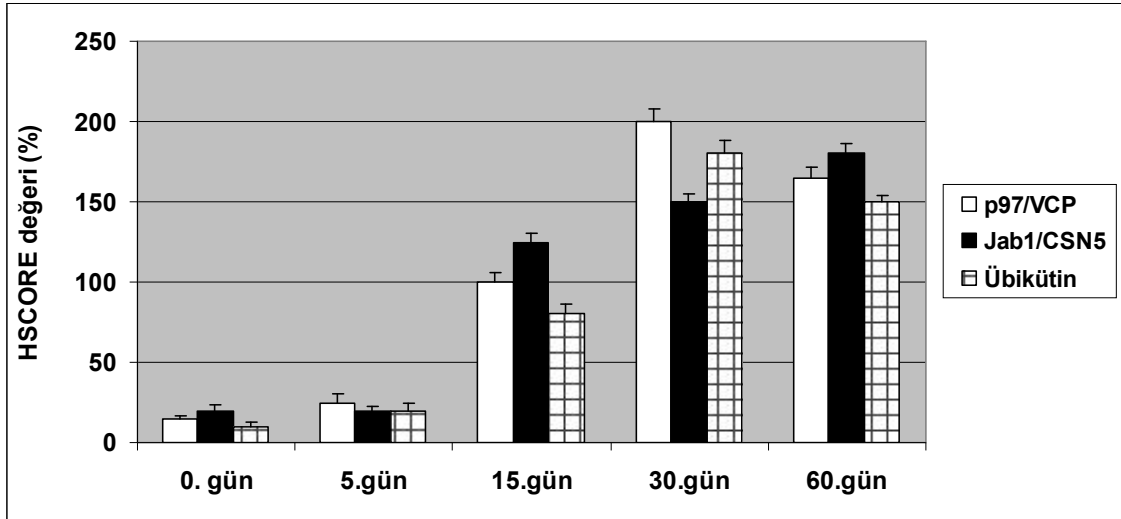
p97/VCP'ye bağlandığı bilinen bir başka molekül olan übikütin ardı ardına dizilerek p97/VCP'nin N domainine bağlanır. Übikütinlenmiş proteinler p97/VCP aracılığıyla yıkılmak üzere proteozoma taşınırlar. Gelişmekte olan sıçan testisinde lokalizasyonu araştırılan übikütinin Sertoli hücreleri, spermatozoid, uzamış spermatid ve interstisyel hücrelerde ekspresyonuna rastlandı (Şekil 4.4). Özellikle de Sertoli hücreleri ve interstisyel hücrelerde daha yoğun ekspresyonu saptandı. Übikütinin 0 günlükten 60 günlüğe doğru ekspresyonunda bir artış belirlendi.



Şekil 4.4: Postnatal 0 (A), 5 (B), 15 (C), 30 (D) ve 60 (E) günlük sıçan testisinde übikütin lokalizasyonları: A: 0 günlük sıçan testisinde übikütin immünoaktivitesi en yoğun olarak gonositlerde (Gs), orta şiddette ise interstisyel hücrelerde (İ) bulundu. B: 5 günlük sıçan testisinde gonositlerde (Gs) güçlü bir übikütin ekspresyonu gözlenirken, Sertoli hücreleri (Se) ve interstisyel hücrelerde (İ) daha zayıf bir ekspresyon gözlemlendi. C: 15 günlük sıçan testisinde spermatozoid (Sg) ve spermatozoidlerde (Ss) güçlü bir immünoaktivite gözlenirken, Sertoli hücreleri (Se) orta şiddetli ve interstisyel hücrelerde (İ) ise zayıf bir immünoaktivite izlendi. D: 30 günlük sıçan testisinde en güçlü immünoaktivite Spermatozoidlerde (Ss) gözlenirken, spermatozoid (Sg) ve Sertoli (Se) hücrelerinde de übikütin immünoaktivitesi saptandı. E: 60 günlük ergin sıçan testisinde Sertoli (Se), spermatozoid (Sg) Spermatozoid (Ss) ve uzamış spermatidlerde (uSt) belirgin immünoaktivite belirlendi. F: Negatif kontrol. Bar: 50 µm.

4.2.4. Postnatal Sıçan Testisinde UPS Proteinlerinin İmmunoreaktivitelerinin Gelişimlerine Göre Değerlendirilmesi

Yukarıda protein lokalizasyonları belirlenen UPS proteinlerinin, postnatal sıçan testisinde HSCORE yöntemini kullanarak sıçanların gelişimlerine göre nasıl bir dağılım gösterdikleri belirlendi (Şekil 4.5). Bu değerlendirme yapılırken hem pozitif immünreaktivite gösteren hücrelerin sayısı hem de immünreaktivitenin yoğunluk dereceleri göz önünde tutuldu. Postnatal günlere göre hücresel yönden yapılan değerlendirme Çizelge 4.2 'de özetlenmiştir. Hem sayısal hem de hücredeki immünreaktivitenin yoğunluğunun belirlendiği HSCORE analizi ise Şekil 4.5'de gözlenmektedir. Doğum sonrası 0.günden 60. güne kadar p97/VCP, Jab1/CSN5 ve übikütinin protein ekspresyonlarında farklılıklar gözlemlendi (Şekil 4.5).



Şekil 4.5: Gelişmekte olan sıçan testisinde p97/VCP, Jab1/CSN5 ve übikütinin karşılaştırmalı H-SCORE değeri: Bu proteinlerin ekspresyonlarında 5 günlükten 60 günlüğe doğru anlamlı bir artış saptanmıştır ($p < 0.005$) Bar:50 μ m.

Çizelge 4.2. Sıçan testisinde p97/VCP, Jab1/CSN5 ve Übikütünün Lokalizasyonu

Hücre	Protein	0	5	15	30	60
Gs	Jab1	+++	++	-	-	-
	P97/VCP	++	++	-	-	-
	Übikütün	+++	+++	-	-	-
Se	Jab1	-	-	++	++	+
	P97/VCP	-	-	++	++	+++
	Übikütün	-	+	++	+	++
İ	Jab1	+	+	+	++	+
	P97/VCP	+	+	+	++	+
	Übikütün	++	+	+	+	++
Sg	Jab1	-	-	+++	+++	+++
	P97/VCP	-	-	+++	+++	+++
	Übikütün	-	-	+++	++	+++
Ss	Jab1	-	-	+++	++	++
	P97/VCP	-	-	++	++	+
	Übikütün	-	-	+++	+++	+++
ySt	Jab1	-	-	-	++	+
	P97/VCP	-	-	-	++	++
	Übikütün	-	-	-	++	+
uSt	Jab1	-	-	-	++	++
	P97/VCP	-	-	-	++	++
	Übikütün	-	-	-	++	+++

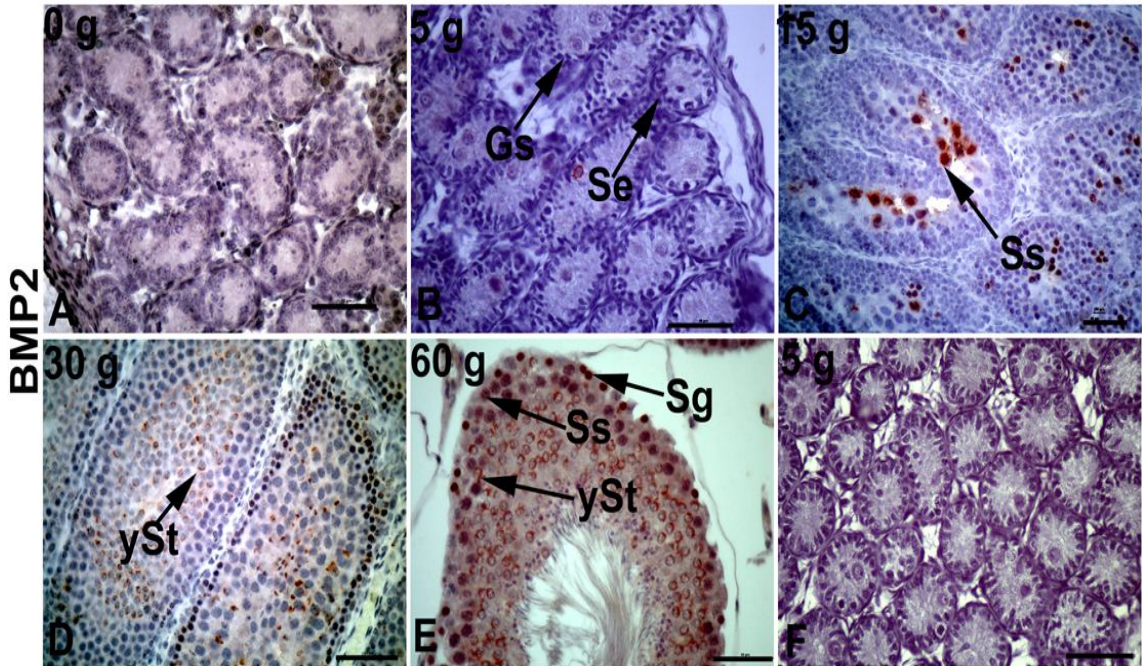
Çizelge 4.2. Gelişmekte olan sıçan testisinde p97/VCP, Jab1/CSN5 ve übikütün immünreaktif hücrelerinin semikantitatif değerlendirilmesi: Gs: Gonosit, Se: Sertoli hücresi, Sg: Spermatogonyum, Ss: Spermatozoid, ySt: Yuvarlak spermatozoid, uSt: Uzamış spermatozoid, İ: İnterstisyel hücreler. Zayıf immünoreaktivite: +, orta şiddetli immünoreaktivite: ++, güçlü immünoreaktivite: +++

4.3. Postnatal Sıçan Testisinde Bone (Kemik) Morfogenetik Protein (BMP) Ailesi Üyelerinin Ekspresyonları

BMP ailesine ait proteinlerden sırasıyla BMP2 ve BMP4'ün immunohistokimyasal lokalizasyonları 0, 5, 15, 30 ve 60 günlük postnatal sıçan testislerinde belirlendi.

4.3.1. BMP2 Ekspresyonunun Belirlenmesi

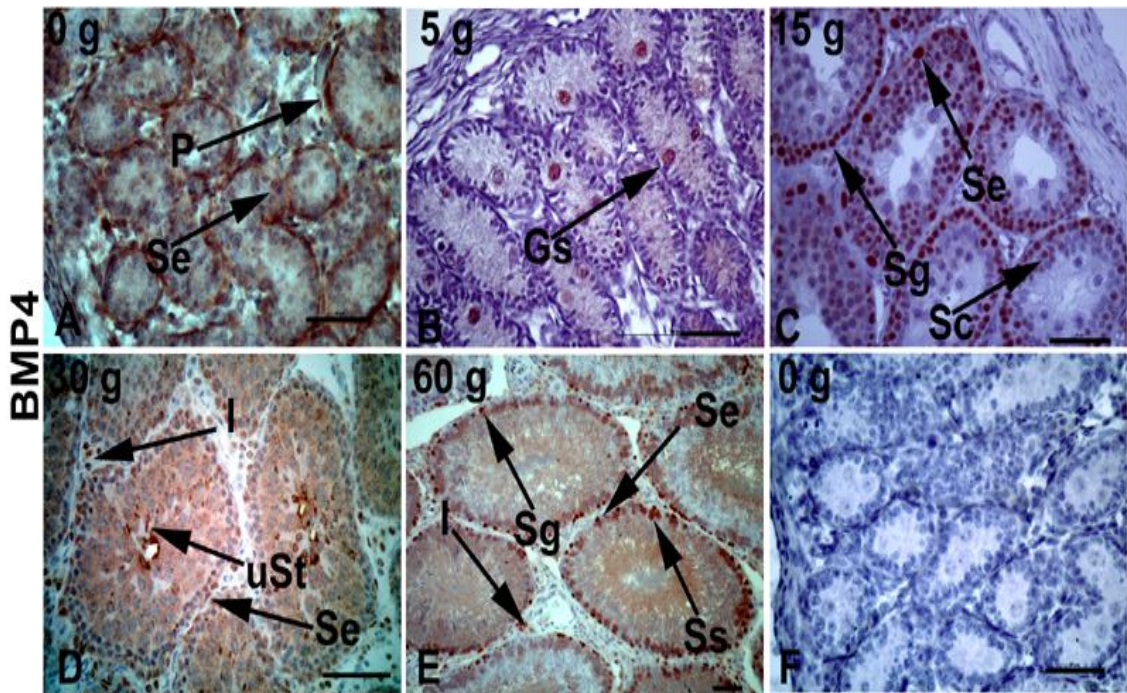
Parafine gömülen 0, 5, 15, 30 ve 60 günlük postnatal sıçan testislerinden elde edilen kesitler üzerinde yapılan BMP2 immünohistokimyası sonucunda bu proteinin gelişmekte olan sıçan testisinde spermatogonya, spermatozoid ve yuvarlak spermatidlerde lokalize oldukları bulundu (Şekil 4.6). 0. günde BMP2 ekspresyonuna rastlanılmadı (Şekil 4.6A) ve 5. günden BMP2'nin bazı gonositlerde ekspre edildiği gözlemlendi (Şekil 4.6B). 15. günde spermatozoidlerde en fazla ve en güçlü olarak (Şekil 4.6C), 30. ve 60. günlerde ise orta şiddetli round spermatidlerin akrozomlarında, spermatozoidlerde ve spermatogonyumda belirgin bir ekspresyon gözlemlendi (Şekil 4.6D-E).



Şekil 4.6. Postnatal 0 (A), 5 (B), 15 (C), 30 (D) ve 60 (E) günlük sıçan testisinde BMP2 lokalizasyonları: A: 0 günlük sıçan testisinde BMP2 negatif immünoreaktivite göstermiştir. B: 5 günlük sıçan testisinde sadece gonositlerde (Gs) zayıf bir BMP2 ekspresyonu gözlemlendi. C: 15 günlük sıçan testisinde spermatozoidlerde (Ss) güçlü bir immünoreaktivite gözlemlendi. D: 30 günlük sıçan testisinde en güçlü immünoreaktivite yuvarlak spermatidlerde (ySt) gözlemlendi. E: 60 günlük sıçan testisinde spermatogonya (Sg), Spermatozoid (Ss) ve yuvarlak spermatidlerde (ySt) belirgin immünoreaktivite gözlemlenmektedir. F: Negatif kontrol. Bar:50 µm.

4.3.2. BMP4 Ekspresyonunun Belirlenmesi

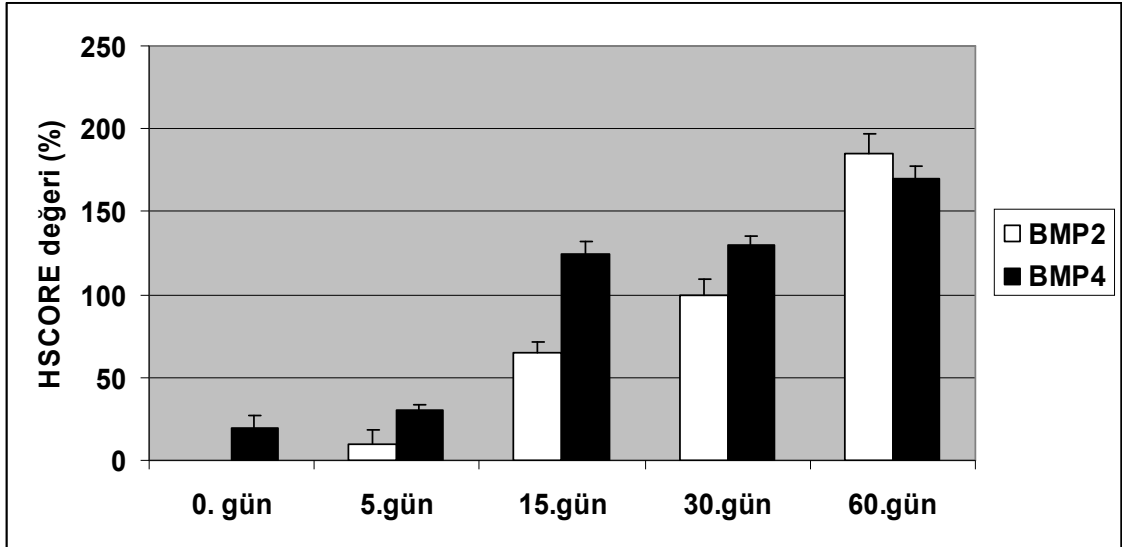
Histolojik takipler yapıldıktan sonra parafine gömülen 0, 5, 15, 30 ve 60 günlük postnatal sıçan testislerinden elde edilen kesitler ile yapılan BMP4 immünohistokimyası sonucunda bu proteinin gelişmekte olan sıçan testisinde gonosit, spermatogonya, spermatozoid, spermatid, interstitiyel hücreler ve peritübüler hücrelerde lokalize olduğu bulundu (Şekil 4.7). 0. günde peritübüler hücrelerde belirgin bir BMP2 ekspresyonu görülürken, Sertoli hücrelerinde zayıf bir ekspresyon saptanmıştır (Şekil 4.7A). 5. günde ise sadece gonositlerde orta şiddetli bir boyanma varken 15, 30 ve 60 günlerde Sertoli hücreleri ve spermatogonyalarda çok güçlü bir BMP4 ekspresyonu gözlemlendi (Şekil 4.7C-E).



Şekil 4.7. Postnatal 0 (A), 5 (B), 15 (C), 30 (D) ve 60 (E) günlük sıçan testisinde BMP4 lokalizasyonları: A: 0 günlük sıçan testisinde BMP4 peritübüler hücrelerde (P) şiddetli ve Sertoli hücrelerinde (Se) zayıf immünoreaktivite göstermiştir. B: 5 günlük sıçan testisinde gonositlerde(Gs) güçlü bir BMP4 ekspresyonu gözlemlendi, fakat Sertoli hücrelerinde (Se) bu ekspresyon zayıftı. C: 15 günlük sıçan testisinde Sertoli (Se) ve Spermatogonyumlarda (Sg) güçlü bir immünoreaktivite, spermatozoidlerde (Ss) ise orta şiddetli bir immünoreaktivite gözlemlendi. D: 30 günlük sıçan testisinde en güçlü immünoreaktivite interstitiyel hücrelerde (I) gözlemlenirken, uzamış spermatidlerde (uSt) ve Sertoli hücrelerinde (Se) daha zayıf bir ekspresyon izlendi. E:60 günlük sıçan testisinde Sertoli (Se) ve Spermatogonyumlarda (Sg) güçlü bir immünoreaktivite, spermatozoidlerde (Ss) ise orta şiddetli bir immünoreaktivite gözlemlendi. F: Negatif kontrol. Bar:50 µm.

4.3.3. Postnatal Sıçan Testisinde BMP Ailesi Proteinlerinin İmmunoreaktivitelerinin Gelişimlerine Göre Değerlendirilmesi

Daha öncesinden UPS proteinleri ailesindeki proteinler için yapılan HSCORE yöntemiyle yapılan değerlendirme BMP2 ve BMP4 proteinleri içinde uygulandı. Bu değerlendirme yapılırken yine hem pozitif immunreaktivite gösteren hücrelerin sayısı hem de immunreaktivitenin yoğunluk dereceleri göz önünde tutuldu. Postnatal günlere göre hücresel yönden yapılan değerlendirme Çizelge 4.3 'de özetlenmiştir. Hem sayısal hem de hücredeki immureaktivitenin yoğunluğunun belirlendiği HSCORE analizi ise Şekil 4.8'de gözlenmektedir.



Şekil 4.8: Gelişmekte olan sıçan testisinde BMP2 ve BMP4'ün karşılaştırmalı H-SCORE değeri: Bu proteinlerin ekspresyonlarında 5 günlükten 60 günlüğe doğru anlamlı bir artış saptanmıştır ($p<0.005$) Bar:50 μ m.

Çizelge 4.3. Sıçan testisinde BMP2 ve BMP4 Lokalizasyonu

Hücre	Protein	0	5	15	30	60
Gs	BMP2	-	+	-	-	-
	BMP4	-	+++	-	-	-
Se	BMP2	-	-	+	+	+
	BMP4	+	+	+++	++	+++
İ	BMP2	-	-	+	+	++
	BMP4	-	-	+	+++	++
Sg	BMP2	-	-	+	+++	+++
	BMP4	-	-	+++	+	+++
Ss	BMP2	-	-	+++	+	+++
	BMP4	-	-	++	+	++
ySt	BMP2	-	-	-	+++	+++
	BMP4	-	-	-	+	+
uSt	BMP2	-	-	-	+	++
	BMP4	-	-	-	++	++

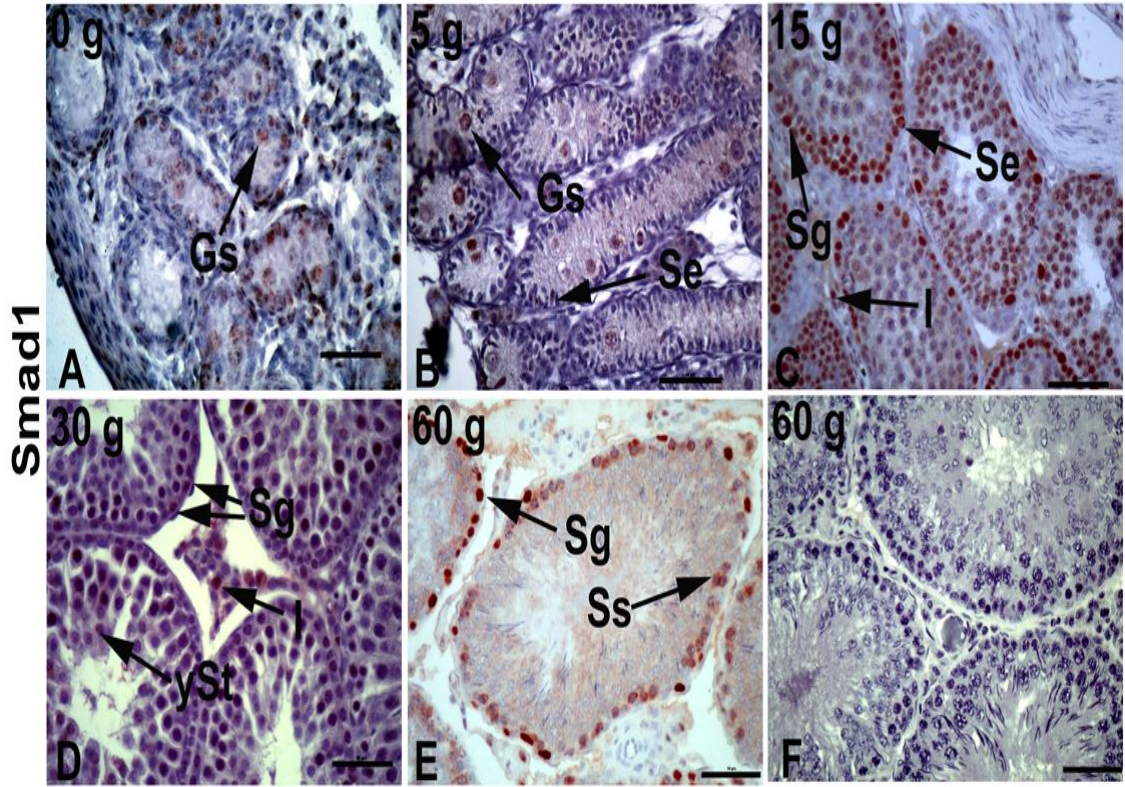
Çizelge 4.3: Gelişmekte olan sıçan testisinde BMP2 ve BMP4 immünreaktif hücrelerinin semikantitatif değerlendirilmesi: Gs: Gonosit, Se: Sertoli hücresi, Sg: Spermatogonyum, Ss: Spermatozoid, ySt: Yuvarlak spermatozoid, uSt: Uzamış spermatozoid, İ: İnterstisyel hücreler. Zayıf immünreaktivite: +, orta şiddetli immünreaktivite: ++, güçlü immünreaktivite: +++

4.4. Postnatal Sıçan Testisinde SMAD (Sma and Mad-related Protein) Ailesi Üyelerinin Ekspresyonları

BMP ailesinin bir alt yolağı olan SMAD ailesine ait proteinlerden sırasıyla SMAD1, 5, 8 ve fosfo-SMAD1/5/8'in immunohistokimyasal lokalizasyonları 0, 5, 15, 30 ve 60 günlük postnatal sıçan testislerinde belirlendi.

4.4.1. SMAD1 ekspresyonunun belirlenmesi

Histolojik takipler yapıldıktan sonra parafine gömülen 0, 5, 15, 30 ve 60 günlük postnatal sıçan testislerinden elde edilen kesitler ile yapılan SMAD1 immünohistokimyası sonucunda bu proteinin gelişmekte olan sıçan testisinde gonosit, Sertoli, spermatogonya, spermatosit ve interstisyel hücreler de lokalize olduğu bulundu. 0. ve 5. günde Sertoli hücreleri ve gonositlerde orta şiddetli ekspresyon gözlenirken, bu proteinin ekspresyonunda 15. günde anlamlı bir artış gözlenmiştir (Şekil 4.9A-B). 15. Günde spermatogonya, Sertoli ve interstisyel hücrelerde şiddetli bir reaksiyon gözlenirken, spermatositlerde orta şiddetli bir immünreaktivite gözlenmiştir (Şekil 4.9C). 30. günde SMAD1 immunoreaktivitesinde 15. güne göre düşüş gözlenirken, en şiddetli SMAD1 immunoreaktivitesi spermatogonyum, interstisyel hücreler ve yuvarlak spermatidlerde bulundu (Şekil 4.9-D). 60. günde ise spermatogonyumlarda ve Sertoli hücrelerinde çok güçlü bir SMAD1 ekspresyonu gözlemlendi.

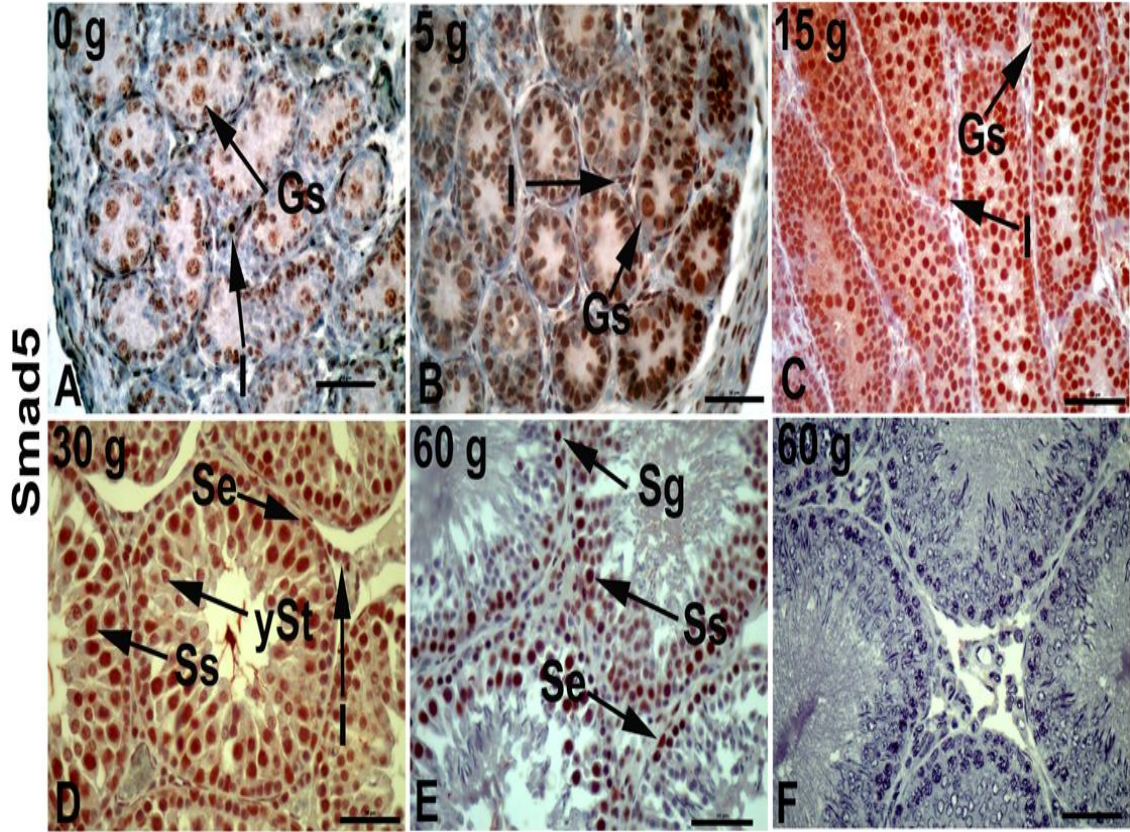


Şekil 4.9. Postnatal 0 (A), 5 (B), 15 (C), 30 (D) ve 60 (E) günlük sıçan testisinde SMAD1 lokalizasyonları: A: 0 günlük sıçan testisinde SMAD1 gonositlerde (Gs) ve Sertoli hücrelerinde (Se) immünoreaktivite göstermiştir. B: 5 günlük sıçan testisinde gonositlerde(Gs) güçlü, Sertoli hücrelerinde ise daha zayıf bir SMAD1 ekspresyonu gözlemlendi. C: 15 günlük sıçan testisinde Sertoli (Se), spermatogonya (Sg) Spermatozoid (Ss) ve interstisyel hücrelerde (I) belirgin immünoreaktivite gözlenmektedir D: 30 günlük sıçan testisinde ise en güçlü immünoreaktivite interstisyel hücrelerde (I) gözlenirken, spermatogonyalarda (Sg), spermatozoidlerde (Ss) ve yuvarlak spermatozoidlerde de ekspresyon gözlemlendi. E:60 günlük ergin sıçan testisinde Sertoli (Se), spermatogonya (Sg) Spermatozoid (Ss) ve Spermatozoidlerde (St) immünoreaktivite gözlemlendi. F: Negatif kontrol. Bar:50 µm.

4.4.2. Postnatal Sıçan Testisinde SMAD5 Ekspresyonunun Belirlenmesi

0, 5, 15, 30 ve 60 günlük postnatal sıçan testislerinden elde edilen kesitler ile yapılan SMAD5 immünohistokimyası sonucunda bu proteinin gelişmekte olan sıçan testisinde gonosit, Sertoli, spermatogonya, spermatozoid, spermatozoid ve interstisyel hücreler de lokalize olduğu bulundu. 0. günde ve 5. günde Sertoli hücreleri ve gonositlerde ekspresyon gözlemlendi (Şekil 4.10A-B). 15. günde spermatogonyum, spermatozoid ve Sertoli hücrelerinin nüklear bölgelerinde yoğun bir ekspresyon gözlemlendi (Şekil 4.10C). 30. günde seminifer tübüldeki hemen hemen bütün hücreler SMAD5 immünoreaktivitesi

gösterdi (Şekil 4.10D). 60. günde ise yine spermatogonya, spermatozoid, Sertoli ve interstisyel hücrelerde nükleer SMAD5 immunoreaktivitesi saptandı (Şekil 4.10E).

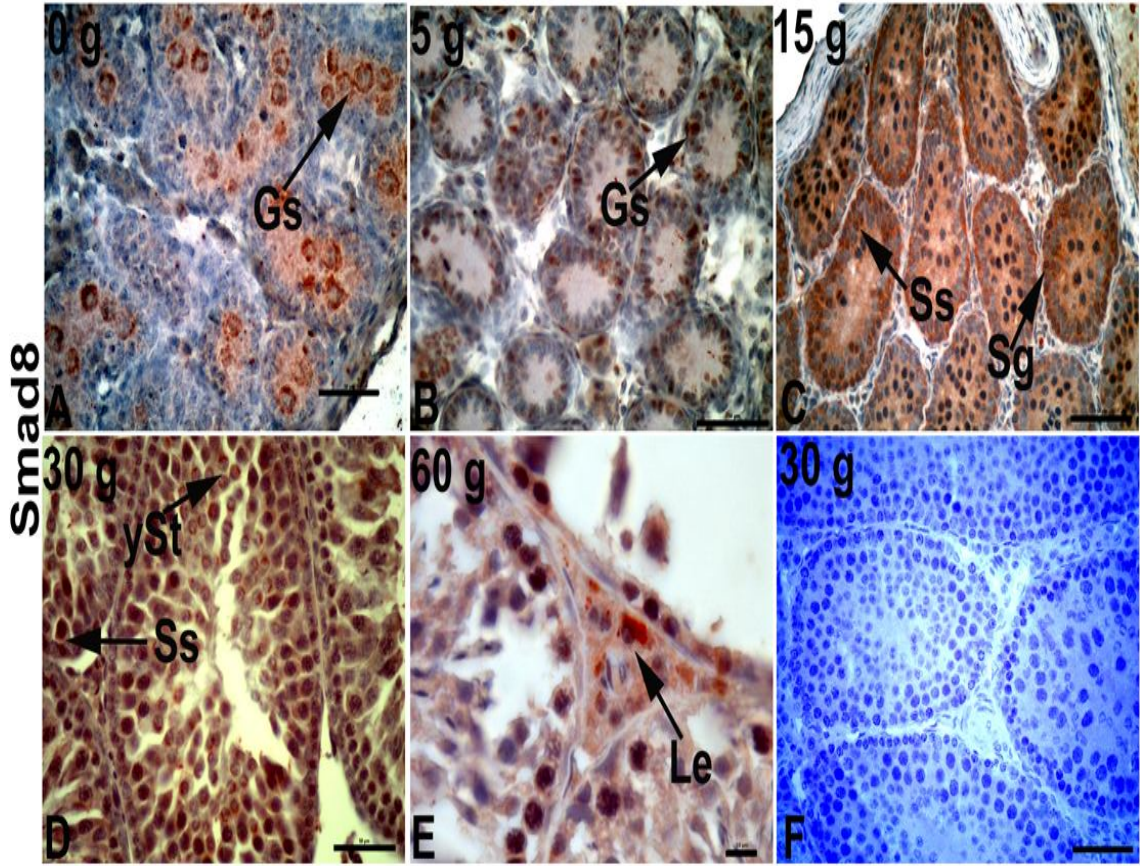


Şekil 4.10. Postnatal 0 (A), 5 (B), 15 (C), 30 (D) ve 60 (E) günlük sıçan testisinde SMAD5 lokalizasyonları: A: 0 günlük sıçan testisinde SMAD5 gonositlerde (Gs), Sertoli hücrelerinde (Se) ve interstisyel hücrelerde (I) immünoreaktivite göstermiştir. B: 5 günlük sıçan testisinde SMAD5 gonositlerde (Gs), Sertoli hücrelerinde (Se) ve interstisyel hücrelerde (I) immünoreaktivite göstermiştir. C: 15 günlük sıçan testisinde spermatogonya (Sg), spermatozoid (Ss) ve interstisyel hücrelerde (I) belirgin SMAD5 immünoreaktivitesi gözlenmektedir. D: 30 günlük sıçan testisinde SMAD5 immünoreaktivitesi spermatogonya (Sg), spermatozoidlerde (Ss) yuvarlak spermatid (ySt) ve Sertoli hücrelerinde (Se) saptandı. E:60 günlük ergin sıçan testisinde Sertoli (Se), spermatogonya (Sg) ve Spermatozoidlerde (Ss) immünoreaktivite gözlemlendi. F: Negatif kontrol. Bar:50 µm.

4.4.3. Postnatal Sıçan Testisinde SMAD8 Ekspresyonunun Belirlenmesi

0, 5, 15, 30 ve 60 günlük postnatal sıçan testislerinden elde edilen kesitler ile yapılan SMAD8 immünohistokimyası sonucunda bu proteinin gelişmekte olan sıçan testisinde gonosit, Sertoli, spermatogonya, spermatozoid ve interstisyel hücreler de lokalize olduğu bulundu (Şekil 4.11). 0. ve 5. günde Sertoli hücreleri ve gonositlerde SMAD8 ekspresyonu saptandı (Şekil 4.11A-B). 15. günde somatik hücrelerin ve

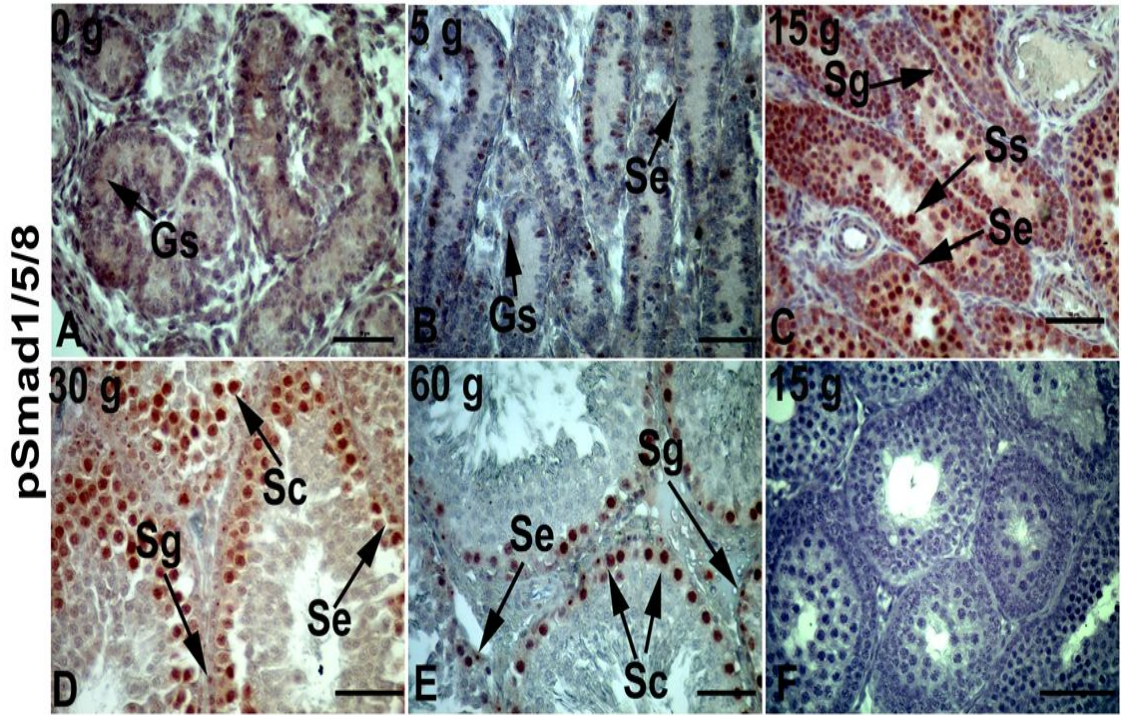
spermatogonyanın sitoplazmik bölgelerinde yoğun bir ekspresyon gözlemlendi (Şekil 4.11C). 30.günde SMAD8'in daha çok spermatogonya da ve daha az olarak spermatositlerde immunoreaktif olduğu bulundu (Şekil 4.11D). 60. günde SMAD 8 ekspresyonunda değişiklik saptandı ve Leydig hücrelerinde çok güçlü bir immunoreaksiyon gösterdiği izlendi (Şekil 4.11E).



Şekil 4.11: Postnatal 0 (A), 5 (B), 15 (C), 30 (D) ve 60 (E) günlük sıçan testisinde SMAD8 lokalizasyonları: **A:** 0 günlük sıçan testisinde SMAD8 gonositlerde (Gs), Sertoli hücrelerinde (Se) ve interstisyel hücrelerde (I) immünoreaktivite göstermiştir. **B:** 5 günlük sıçan testisinde SMAD5 gonositlerde (Gs), Sertoli hücrelerinde (Se) ve interstisyel hücrelerde (I) immünoreaktivite göstermiştir. **C:** 15 günlük sıçan testisinde spermatogonya (Sg) ve interstisyel hücrelerde (I) belirgin immünoreaktivite gözlenmektedir **D:** 30 günlük sıçan testisinde ise en güçlü immünoreaktivite spermatogonya (Sg), spermatositlerde (Ss) ve yuvarlak spermatidlerde (ySt) gözlemlendi. **E:** 60 günlük ergin sıçan testisinde spermatogonya (Sg) ve spermatositlerde (Ss) orta şiddette immünoreaktivite saptanırken, Leydig hücrelerinde (Le) çok şiddetli immünoreaktivite gözlemlendi. **Bar:**10 µm. **F:** Negatif kontrol. **Bar:** 50 µm.

4.4.4. Postnatal Sıçan Testisinde pSMAD1/5/8 Ekspresyonunun Belirlenmesi

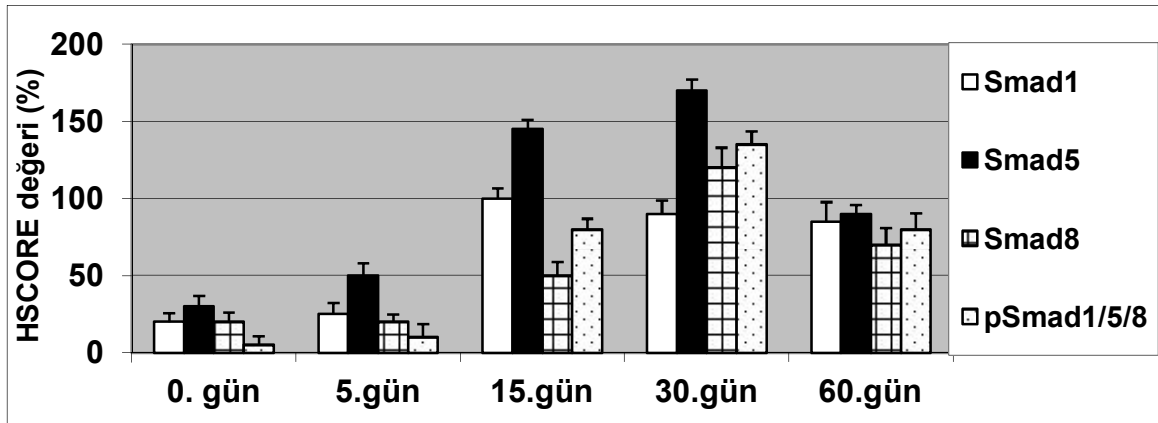
0, 5, 15, 30 ve 60 günlük postnatal sıçan testislerinden elde edilen kesitler ile yapılan pSMAD1/5/8 immünohistokimyası sonucunda bu proteinin gelişmekte olan sıçan testisinde gonosit, Sertoli, spermatogonya, spermatozoid, spermatid ve interstisyel hücrelerde lokalize olduğu bulundu. 0. ve 5. günde çok zayıf bir pSMAD1/5/8 ekspresyonu saptandı (Şekil 4.12A-B). 15. günde somatik hücrelerin, spermatogonyaların nükleer bölgelerinde ki ekspresyonda anlamlı bir artış gözlemlendi ve 30. günde pSMAD1/5/8 immunoreaktivitesinde artış devam etti (Şekil 4.12D). 60. günde, pSMAD1/5/8 immunoreaktivitesi Sertoli, spermatozoid ve spermatogonyanın nükleer bölgelerinde pozitifite gösterdi (Şekil 4.12E).



Şekil 4.12: Postnatal 0(A), 5 (B), 15 (C), 30 (D) ve 60 (E) günlük sıçan testisinde pSMAD1/5/8 lokalizasyonları: A: 0 günlük sıçan testisinde pSMAD1/5/8 gonositlerde (Gs), Sertoli hücrelerinde (Se) çok az şiddetinde immünoreaktivite gösterdi. **B:** 5 günlük sıçan testisinde pSMAD1/5/8 yine gonositlerde (Gs) ve Sertoli hücrelerinde (Se) çok az immünoreaktivite gösterdi. **C:** 15 günlük sıçan testisinde spermatogonya (Sg) ve Sertoli hücrelerinde (Se) orta şiddetli, spermatozoidlerde (Ss) ise daha şiddetli bir nükleer immünoreaktivite gözlenmektedir. **D:** 30 günlük sıçan testisinde ise en güçlü immünoreaktivite spermatozoidlerde (Ss) gözlemlendi. Sertoli ve spermatogonyada daha az bir immünoreaktivite izlendi. **E:** 60 günlük ergin sıçan testisinde pSMAD1/5/8 Sertoli (Se) ve Spermatozoidlerde (Ss) güçlü, spermatogonyada (Sg) orta şiddetli bir nükleer immünoreaktivite gözlemlendi. **F:** Negatif kontrol. **Bar:** 50 µm.

4.4.5. Postnatal Sıçan Testisinde SMAD Ailesi Proteinlerinin İmmunoreaktivitelerinin Gelişimlerine Göre Değerlendirilmesi

SMAD1, SMAD5, SMAD8 ve pSMAD1/5/8 proteinleri için HSCORE yöntemiyle yapılan değerlendirme ile hem pozitif immunreaktivite gösteren hücrelerin sayısı hem de immunreaktivitenin yoğunluk dereceleri göz önünde tutuldu. Postnatal günlere göre hücresel yönden yapılan değerlendirme Çizelge 4.4’de özetlenmiştir. Hem sayısal hem de hücredeki immureaktivitenin yoğunluğunun belirlendiği HSCORE analizi ise Şekil 4.13’de gözlenmektedir.



Şekil 4.13: Gelişmekte olan sıçan testisinde SMAD1, SMAD5, SMAD8 ve pSMAD1/5/8’in karşılaştırmalı H-SCORE değeri: Bu proteinlerin ekspresyonlarında 15. ve 30. günlerde anlamlı bir artış saptanmıştır ($p < 0.005$) Bar:50 μ m.

Çizelge 4.4. Sıçan testisinde SMAD1, SMAD5, SMAD8 ve pSMAD1/5/8 Lokalizasyonu

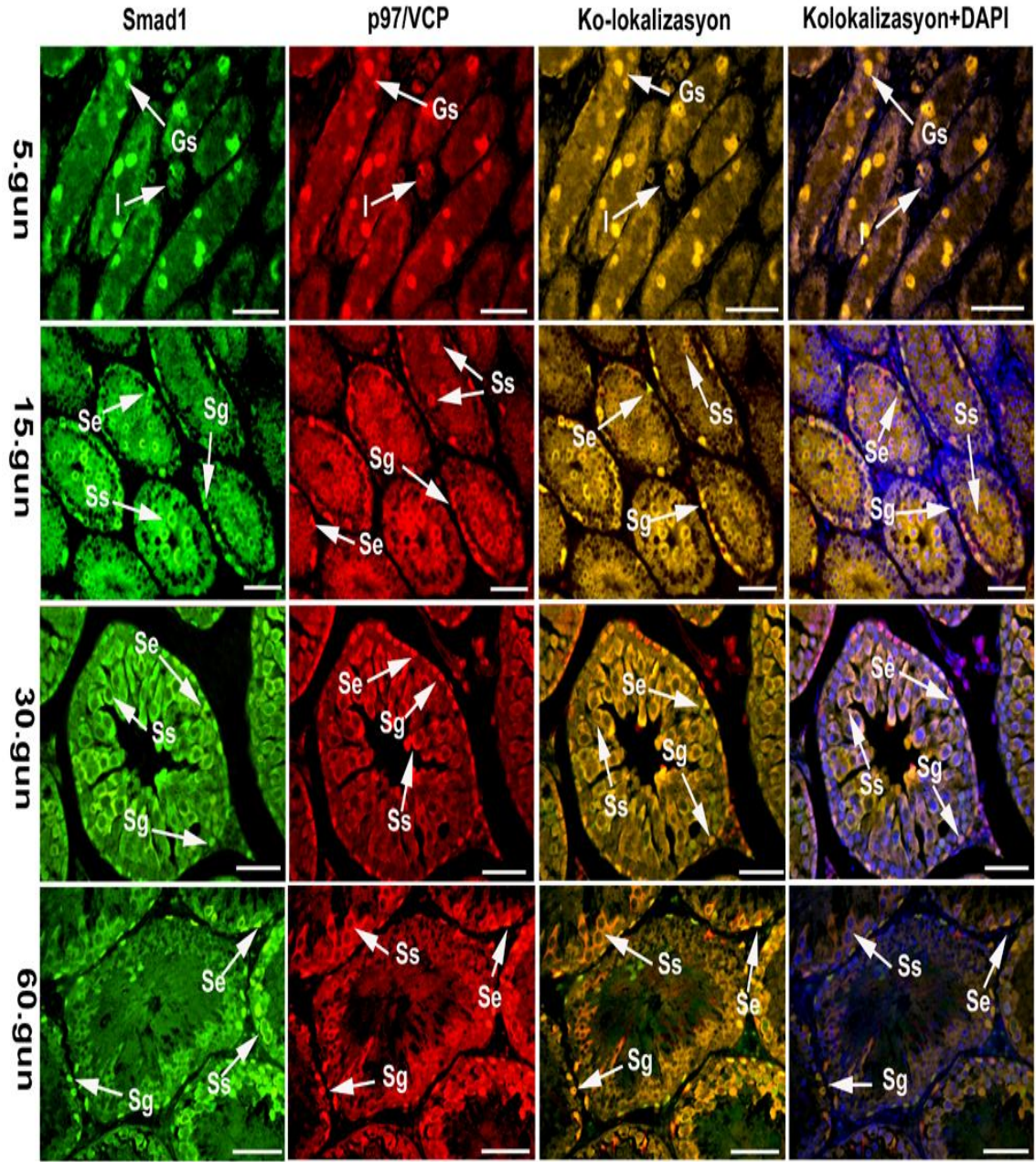
Hücre	Protein	0	5	15	30	60
Gs	SMAD1	++	+++	-	-	-
	SMAD5	+++	+++	-	-	-
	SMAD8	+++	+++	-	-	-
	pSMAD1/5/8	+	+	-	-	-
Se	SMAD1	+	++	+	+	++
	SMAD5	++	++	++	++	++
	SMAD8	++	++	++	++	+
	pSMAD1/5/8	+	+	++	++	+++
İ	SMAD1	-	-	++	+++	+
	SMAD5	+++	+++	++	++	++
	SMAD8	+	+	+	++	+++
	pSMAD1/5/8	-	-	++	+	+
Sg	SMAD1	-	-	+++	+	+++
	SMAD5	-	-	+++	+++	+++
	SMAD8	-	-	+++	+++	++
	pSMAD1/5/8	-	-	++	++	++
Ss	SMAD1	-	-	++	++	++
	SMAD5	-	-	+++	+++	+++
	SMAD8	-	-	++	+++	++
	pSMAD1/5/8	-	-	+++	+++	+++
ySt	SMAD1	-	-	-	+	+
	SMAD5	-	-	-	++	++
	SMAD8	-	-	-	+++	++
	pSMAD1/5/8	-	-	-	-	-
uSt	SMAD1	-	-	-	-	-
	SMAD5	-	-	-	+	+
	SMAD8	-	-	-	+	-
	pSMAD1/5/8	-	-	-	-	-

Çizelge 4.4: Gelişmekte olan sıçan testisinde SMAD1, SMAD5, SMAD8 ve pSMAD1/5/8 immünreaktif hücrelerin semikantitatif değerlendirilmesi: Gs: Gonosit, Se: Sertoli hücresi, Sg: Spermatogonyum, Ss: Spermatozoid, ySt: Yuvarlak spermatozoid, uSt: Uzamış spermatozoid, İ: İnterstisyel hücreler. Zayıf immünoreaktivite: +, orta şiddetli immünoreaktivite: ++, güçlü immünoreaktivite: +++

4.5. Postnatal sıçan testisinde SMAD1 ve p97/VCP Proteinlerinin Birlikte Lokalizasyonlarının Belirlenmesi

Tezimin bu başamağına kadarki çalışmalarında UPS proteinleri (p97/VCP, Jab1/CSN5, Übikütin) ve BMP ailesi proteinlerinin (BMP2, BMP4 ve SMAD'lar) postnatal sıçan testisinde hücresel olarak lokalizasyonları değerlendirildi. Tezimin ikinci başamağında ise, bu iki ailedeki proteinlerin birbirleriyle etkileşimde olup olmadığını anlamak amacıyla bu proteinlerin aynı hücrede birlikte ekspresyonlarına (kolokalizasyonları) bakıldı. Öncelikle yaptığımız kolokalizasyon çalışmalarında UPS proteinleri ile BMP ailesinden BMP2 ve BMP4'ün aynı hücrenin aynı bölgesinde kolokalize olmadığı saptandı. Bu nedenle UPS proteinleri ile SMAD'ların kolokalizasyonu üzerinde çalışmalar yapıldı ve p97/VCP ile SMAD1'in bazı hücre bölümlerinde kolokalize olduğu saptandı.

p97/VCP ve SMAD1'in birlikte lokalizasyonlarını belirlemek amacıyla, p97/VCP proteini kırmızı renk floresan renk veren rhodamine, SMAD1 proteini ise yeşil renk veren FITC ile işaretlendi (Şekil 4.14). Testiküler tübüldeki bazı hücrelerde her iki proteininde pozitif immunoreaktivite verdiği alanlar kırmızı ve yeşilin birleşmesiyle sarı renkli olarak görüntülendi. Hücre nükleuslarını görüntülemek amacıyla ise nüklear boya olan DAPI kullanıldı.



Şekil 4.14: Postnatal sıçan testisinde SMAD1 ve p97/VCP proteinlerinin birlikte lokalizasyonlarının belirlenmesi: SMAD1 proteini yeşil floresan veren FITC ile işaretlenirken, p97/VCP proteini kırmızı floresan veren rhodamine ile işaretlendi. Her iki proteinin birlikte lokalizasyonunu gösteren kırmızı ve yeşilin birleşmesi ile sarı renkli hem SMAD1 hem de p97/VCP pozitif hücreler üçüncü kolonda görülmektedir. Hücre DNA' sını boyayan floresan DAPI ile ise kolokalize proteinlerin mavi renkli çekirdek boyanmaları izlenmektedir. En belirgin kolokalizasyon Sertoli (Se), Spermatozoid (Ss) ve Spermatozoid (Sg)'da gözlenmektedir. **Bar:** 50 µm.

4.6. İnsan Sperminde Übikütün Proteazom Sistemi Proteinlerinin Belirlenmesi

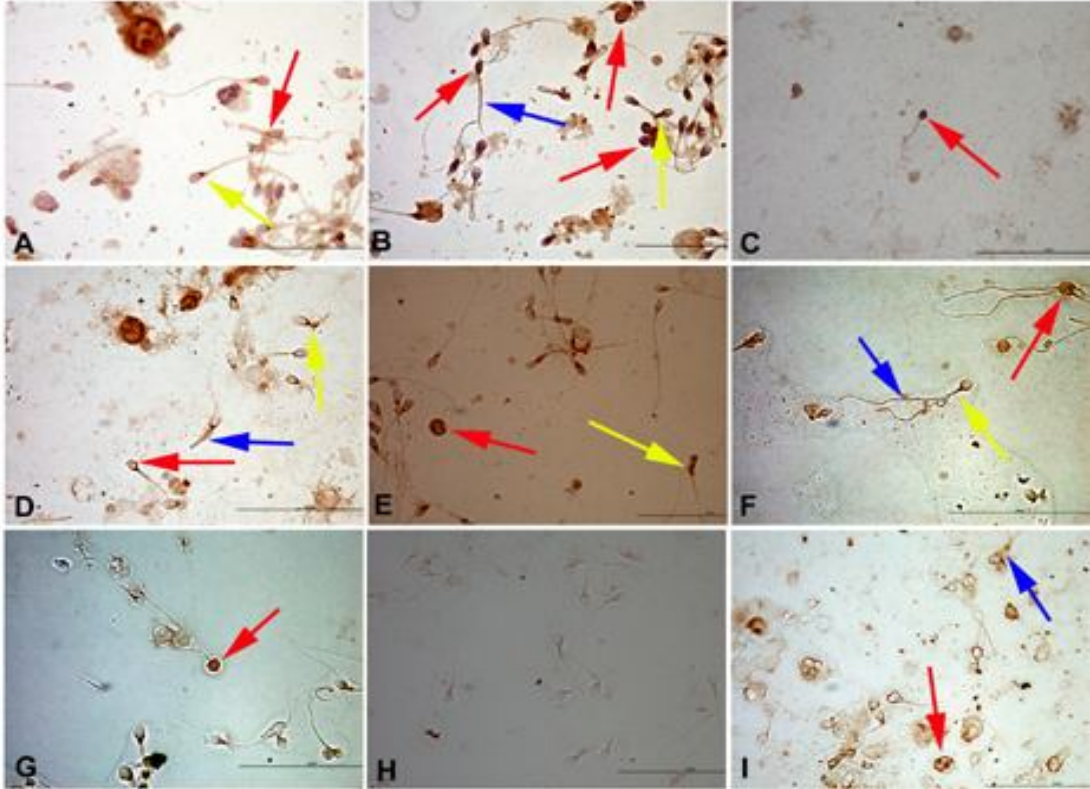
Tezimde semen analizi için üniversitemiz androloji laboratuvarına başvuran 10 fertil (grup 1) and 10 infertil (grup 2) erkekten alınan semenler standart WHO (Dünya Sağlık Örgütü) kriterlere göre analiz edildi. Kruger strict morfolojisi fertil ve infertil hastalardan alınan spermler üzerinde yapıldı (ortalama 200 sperm/birey) ve normal spermlerin % değerleri ifade edildi (Çizelge 4.5). Gruplara ait sperm yayma preparatlarına p97/VCP ve übikütün ekspresyonunun değerlendirilmesi için, immünohistokimya uygulandı. Übikütün ve p97/VCP'nin immunoreaktivitesi insan sperminin baş , kuyruk ve orta parçasında görüldü.

Çizelge 4.5: Fertil ve İnfertil bireylere ait semen analizi sonuçları

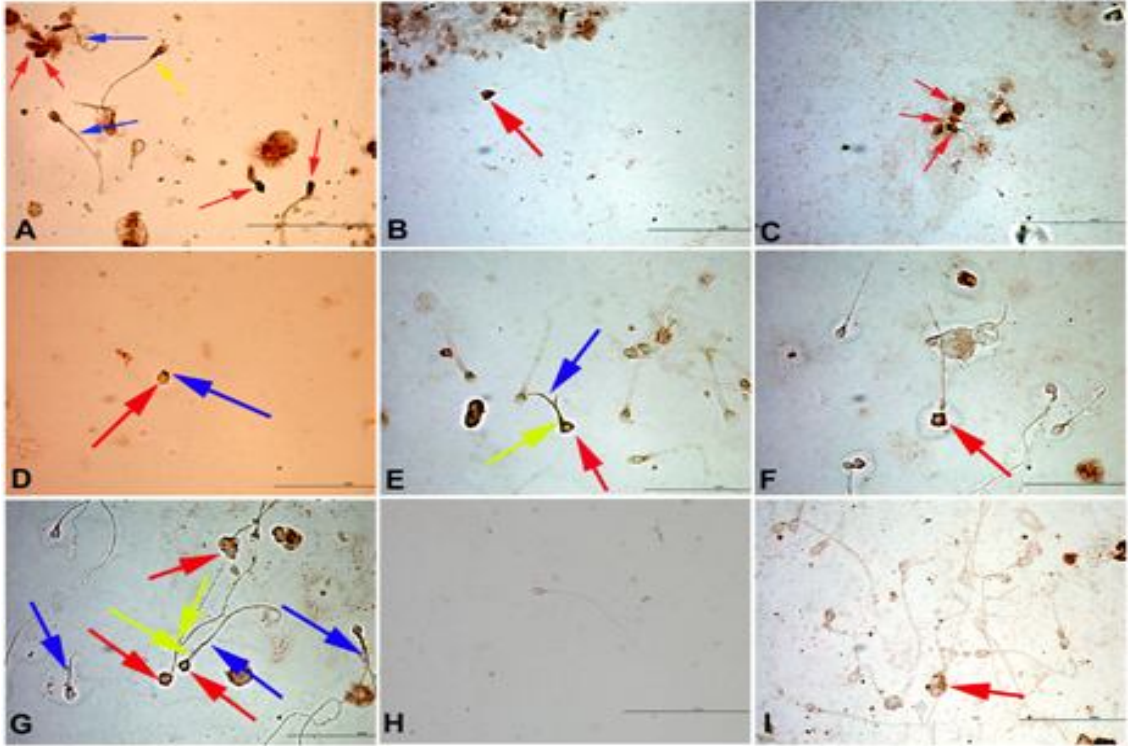
	FERTİL	İNFERTİL
Sperm konsantrasyonu (x10⁶)	132,6	32,6
Motilite (%)	68,7	33,7
İleri motil sperm (%)	62,2	25,5
Normal morfoloji(%)	91	58
Yaş	29,2	28,8
Ejakulat volümü (ml)	3,27	2,8

4.6.1. İnsan Sperminde p97/VCP ve Übikütün Ekspresyonunun Belirlenmesi

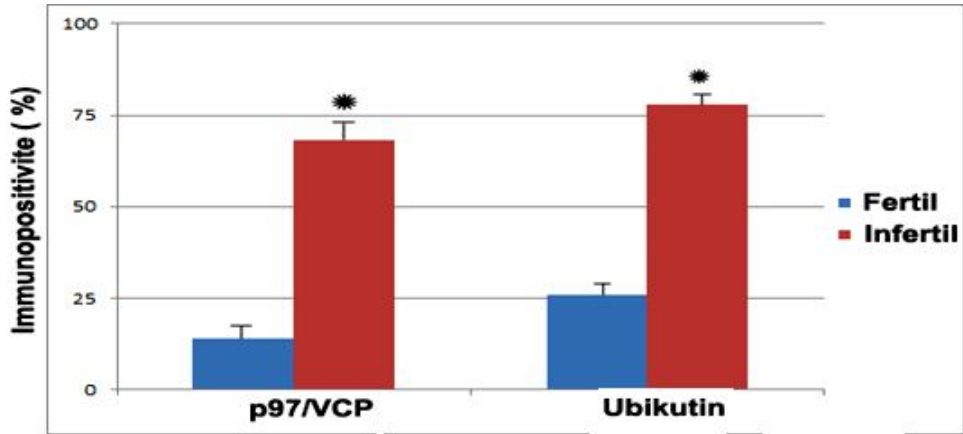
Sperm yayma preparatlarına p97/VCP ve übikütün ekspresyonunun değerlendirilmesi için immünohistokimya uygulandı. p97/VCP immunoreaktivitesi ise baş ve kuyruk bölgelerinde belirlenmiştir (Şekil 4.15). Übikütün immunoreaktivitesi, sperm orta parçası, sitoplazmik tutulumlar ve baş bölgesinde gözlemlendi (4.16). Özellikle, morfolojik olarak anormal başlı spermelerde übikütün pozitifitesi en yoğun olarak saptanmıştır. Fertil ve infertil bireylerin semen örneklerinden elde edilen örneklerdeki übikütün ve p97/VCP immunoreaktivitesi arasında anlamlı bir fark gözlemlenmiştir ($p < 0,05$) (Şekil 4.17). Her iki proteininde infertil bireylerde fertillere göre yüksek pozitifite gösterdiği saptanmıştır.



Şekil 4.15. İnsan sperminde p97/VCP lokalizasyonu: A-B-C-D-E-F ve G infertil bireylere, H ve I ise fertil bireylere ait spermere ait p97/VCP lokalizasyonlarını göstermektedir. **Sarı ok:** Orta parça **Kırmızı ok:** Baş **Mavi ok:** Kuyruk



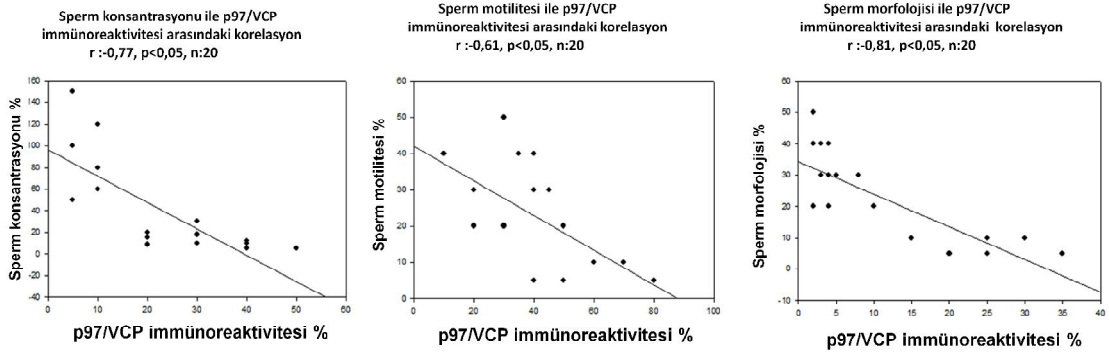
Şekil 4.16. İnsan sperminde übikütün lokalizasyonu: A-B-C-D-E-F ve G infertil bireylere, H ve I ise fertil bireylerin spermelerine ait übikütün lokalizasyonlarını göstermektedir. **Sarı ok:** Orta parça **Kırmızı ok:** Baş **Mavi ok:** Kuyruk



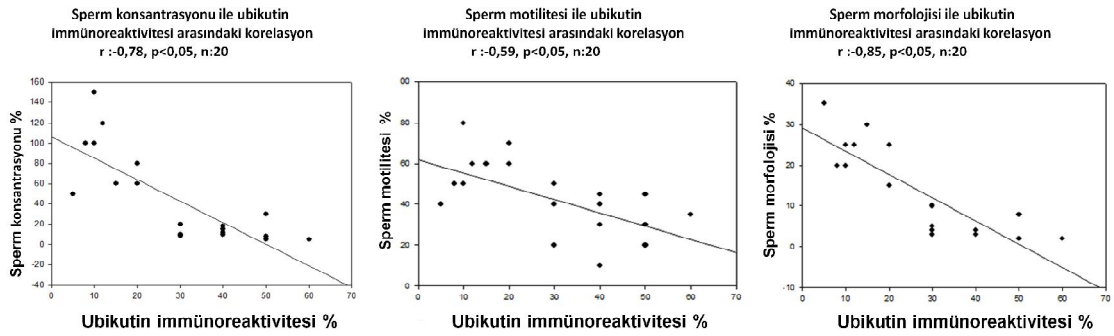
Şekil 4.17. Fertil ve infertil bireylerdeki übikütün ve p97/VCP' nin karşılaştırmalı değerleri: Fertil ve infertil bireylerdeki übikütün ve p97/VCP immunoreaktivite yüzdesi arasında anlamlı derecede fark saptanmıştır.

4.6.2. p97/VCP ve Übikütün Ekspresyonlarının Semen parametreleri ile korelasyonu

Semen parametreleri ile p97/VCP ve übikütün immunoreaktiviteleri arasında bir ilişki olup olmadığını saptamak amacıyla, tüm parametrelerin yüzdeleri ile, p97/VCP ve übikütün immunoreaktivite yüzdeleri arasında Pearson korelasyonuna bakıldı. p97/VCP (Şekil 4.18) ve übikütün (Şekil 4.19) immunoreaktivite yüzdeleri, sperm konsantrasyonu, motilitesi ve sperm normal morfolojisi ile negatif korelasyon gösterdiği saptandı..



Şekil 4.18. p97/VCP'nin insan sperm konsantrasyonu, motilitesi ve morfolojisi ile olan ilişkisi: p97/VCP, insan sperm konsantrasyonu, motilitesi ve morfolojisi ile negatif olarak korelasyon göstermektedir.



Şekil 4.19. Übikütünün insan sperm konsantrasyonu, motilitesi ve morfolojisi ile olan ilişkisi: Übikütünün insan sperm konsantrasyonu, motilitesi ve morfolojisi ile negatif olarak korelasyon göstermektedir.

SONUÇ ve TARTIŞMA

Tezimde, postnatal gelişmekte olan testis dokusunda, UPS proteinleri ile TGF- β /Smad sinyal yolağına ait bazı proteinleri ve bunların birlikte ekspresyonları gösterildi. Ayrıca insan spermide de UPS proteinlerinin fertil ve infertil olgularda farklı şiddetlerde ekspre edildikleri saptandı. Bu sonuçların tümü düşünüldüğünde ve literatür karşılaştırıldığında tezimin orijinal bulgular içerdiği anlaşılmaktadır. Bu çalışmaların yanısıra immunohistokimya ve immunofloresan metodları da kullanılmıştır.

Sonuçlarımız UPS proteinlerinden, p97/VCP, Jab1/CSN5 ve übikütinin 0, 5, 15, 30 ve 60 günlük testislerde gonosit, Sertoli hücreleri, spermatogonya, spermatosit, spermatidler ve testiküler epitelyal hücrelerinde ekspre edildiklerini göstermiştir. p97/VCP, Jab1/CSN5 ve übikütinin hangi hücrelerde ekspre edildiğinin önemli bir bulgu olabileceği düşüncesiyle bu proteinlerin özellikle hangi hücrelerde ekspre edildiği araştırıldı. 5 günlük sıçan testisinde, UPS proteinlerinin gonositlerde ekspresyonunun diğer günlere göre daha az olduğu saptandı. Bu proteinlerin bu kadar erken gelişim döneminde fonksiyonlarının henüz belirgin olmadığını ya da az olduğunu göstermektedir. Fakat 5. günden sonra UPS proteinlerindeki ekspresyon birden artış görüldü ve 30. günde en yüksek seviyelere ulaştı. Daha önceki çalışmalar postnatal 4. günden 30. güne kadar sıçan testis ve epididimisinde hızlı bir proliferasyonun ve büyümenin olduğuna işaret etmektedir (Clermont ve Peley, 1957). p97/VCP, Jab1/CSN5 ve übikütinin ekspresyonlarında da testiküler büyümeye paralel olarak görülen bu artış, p97/VCP, Jab1/CSN5 ve übikütinin testis gelişimi için gerekli olabilecek proteinler arasında olduğunu vurgulamaktadır. Gerçekten de literatüre bakıldığında, Jab1/CSN5'in hücre büyümesi için temel bir protein olduğu ve hızlı büyüme ile ilişkisi gösterilmiştir (Bounpheng ve ark., 2000).

Postnatal gelişim boyunca, sıçan testisi çeşitli gelişimsel basamakları gösterir (Malkov ve ark., 1998). Postnatal 0-5. günlerde, testiküler tübüller sadece gonosit ve somatik hücrelerden oluşmuştur. 6-7. günlerde, spermatogonyumlar görülmeye başlar. 13-23.günlerde, spermatositler belirir ve 24-25. günlerde yuvarlak spermatidler ortaya çıkarlar. 30. günde uzamış spermatidler ve 36. günde uzamış spermatozoalar testis tübüllerinde gözlenir (Malkov ve ark., 1998). p97/VCP, Jab1/CSN5 ve übikütinin

yukarıda saydığımız tüm basamaklarda görülmesi bu proteinlerin gelişmekte olan testis için önemlerini vurgulamaktadır. Örneğin: p97/VCP, Jab1/CSN5 ve übikütinin yuvarlak ve uzamış spermatidlerde görülmesi, bu proteinlerin akrozom ve spermin kuyruk gelişimi ile ilgili bir fonksiyonunun olabileceğini aklımıza getirmektedir. Ayrıca bu proteinlerin olgunlaşan spermatozoidlerde görülmeleri yine bu proteinlerin spermatozoid gelişimi için gerekli proteinler olabileceğini göstermektedir.

Sertoli hücreleri ile yapılan ultrastruktural çalışmalar sonucunda sitoplazmalarında birçok fagositik vakuollerin bulunduğunu göstermiştir (Hutchison ve ark., 2008). Sertoli hücrelerinin spermatogenez boyunca germ hücrelerinin sitoplazmik artıklarını fagosite ettikleri bilinmektedir (Russell ve ark., 1983; Sakai ve ark., 1988). p97/VCP'nin ise, otofagozom maturasyonunda görev yaptığı gösterilmiştir (Dai ve Li, 2001; Meusser ve ark., 2005). Fakat ilk olarak bizim çalışmalarımızla, p97/VCP'nin Sertoli hücrelerindeki varlığı belirlenmiştir. Tezim fonksiyonel deneyler içermediği için, p97/VCP'nin Sertoli hücresinde ne gibi fonksiyon gösterdiğini belirlenememiştir. Fakat p97/VCP'nin Sertoli hücresinde übikütinlenmiş substratların yıkımı için gerekli bir protein olduğu muhtemeldir.

Spermatogenezin düzenlenmesinde çeşitli sinyal molekülleri ve çoklu-sinyal yolları vardır. Moleküler mekanizmanın özellikle sinyal moleküllerinin ve yolların tam olarak anlaşılması spermatogenez düzenlenmesinde gereklidir ve erkek infertilitesi için yeni tedavi yöntemleri sunarak önemli etkilere sahiptir. SMAD sinyal yolağı insan embriyonik kök hücrelerin korunmasında ve ortaya çıkabilecek birden fazla potansiyel sonuç olması durumunda gereklidir (Cayli ve ark.,2011). Bu bağlamda öncelikle, SMAD1 protein ve mesajcı RNA (mRNA)'nın çeşitli boyama yoğunluğuna sahip fare ve sıçan testisinin Sertoli hücrelerinin yanı sıra germ hücrelerindeki varlığında rapor edilmiştir. Bu gözlemler doğrultusunda tezimde 0, 5, 15, 30 ve 60 günlük sıçan testisinde Smad1, Smad5, Smad8 ve p-Smad1/5/8'in gonosit, spermatogonya, spermatozoid, Sertoli hücreleri ve bazı interstisyel hücrelerde lokalize olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, yetişkin testisindeki yuvarlak ve uzun spermatidlerde SMAD1 ve p-SMAD1/5/8 proteininin negatif immünreaktivitesi olduğu görülmüştür. Dahası p-SMAD1/5/8 pozitif immünboyanması çoğunlukla nükleusta lokalize olmuştur

ancak SMAD1 immünboyanma hem nükleusta hem de sitoplazmada belirtilmiştir ki bu aktif SMAD1 kompleksinin sıçan testis postnatal gelişim aşamalarında fosforilasyon üzerinden nükleusa transloke olduğunu göstermektedir.

Son çalışmalar TGF β -BMP sinyal yolağı için çeşitli proteinlerin SMAD'larla etkileşimde olduğunu göstermiştir (Wotton ve ark.,1999). Bu regülatörlerden bazıları SMAD sinyalizasyonunda aktif olabilirken Ski, Evi-1 ve TGIF başkılıyıcı SMAD'lar olarak tanımlanmıştır. Aynı zamanda TGF- β sinyalizasyonunun SMAD proteinlerinin sirkülasyonu ile düzenlendiğini de göstermiştir. Smurf1 ve Smurf 2'nin her ikisi de SMAD ubiquitinasyonu ve degradasyonu için ubiquitin ligaz olarak tanımlanmıştır (Ebisawa ve ark., 2001; Lin ve ark., 2000). Dahası SMAD1'in bir proteozomal substrat olduğu ve de degradasyonunun BMP' ler tarafından indüklendiği gösterilmiştir. Bu çalışmalardan, SMAD1'in birçok tanımlanmış etkileşen partnerlerinin varlığı açıkça anlaşılmaktadır. Ancak, sıçan testisinde SMAD1 protein ekspresyonunu kontrol edebilen başka regülatör proteinlerin olup olmadığı bilinmemektedir.

Bu çalışmada postnatal testiste SMAD1'in p97/VCP ile etkileşimine dair kanıt sağladık ki bu etkileşim TGF- β /BMP sinyal yolağının düzenlenmesi için önemli fonksiyonlara sahiptir. Tezimde postnatal sıçan testisinde ko-lokalizasyon deneyleri SMAD1 ve p97/VCP'nin birlikte ekspresyonunun gonositlerde, spermatogonyonyada, spermatisitlerde ve Sertoli hücrelerinde olduğunu göstermiştir. Etkileşimin biyolojik önemi açıklamak amacıyla, SMAD1-p97/VCP etkileşim mekanizmasının gelecekte araştırılması gerekmektedir. Tezim harici bu konuyla ilgili yaptığımız çalışmalarda gerçekten SMAD1-p97/VCP kolokalizasyonuna ek olarak bu iki proteinin birbirine bağlandığı da yapılan ko-immunopresipitasyon çalışmalarıyla belirlendi (Cayli ve ark.,2011).

Başlangıçta p97/VCP, UPS'de çalışan şaperon bir protein olarak gösterildi (Dai ve ark, 2000). p97/VCP ubiquitinlenmiş proteinlere bağlanır ve onları proteozoma taşır. Aynı zamanda p97/VCP'nin nükleer faktör κ B inhibitör, IP3 reseptörleri, α -T hücre reseptör, δ -CD3, kaspaz 3 ve 7, p53, and siklin B1 gibi çeşitli proteinlerin degradasyonuna katıldığı da iyi bilinmektedir. p97/VCP ekspresyonu yapmış olduğumuz başka

çalışmalarımızda testisin yanı sıra çeşitli dokularda saptandı. Tezimin, SMAD1 ve p97/VCP arasındaki etkileşimi göstermesinden dolayı, SMAD1'in p97/VCP için yeni tanımlanan bir subssıçan olduğu ve ubikitinlenmiş SMAD1'in p97/VCP vasıtasıyla proteozoma transfer olabileceği mümkündür. Ayrıca, tezim ve tezime paralel olarak yaptığımız çalışmalar SMAD1-p97/VCP etkileşiminin özgüllüğünü de test etmiştir. Çalışmalarımızda, p97/VCP'nin diğer SMAD'larla etkileşiminin olup olmadığından şüphelendik. Yayınlanmamış çalışmalarımıza ait sahip olduğumuz ilk veriler p97/VCP için SMAD4'ün hedef bir subsratı olduğunu fakat SMAD2'nin olmadığını ileri sürmektedir.

İlginçtir ki, Jab1/CSN SMAD4 ve SMAD7 degradasyonuna katılarak TGF- β sinyalizasyonunda bir regülatör olarak gösterilmiştir (Kim ve ark., 2004; Wan ve ark., 2002) fakat SMAD1 ile olan etkileşimi gösterilememiştir. Jab1/CSN5'in ekspresyonunun dışarıdan artırılmasıyla endojen SMAD4'ün sitoplazmik ekspresyonunda azalmalar görüldüğü ve SMAD4'ün ubikitinlenerek uyarıldığı ki bu durumun da TGF- β uyarılı gen transkripsiyonu inhibe eden sonuçlara yol açtığı rapor edilmiştir. Buna zıt olarak, Jab1/CSN5 insan karsinom hücrelerinde SMAD7'ye bağlanıp ve SMAD7 degradasyonunu teşvik ettiği ve de TGF- β 1 sinyalizasyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Bu çalışmalar ışığında, Jab1/CSN5'in p97/VCP ile birlikte SMAD protein ekspresyonlarını etkileyerek TGF- β sinyalizasyonunu regüle edebilmesi mümkündür. Tezimdeki bulguların bir kısmı, p97/VCP ve BMP yolakları arasında bir bağlantı olduğunu destekler ki bu durum SMAD1 ekspresyonunun p97/VCP ile kontrol edilebileceğini ileri sürmektedir. Gelecekteki çalışmalarımız gelişmekte olan sıçan testisinde bu etkileşimin fizyolojik rolünü netleştirmek için gerekli olacaktır.

Çalışmalarımızda BMP2 proteini 0. günde ekspresyon göstermezken 5. günden itibaren 60. güne doğru anlamlı bir artış göstermiştir. BMP4 ekspresyonunda da 0. günden 60. güne doğru kademeli bir artış gözlenmektedir. Bu sonuçların BMP2 ve BMP4'ün testiküler gelişimde gerekli proteinler olduğunu düşündürmektedir. Tezimdeki bulgularla uyumlu olarak literatürde BMP2 ve BMP4'ün juvenil spermatogonyal proliferasyonu artırdığı (Pellegrini ve ark., 2003; Puglisi ve ark., 2004) ve BMP4'ün spermatogonyal farklılaşmayı etkileyebileceği bildirilmiştir (Pellegrini ve ark., 2003;

Baleato ve ark., 2005). Tezimdeki sonuçlar, BMP2 ekspresyonu ve daha fazla olarak BMP4 ekspresyonunun 15. ve 30. günlerde artış gösterdiğini ve bu artışın 60. günde de devam ettiğini kanıtlamaktadır. Yine başka bir çalışmada BMP4'ün yetişkin spermatogenezin tam olarak sürdürebilmesi için ihtiyaç duyulan bir protein olduğunu bildirmiştir (Zhao ve ark., 1996, Hu ve ark., 2004). Bu bulgulara uyumlu olarak sonuçlarımda, BMP4 BMP2'ye göre daha erken bir dönemden (0. günden) başlayarak ekspre olmuştur. BMP4'ün yokluğunun embriyonik ölüm ile sonuçlanabileceği ve de yine bu ligandın eksikliğinin postnatal testis gelişimi ve spermatogenezini engellediği bildirilmiştir (Winnier ve ark., 1995; Dudley ve ark., 1995).

Yapılan son çalışmalar, Smad1, Smad5 ve Smad8'in BMP ortaklı sinyal iletimi olaylarında farklı açılardan rol oynadığını göstermiştir. Bu üç proteinin ekspresyonlarının yetişkin testisin germ hücrelerinin gelişmesinde kademeli olarak arttığı literatürde gösterilmiştir (Itman ve ark., 2008). BMP4 R-SMAD'ların fosforilasyonuna ve nükleer akümülyasyonuna neden olur (Aoki ve ark., 2001). BMP'ler ve postnatal germ hücreleri arasında direk bir korelasyon olduğu, SMAD1 ve SMAD5 yokluğunda postnatal germ hücre popülasyonunda önemli bir azalma olduğu ve buna bağlı olarak SMAD1 ve SMAD5'in postnatal germ hücre yaşamı için gerekli olduğu literatürde bildirilmiştir (Chang ve ark., 2001; Tremblay ve ark., 2001; Arnold ve ark., 2006). SMAD8'in eksikliğinde testiste somatik hücrelerde ve spermatogonyada SMAD8 ortaklı sinyal iletiminde azalma olduğu ve bu ligandın yetişkin testis için gerekli olduğu gösterilmiştir (Arnold ve ark., 2006). Arnold ve ark., (2006) pSMAD1/5/8'in geniş bir aralıkta ekspre edilmesinin bu ligandın R-SMAD-sinyal yolağının eksikliğinde ya da postnatal testis gelişimi için maksimum bir sinyal aktivasyonuna ihtiyaç duyulduğu zaman R-SMAD'lar tarafından regüle edildiğini bildirmişlerdir. Bizim sonuçlarımızda bu bulgulara uyumlu olarak 0. günden 60. güne kadar ki postnatal testis gelişiminde SMAD1, SMAD5, SMAD8 ve pSMAD1/5/8'in önemli miktarlarda ekspre edildiğini göstermektedir. Bu proteinlerin 15. günde anlamlı bir artış göstermesi ve bu artışın 30. günde de devam etmesi bu proteinlerin germ hücre gelişiminde etkili olduklarını göstermektedir.

BMP sinyal yolağının bir özelliği de seçici SMAD kullanımı olduğundan, SMAD proteinlerin sentezi BMP sinyal iletimini etkiler. Itman ve ark., (2008) yaptıkları çalışmada olgunlaşmamış Sertoli hücresi ve spermatogonya hücre kültürüne, BMP2 ve BMP4 eklenmesi ile SMAD1, SMAD5 ve SMAD8 ekspresyonlarının arttığını ve bu sonuca dayalı olarak da Sertoli hücresi ve spermatogonyal hücrelerin gelişimi için bu ligandların önemli bir rol oynadıklarını rapor etmişlerdir.

Tezimde, gelişmekte olan testis dokularına ek olarak, androloji laboratuvarımıza gelen erkek hastalara ait semen örneklerinde de UPS proteinlerinden p97/VCP ve übikütinin ekspresyonları değerlendirildi. Erkek infertilitesinde semenin değerlendirilmesi ışık mikroskobu altında sperm sayısı, morfolojisi ve motilitesinin ölçümlerine dayanır ve bu ölçümler infertilite tedavisi görmek isteyen çiftler için kliniksel bilgi sağlar (Guzick ve ark., 2001). Fakat klinik semen parametreleri ve fertilité arasındaki korelasyon düşük seviyededir (Amann ve ark., 1989). Bu yüzden semenin değerlendirilmesi için ek objektif belirteçler aranmaktadır. Übikütin, 8,5 kDa lık bir proteindir ve kovalent olarak birbirine bağı poliübikütin zincirleri ile işaretlenmiş proteinler proteolitik yıkım için proteazoma hedeflenir (Dai ve ark.,2001). p97/VCP (Valosin-containing protein), poliübikütinlenmiş proteinleri proteazoma taşıyan bir şaperondur (Dai ve ark.,2001). Übikütinlenmiş proteinlerin, erkek genital kanallarından biri olan epididimide elimine edildiğini gösteren çalışmalar vardır (Sutovsky ve ark., 2001; Sutovsky ve ark., 2003). Sutovsky ve ark., (2004)'ları yaptıkları çalışmada artmış sperm Übikütin ekspresyonunun sperm sayısı, hareketlilik ve normal morfoloji yüzdesi ile ters ilişkili olduğunu ve bu sonuca dayalı olarak erkek sperm kalitesinde übikütinin bir biyolojik belirteç gibi kullanabileceğini göstermişlerdir.

Fakat, bugüne kadar semen parametreleri ile p97/VCP ve Übikütin ekspresyonları arasındaki ilişki belirlenmemiştir. Bu nedenle, bu çalışmada fertil ve infertil bireylerde, sperm übikütin ve p97/VCP immunopositivite ile sperm morfolojisi, sperm konsantrasyonu ve motilitesi arasında bir ilişki olup olmadığı araştırıldı. p97/VCP ve übikütin immunoreaktivite yüzdelerinin, sperm konsantrasyonu, motilitesi ve sperm normal morfolojisi ile negatif korelasyon gösterdiği saptandı.

Übikütin ve übikütin benzeri proteinler substratların yıkılmasını kontrol eder. Übikütinlenmiş substratlar lizozoma ya da proteozomal degradasyon bölgelerine hedeflenirler. Substratlara bağlanan übikütin molekülünün sayısı, pozisyonu ve de poliübikütin zincirlerindeki übikütin molekülünün pozisyonu übikütin ortaklı proteolizin spesifitesini belirler. Mitokondri membranında kalıtsal olarak übikütin taşıyan bireylerin fertilizasyondaki başarı yüzdesinin düşük olabileceği düşünülmüştür (Sutovsky ve ark., 2004). p97/VCP, kofaktörlerinin de yardımıyla, übikütinlenmiş proteinlere özgün olarak bağlanır ve bu proteinlere 26S proteazomda degrades olmadan önce, şaperonluk yaparak onlara yol gösterir. Substrat übikütinlenmesinden sonra, p97/VCP protein komplekslerini birbirinden ayırmak için ATP'yi kullanır ve proteinlerin proteazoma yönlenmesini sağlar (Karin ve Ben-Neriah, 2000; Santoro ve ark., 2003). Birçok proteinle olan ilişkisi nedeniyle, p97/VCP hücrede çok çeşitli aktiviteler göstermektedir. Bu şekilde, p97/VCP'nin protein degradasyonu, hücre siklusu kontrolü, otofaji gibi birçok önemli fonksiyonu yerine getirdiği özetlenmiştir.

Tüm bu bilgiler ışığında, çalışmalarımızdan elde edilen sonuçlar ışığında p97/VCP' nin de übikütin gibi infertil bireylere ait düşük kaliteli spermelerde fertil bireylere ait kaliteli spermelere göre daha fazla ekspre edildiği gösterilmiştir. Önemli bir bulgu olarak fertil ve infertil bireylerdeki übikütin ve p97/VCP immunoreaktivite yüzdesi arasında anlamlı derecede fark saptandı. Fertil ve infertil bireylerin übikütin ve p97/VCP immunoreaktivite yüzdeleri arasındaki fark ve bu yüzdelerle semen parametreleri arasındaki ilişki, übikütin ve p97/VCP nin erkek infertilitesini değerlendirmede bir belirteç olabileceğini göstermektedir.

Sonuç olarak, tez çalışmalarım postnatal sıçan testisinde BMP ve UPS proteinlerini ayrı ayrı değerlendirildiği gibi bu iki aileye ait proteinler arasındaki etkileşimi de ortaya çıkarmıştır. Bu sonuçlar, UPS'in BMP yolağını düzenleyebileceğini ileri sürmektedir. Ayrıca fertil ve infertil bireylerde yapılan çalışmalar, sperm übikütin ve p97/VCP ekspresyonlarının erkek infertilitesini değerlendirmede bir belirteç olabileceğini de ileri sürmektedir. Tezimde yaptığım çalışmalar gibi, sinyal molekülleri ve yolaklarında yapılacak olan daha ileri gelişmeler erkek infertilite etiyolojisinde karmaşık bir süreç olan spermatogenezin daha iyi anlaşılması için yararlı olacaktır.

KAYNAKLAR

- Aktümsek A. Anatomi ve Fizyoloji İnsan Biyolojisi, Nobel Yayın Dağıtım, 2.baskı, Ankara, 2004: 434,439
- Aravind, L., Ponting, C.P., 1998. Homologues of 26S proteasome subunits are regulators of transcription and translation. *Protein Sci* 7, 1250-1254.
- Arıncı, K. ve Elhan, A., 2006, Anatomi, 1. Cilt, Güneş Kitabevi, ISBN, 975-7467-29-4, Ankara.
- Atabenli, E., 2002, Özel histoloji ince yapı ve gelişme, (Çev.: Tekelioğlu, E.) Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara.
- Aydos K., 2005: Spermatozoa Metabolizmasına Değişik Bir Bakış: Kompartmantalizasyon. *Turkish German Gynecol Assoc*, Vol. 6(3); 2005:204-209
- Bakalska M., Mourdjeval M., Russinova A., et al. Localization of atrial natriuretic factor in rat testis after Leydig cell destruction: evidence for a potential role in regulating gonadal function, *Endocrine Regulations* 1999; 33: 183.191.
- Fujisawa, M., Cell to cell cross talk in the testis, *Urol. Res* 2001; 29: 144-151. 55
- Barrat, C., Spermatogenesis. In: Grudzinskas JG and Yovich JL (eds): *Gametes- the spermatozoon*. 1995, Cambridge University Press. p. 250-267.
- Bech-Otschir, D., Kraft, R., Huang, X., Henklein, P., Kapelari, B., Pollmann, C.,
- Dubiel, W., 2001. COP9 signalosome-specific phosphorylation targets p53 to degradation by the ubiquitin system. *Embo J* 20, 1630-1639.
- Bedford JM, H.D., The mammalian spermatozoan: morphology, biochemistry and physiology, in In: Lamming GE (ed) *Marshall's Physiology of Reproduction*. 1990: Edingurgh: Churchill Livingstone. p. 379-568.
- Bellare, P., Kutach, A.K., Rines, A.K., Guthrie, C., Sontheimer, E.J., 2006. Ubiquitin binding by a variant Jab1/MPN domain in the essential pre-mRNA splicing factor Prp8p. *Rna* 12, 292-302.
- Berse, M., Bounpheng, M., Huang, X., Christy, B., Pollmann, C., Dubiel, W., 2004. Ubiquitin-dependent degradation of Id1 and Id3 is mediated by the COP9 signalosome. *J Mol Biol* 343, 361-370.

Bounpheng, M.A., Melnikova, I.N., Dodds, S.G., Chen, H., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Christy, B.A., Characterization of the mouse JAB1 cDNA and protein. *Gene* 2000, 242:41-50.

Braun, S., Matuschewski, K., Rape, M., Thoms, S., Jentsch, S., 2002. Role of the ubiquitin-selective CDC48(UFD1/NPL4) chaperone (segregase) in ERAD of OLE1 and other substrates. *Embo J* 21, 615-621.

Callige, M., Kieffer, I., Richard-Foy, H., 2005. CSN5/Jab1 is involved in ligand-dependent degradation of estrogen receptor {alpha} by the proteasome. *Mol Cell Biol* 25, 4349-4358.

Cao, K., Nakajima, R., Meyer, H.H., Zheng, Y., 2003. The AAA-ATPase Cdc48/p97 regulates spindle disassembly at the end of mitosis. *Cell* 115, 355-367.

Cao, K., Zheng, Y., 2004. The Cdc48/p97-Ufd1-Npl4 complex: its potential role in coordinating cellular morphogenesis during the M-G1 transition. *Cell Cycle* 3, 422-424.

Carrell D., Wilcox A., Lowy L., Peterson M., Jones K., Erickson L., Campbell B, Branch W., and Hatasaka H., 2003: Elevated Sperm Chromosome Aneuploidy and Apoptosis in Patients With Unexplained Recurrent Pregnancy Loss. *Obstetrics and Gynecology* Vol. 101, No. 6

Clermont, Y., Perey, B., 1957. Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature siçans. *Am J Anat*, 100:241-267.

Cohen, J.J., 1993, Apoptosis, *Immunol Today*, 14: 126-130 p.

Cope, G.A., Deshaies, R.J., 2006. Targeted silencing of Jab1/Csn5 in human cells downregulates SCF activity through reduction of F-box protein levels. *BMC Biochem* 7, 1.

Cope, G.A., Suh, G.S., Aravind, L., Schwarz, S.E., Zipursky, S.L., Koonin, E.V., Deshaies, R.J., 2002. Role of predicted metalloprotease motif of Jab1/Csn5 in cleavage of Nedd8 from Cull1. *Science* 298, 608-611.

Cumhur, M., 2001, *Temel anatomi*, 1. Baskı, ODTÜ Geliştirme Vakfı Yayıncılık ve İletişim A.Ş.-METU Press, Ankara.

Curry MR, W.P., Sperm structure and function, in *Gametes- the spermatozoon*, I.G.J.a.Y.J. (eds, Editor. 1995, Cambridge University Press. p. 45-69.

Dai, R.M., Chen, E., Longo, D.L., Gorbea, C.M., Li, C.C., 1998. Involvement of valosin-containing protein, an ATPase Co-purified with IkappaBalpha and 26 S proteasome, in ubiquitin-proteasome-mediated degradation of IkappaBalpha. *J Biol Chem* 273, 3562-3573.

Dai, R.M., Li, C.C., 2001. Valosin-containing protein is a multi-ubiquitin chain-targeting factor required in ubiquitin-proteasome degradation. *Nat Cell Biol* 3, 740-744.

Ebisawa T, Fukuchi M, Murakami G, et al. Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through SMAD7 and induces receptor degradation. *J Biol Chem.* 2001;276(16):12477-12480.

Elgavish, S. and B. Shaanan, Lectin-carbohydrate interactions: different folds, common recognition principles. *Trends Biochem Sci*, 1997. 22(12): p. 462-7.

Esrefoglu M. Özel Histoloji, Medipres Matbacılık, Malatya, 2009: 253-260.

Farrell, K.W., Purification and reassembly of tubulin from outer doublet microtubules. *Methods Cell Biol*, 1982. 24: p. 61-78.

Fawcett, D.W. at Jensch, R.P., 2002, *Concise histology*, arnold publisher, 2nd Edition, New York.

Fırat, S., 1997, Kobaylarda radyasyonla oluşan akciğer hasarında doku glutatyon, glutatyon peroksidaz, glutatyon- S-transferaz düzeyleri ve N-asetil sistein'in bu sistem üzerindeki etkisi, Uzm.Tezi, Gazi Üni. Tıp Fak., Biyokimya A.B.Dalı, Ankara, 95 s.

Friend, D.S. and D.W. Fawcett, Membrane differentiations in freeze fractured mammalian sperm. *J Cell Biol*, 1974. 63(2 Pt 1): p. 641-64.

Frohlich, K.U., Fries, H.W., Rudiğer, M., Erdmann, R., Botstein, D., Mecke, D., 1991. Yeast cell cycle protein CDC48p shows full-length homology to the mammalian protein VCP and is a member of a protein family involved in secretion, peroxisome formation, and gene expression. *J Cell Biol* 114, 443-453.

Ganong, W.F., 1995, *Ganong Tıbbi Fizyoloji*, (Çev.: Doğan, A.), Barış Kitapevi, İstanbul.

Gartner, L.P. at Hiatt, J.L., 2003, *Color Textbook of Histology*, 2nd Edition.

Gartner, L.P., Hiatt, J.L., 2007, *Color textbook of histology*, 3. Baskı, W.B., Saunders Company, Philadelphia.

Ghislain, M., Dohmen, R.J., Levy, F., Varshavsky, A., 1996. Cdc48p interacts with Ufd3p, a WD repeat protein required for ubiquitin-mediated proteolysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* 15, 4884-4899.

Glickman, M.H., Rubin, D.M., Fried, V.A., Finley, D., 1998. The regulatory particle of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome. *Mol Cell Biol* 18, 3149-3162.

Groisman, R., Polanowska, J., Kuraoka, I., Sawada, J., Saijo, M., Drapkin, R., Kisselev, A.F., Tanaka, K., Nakatani, Y., 2003. The ubiquitin ligase activity in the DDB2 and CSA complexes is differentially regulated by the COP9 signalosome in response to DNA damage. *Cell* 113, 357-367.

Guyton, A.C. at Hall, J.E., 1996, Textbook of medical physiology, Harcourt Brace, 9th Edition.

Guzick DS., Overstreet JW., Factor-Litvak P., Brazil CK., Nakajima ST., Coutifaris C., Carson SA., Cisneros P., Steinkamph MP., Hill JA., Xu D. and Vogel DL., 2001: Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *New Eng J Med* 345,1388–1393.

Hassa, H., 2003, İnfertil olgulara klinik yaklaşım ve IVF laboratuvar uygulamaları, ESOGÜ Basımevi, Eskişehir.

Henke, W., Ferrell, K., Bech-Otschir, D., Seeger, M., Schade, R., Jungblut, P., Naumann, M., Dubiel, W., 1999. Comparison of human COP9 signalsome and 26S proteasome lid'. *Mol Biol Rep* 26, 29-34.

Hetfeld, B.K., Helfrich, A., Kapelari, B., Scheel, H., Hofmann, K., Guterman, A., Glickman, M., Schade, R., Kloetzel, P.M., Dubiel, W., 2005. The zinc finger of the CSN-associated deubiquitinating enzyme USP15 is essential to rescue the E3 ligase Rbx1. *Curr Biol* 15, 1217-1221.

Hitchcock, A.L., Krebber, H., Fietze, S., Lin, A., Latterich, M., Silver, P.A., 2001. The conserved npl4 protein complex mediates proteasome-dependent membrane-bound transcription factor activation. *Mol Biol Cell* 12, 3226-3241.

Holt, W.V., Development and maturation of the mammalian acrosome. A cytochemical study using phosphotungstic acid staining. *J Ultrastruct Res*, 1979. 68(1): p. 58-71.

Hu J, Zhang YQ, Liu XP, Wang RA, Jin Y, Xu RJ. Expression and localization of Smad1, Smad2 and Smad4 proteins in rat testis during postnatal development. *Asian J Androl*. 2003;5(1):51-55.

Hutchison, G.R., Scott, H.M., Walker, M., McKinnell, C., Ferrara, D., Mahood, I.K., Sharpe, R.M., 2008. Sertoli cell development and function in an animal model of testicular dysgenesis syndrome. *Biol Reprod* 78, 352-360.

Henke, W., Ferrell, K., Bech-Otschir, D., Seeger, M., Schade, R., Jungblut, P., Naumann, M., Dubiel, W., 1999. Comparison of human COP9 signalsome and 26S proteasome lid'. *Mol Biol Rep* 26, 29-34.

Hetfeld, B.K., Helfrich, A., Kapelari, B., Scheel, H., Hofmann, K., Guterman, A., Glickman, M., Schade, R., Kloetzel, P.M., Dubiel, W., 2005. The zinc finger of the CSN-associated deubiquitinating enzyme USP15 is essential to rescue the E3 ligase Rbx1. *Curr Biol* 15, 1217-1221.

Hitchcock, A.L., Krebber, H., Fietze, S., Lin, A., Latterich, M., Silver, P.A., 2001. The conserved npl4 protein complex mediates proteasome-dependent membrane-bound transcription factor activation. *Mol Biol Cell* 12, 3226-3241.

Irvine D.S., Twigg J.P., Gordon E.L., Fulton N., Milne P.A. and Aitken R.J., 2000: DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *Journal of Andrology* 21 33–44. Ombelet, W., Fourie, F., Vandeput, H., 1994: Teratozoospermia and invitro fertilization: a randomised prospective study. *Hum. Reprod.*, 9, 1479

Itman C, Mendis S, Barakat B, Loveland KL. All in the family: TGF-beta family action in testis development. *Reproduction*. 2006;132(2):233-246.

Itman C, Loveland KL. SMAD expression in the testis: an insight into BMP regulation of spermatogenesis. *Dev Dyn*. 2008;237(1): 97-111.

Itoh S, Itoh F, Goumans MJ, Ten Dijke P. Signaling of transforming growth factor-beta family members through Smad proteins. *Eur J Biochem* 2000;267:6954-67.

Jangueria LC., Carneiro J., Kelley OR.: Temel histoloji (Çev: Aytekin Y., Solakoğlu S., Ahışalı B.) syf: 407-419, 431-433, Barış kitabevi, 1998.

Jarosch, E., Taxis, C., Volkwein, C., Bordallo, J., Finley, D., Wolf, D.H., Sommer, T., 2002. Protein dışlocation from the ER requires polyubiquitination and the AAA-ATPase Cdc48. *Nat Cell Biol* 4, 134-139.

Kalaycı, S.,1986, Histoloji, Uludağ Üniversitesi Basımevi.

Karin, M., Ben-Neriah, Y., 2000. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol* 18, 621-663.

Kayalı, H., şatıroğlu G., Taşyürekli G.,1992, Şnsan embriyolojisi, 7. Baskı, Alfa Basım Yayım Dağıtım, İstanbul.

Kierszenbaum, A.L., 2002, *Histology and Cell Biology An Introduction to Pathology*, Mosby.

Kierszenbaum AL. (Çeviri Editörü: Demir R.): *Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş*, Palme Yayıncılık, Ankara, 2006.

Kim, B.C., Lee, H.J., Park, S.H., Lee, S.R., Karpova, T.S., McNally, J.G., Felici, A., Lee, D.K., Kim, S.J., 2004. Jab1/CSN5, a component of the COP9 signalosome, regulates transforming growth factor beta signaling by binding to SMAD7 and promoting its degradation. *Mol Cell Biol* 24, 2251-2262.

Kierszenbaum AL. (Çeviri Editörü: Demir R.): *Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş*, Palme Yayıncılık , Ankara, 2006.

Koeva Y., Bakalska M., Atanassova N., et al., 11_β-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression in the newly formed Leydig cells after ethane dimethanesulphonate treatment of adult rats, *Folia Histochemica Et Cytobiologica* 2007; 4: 381-386

- Kolk, A.H. and T. Samuel, Isolation, chemical and immunological characterization of two strongly basic nuclear proteins from human spermatozoa. *Biochim Biophys Acta*, 1975. 393(2): p. 307-19.
- Kondo, H., Rabouille, C., Newman, R., Levine, T.P., Pappin, D., Freemont, P., Warren, G., 1997. p47 is a cofactor for p97-mediated membrane fusion. *Nature* 388, 75-78.
- Kwon J, Mochida K, Wang YL, Sekiguchi S, Sankai T, Aoki S, Ogura A, Yoshikawa Y, Wada K: Ubikütin C-terminal hydrolase L-1 is essential for the early apoptotic wave of germinal cells and for sperm quality control during spermatogenesis. *Biol Reprod* 2005, 73:29-35.
- Langman J, *Medical Embryology* 4th Edn. Williams and Wilkins , Baltimore,1996.
- Larsen, W.J., 2003, *Human Embryology*, Churchill Livingstone, 3rd Edition.
- Moore, K.L., Dalley, A.F., 2007, *Kliniğe yönelik anatomi*, (Çev.: şahinoğlu, K.), 4. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, Ankara.
- Leeson T, Leeson R, Paparo A. *Text/Atlas Of Histology*,W.B. Saunders Company, Florida, 1988:150-152
- Li, S., Liu, X., Ascoli, M., 2000. p38JAB1 binds to the intracellular precursor of the lutropin/choriogonadotropin receptor and promotes its degradation. *J Biol Chem* 275, 13386-13393.
- Lin X, Liang M, Feng XH. Smurf2 is a ubiquitin E3 ligase mediating proteasome-dependent degradation of SMAD2 in transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem*. 2000;275(47): 36818-36822.
- Liu F. Smad3 phosphorylation by cyclin-dependent kinases. *Cytokine Growth Factor Rev* 2006;17:9-17.
- Maurizi, M.R., Li, C.C., 2001. AAA proteins: in search of a common molecular basis. *International Meeting on Cellular Functions of AAA Proteins*. *EMBO Rep* 2, 980-985.
- Malkov, M., Fisher, Y., Don, J., 1998. Developmental schedule of the postnatal sıçan testis determined by flow cytometry. *Biol Reprod* 59, 84-92.
- Massague J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 1998;67:753-91.
- Maytal-Kivity, V., Reis, N., Hofmann, K., Glickman, M.H., 2002. MPN+, a putative catalytic motif found in a subset of MPN domain proteins from eukaryotes and prokaryotes, is critical for Rpn11 function. *BMC Biochem* 3, 28.
- McCullough, J., Clague, M.J., Urbe, S., 2004. AMSH is an endosome-associated ubiquitin isopeptidase. *J Cell Biol* 166, 487-492.

- Meusser, B., Hirsch, C., Jarosch, E., Sommer, T., 2005. ERAD: the long road to destruction. *Nat Cell Biol* 7, 766-772.
- Moore K., Persaud T.V.N.,(Çeviri Editörleri: Yıldırım M., Okar İ., Dalçık H.), İnsan Embriyolojisi, Nobel Tıp Kitabevleri, Ankara, 2002.
- Moore, K.L., 2003, The developing human clinically oriented embryology, the beginning of human development: first week, Seventh edition, 15-41 p.
- Moore, K.L., Agur, A.M.L., 2006, Temel klinik anatomi, (Çev.: Elhan, A.), 2. Baskı, Güneş Kitabevi, Ankara.
- Morales, P., et al., Extracellular localization of proteasomes in human sperm. *Mol Reprod Dev*, 2004. 68(1): p. 115-24.
- Neuwald, A.F., Aravind, L., Spouge, J.L., Koonin, E.V., 1999. AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res* 9, 27-43.
- Odar, Ş.V., 1986, Anatomi, Hacettepe Kitapçılık Ltd. Şti, Ankara, 458 s.
- Ozan, H., 2006, Ozan anatomi, Nobel Tıp Kitabevleri, Ankara.
- Pamnani, V., Tamura, T., Lupas, A., Peters, J., Cejka, Z., Ashraf, W., Baumeister, W., 1997. Cloning, sequencing and expression of VAT, a CDC48/p97 ATPase homologue from the archaeon *Thermoplasma acidophilum*. *FEBS Lett* 404, 263-268.
- Pedersen, H., Further observations on the fine structure of the human spermatozoon. *Zellforsch Mikrosk Anat*, 1972. 123(3): p. 305-15. 68
- Pedersen, H., The postacrosomal region of the spermatozoa of man and *Macaca arctoides*. *J Ultrastruct Res*, 1972. 40(3): p. 366-77.
- Pellegrini M, Grimaldi P, Rossi P, Geremia R, Dolci S. Developmental expression of BMP4/ALK3/SMAD5 signaling pathway in the mouse testis: a potential role of BMP4 in spermatogonia differentiation. *J Cell Sci*. 2003;116(pt 16):3363-3372.
- Pickart, C.M., 2001a. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* 70, 503-533.
- Pickart, C.M., 2001b. Ubiquitin enters the new millennium. *Mol Cell* 8, 499-504.
- Pickart CM (2001) Ubikütün enters the new millennium. *Mol Cell* 8(3):499–504
- Shackleford TJ, Claret FX: JAB1/CSN5: a new player in cell cycle control and cancer. *Cell Div* 2010, 5:26.

- Pickart, C.M., Cohen, R.E., 2004. Proteasomes and their kin: proteases in the machine age. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 177-187.
- Phillips, D., Mitochondrial disposition in mammalian spermatozoa. *J Ultrastruct Res*, 1970(58): p. 144-154.
- Rape, M., Hoppe, T., Gorr, I., Kalocay, M., Richly, H., Jentsch, S., 2001. Mobilization of processed, membrane-tethered SPT23 transcription factor by CDC48(UFD1/NPL4), a ubiquitin-selective chaperone. *Cell* 107, 667-677.
- Ross HM., Kaye GI. and Pawlina W.: *Histology: A text and atlas. Section 21: Male reproductive system. 4nd edition. Syf: 683-710, 2003.*
- Ross, M.H., Pawlina, W., 2006, *Histology- a text and atlas with correlated cell and molecular biology, 5. Edition, Lippincott W&W, Philadelphia.*
- Russell, L.D., Tallon-Doran, M., Weber, J.E., Wong, V., Peterson, R.N., 1983. Three dimensional reconstruction of a sıçan stage V Sertoli cell: III. A study of specific cellular relationships. *Am J Anat*, 167, 181-192.
- Santoro, M.G., Rossi, A., Amici, C., 2003. NF-kappaB and virus infection: who controls whom. *Embo J* 22, 2552-2560.
- Sakai, Y., Nakamoto, T., Yamashina, S., 1988. Dynamic changes in Sertoli cell processes invading spermatid cytoplasm during mouse spermiogenesis. *Anat Rec* 220, 51-57.
- Schnell, J.D., Hicke, L., 2003. Non-traditional functions of ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *J Biol Chem* 278, 35857-35860.
- Schwechheimer, C., Deng, X.W., 2001. COP9 signalosome revisited: a novel mediator of protein degradation. *Trends Cell Biol* 11, 420-426.
- Schweitzer, K., Bozko, P.M., Dubiel, W., Naumann, M., 2007. CSN controls NF-kappaB by deubiquitylation of IkappaBalpha. *Embo J* 26, 1532-1541.
- Seeger, M., Kraft, R., Ferrell, K., Bech-Otschir, D., Dumdey, R., Schade, R., Gordon, C., Naumann, M., Dubiel, W., 1998. A novel protein complex involved in signal transduction possessing similarities to 26S proteasome subunits. *Faseb J* 12, 469-478.
- Serres, C., D. Escalier, and G. David, Ultrastructural morphometry of the human sperm flagellum with a stereological analysis of the lengths of the dense fibres. *Biol Cell*, 1983. 49(2): p. 153-61.
- Siegel, M.S., et al., Partial purification and characterization of human sperminogen. *Biol Reprod*, 1987. 36(4): p. 1063-8.

Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003;113:685- 700.

Snell, R.S., 1998, *Klinik Anatomi*, (Çev.:Yıldırım, M.) Nobel &Yüce, 5. Baskı.

Sutovsky P, Moreno R, Ramalho-Santos J, Dominko T, Thompson WE, Schatten G: A putative, ubiquitin-dependent mechanism for the recognition and elimination of defective spermatozoa in the mammalian epididymis. *J Cell Sci* 2001, 114:1665-1675.

Sutovsky P: Ubiquitin-dependent proteolysis in mammalian spermatogenesis, fertilization, and sperm quality control: killing three birds with one stone. *Microsc Res Tech* 2003, 61:88-102.

Vale, R.D., 2000. AAA proteins. Lords of the ring. *J Cell Biol* 150, F13-19.

Verma, R., Aravind, L., Oania, R., McDonald, W.H., Yates, J.R., 3rd, Koonin, E.V., Deshaies, R.J., 2002. Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science* 298, 611-615.

Virtanen, I., et al., Distinct cytoskeletal domains revealed in sperm cells. *J Cell Biol*, 1984. 99(3): p. 1083-91.

Wan, M., Cao, X., Wu, Y., Bai, S., Wu, L., Shi, X., Wang, N., 2002. Jab1 antagonizes TGF-beta signaling by inducing SMAD4 degradation. *EMBO Rep* 3, 171-176.

Wang, Q., Song, C., Li, C.C., 2004. Molecular perspectives on p97-VCP: progress in understanding its structure and diverse biological functions. *J Struct Biol* 146, 44-57.

Wang, Q., Song, C., Yang, X., Li, C.C., 2003. D1 ring is stable and nucleotide-independent, whereas D2 ring undergoes major conformational changes during the ATPase cycle of p97-VCP. *J Biol Chem* 278, 32784-32793.

Wotton D, Lo RS, Lee S, Massague' J. A SMAD transcriptional corepressor. *Cell*. 1999;97(1):29-39.

Wei, N., Chamovitz, D.A., Deng, X.W., 1994. Arabidopsis COP9 is a component of a novel signaling complex mediating light control of development. *Cell* 78, 117-124.

Wei, N., Deng, X.W., 1999. Making sense of the COP9 signalosome. A regulatory protein complex conserved from Arabidopsis to human. *Trends Genet* 15, 98-103.

Wei, N., Deng, X.W., 2003. The COP9 signalosome. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19, 261-286.

Wei, N., Tsuge, T., Serino, G., Dohmae, N., Takio, K., Matsui, M., Deng, X.W., 1998. The COP9 complex is conserved between plants and mammals and is related to the 26S proteasome regulatory complex. *Curr Biol* 8, 919-922.

Wojcik, C., Yano, M., DeMartino, G.N., 2004. RNA interference of valosin-containing protein (VCP/p97) reveals multiple cellular roles linked to ubiquitin/proteasome-dependent proteolysis. *J Cell Sci* 117, 281-292.

Yanagimachi, R., Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill JD et al., (eds), in *The Physiology of Reproduction*. 1988, Raven Press: New York. p. 135-185.

Ye, Y., Meyer, H.H., Rapoport, T.A., 2001. The AAA ATPase Cdc48/p97 and its partners transport proteins from the ER into the cytosol. *Nature* 414, 652-656.

Yıldırım, M., 1999, *İnsan anatomisi*, Nobel Tıp Kitabevleri, Ankara.

Yun, J., Tomida, A., Andoh, T., Tsuruo, T., 2004. Interaction between glucose-regulated destruction domain of DNA topoisomerase IIalpha and MPN domain of Jab1/CSN5. *J Biol Chem* 279, 31296-31303.

Yücel, H.A., 2003, *Erkek genital sistemi*, (Çev.: Gökmen, Gövsa, F.) *Sistematik anatomi*, İzmir Güven Kitabevi, İzmir, 549-551 s.

Zhengwei, Y., Wreford, N.G., Royce, P. at Kretser, D.M., 1990, A Quantitative Study of Spermatogenesis in the Developing Rat Testis, *Biology of Reproduction*, 43, 629-635 p.

Zhou, C., Wee, S., Rhee, E., Naumann, M., Dubiel, W., Wolf, D.A., 2003. Fission yeast COP9/signalosome suppresses cullin activity through recruitment of the deubiquitylating enzyme Ubp12p. *Mol Cell* 11, 927-938.

Zwickl, P., Baumeister, W., 1999. AAA-ATPases at the crossroads of protein life and death. *Nat Cell Biol* 1, E97-98.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Seda OCAKLI

Doğum Tarihi: 17/07/1981

Medeni Hali: Evli

Öğrenim Durumu:

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyoloji	Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Fakültesi	2004
Y. Lisans	Histoloji ve Embriyoloji	Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Tıp Fakültesi	2010/2013

Görevler :

Görev Ünvanı	Görev Yeri	Yıl
Araştırma Görevlisi	Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Histoloji ve Embriyoloji ABD, Tokat, Türkiye	2011,.....

Bilimsel Kuruluşlara Üyelikler:

European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE)

ESERLER

A. Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

A1. Cayli S, **Ocaklı S**, Erdemir F, Tas U, Aslan H, Yener T and Karaca Z (2011). Developmental expression of p97/VCP (Valosin containing protein) and Jab1/CSN5 in the rat testis and epididymis. Reproductive Biology and Endocrinology 9, 117.

A2. Cayli S, Erdemir F, **Ocaklı S**, Ungor B, Kesici H, Yener T, Aslan H (2011). Interaction between Smad1 and p97/VCP in rat testis and epididymis during the

postnatal development. Reproductive Sciences. Published online 3 November 2011. DOI: 10.1177/1933719111417886

A3. Ortak H, Cayli S, Tas U, **Ocakli S**, Sogut E, Demir HD (2012). Expression of p97/VCP and ubiquitin during postnatal development of the degenerating rat retina. J Molecular Histology. 43, 17-25. Published online 19 November 2011. DOI 10.1007/s10735-011-9374-y

A4. Cayli S, Demirturk F, **Ocakli S**, Aytan H, Caliskan AC and Cimsir H (2011). Altered expression of COP9 signalosome proteins in preeclampsia. Gynecological Endocrinology. Published online 21 November 2011. DOI: 10.3109/09513590.2011.633664

A5. Taş U, Cayli S, İnanır A, Ozyurt A, **Ocakli S**, Karaca ZI, Sarsılmaz M (2012) Aquaporin-1 and Aquaporin-3 Expressions in the Intervertebral Disc of Rats with Aging. Balkan Med J. 29

A6. Ortak H, Cayli S, **Ocakli S**, Sogut E, Tas U, Demir S (2013). Age-related changes of aquaporin expression patterns in the postnatal rat retina. Acta Histochem. 2012 Nov 3. pii: S0065-1281(12)00134-1. doi: 10.1016/j.acthis.2012.09.013. [Epub ahead of print]

B. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (*Proceedings*) basılan bildiriler :

B1. **Ocakli S**, Cayli S, Karaca Z, Erdemir F, Aslan H. Role of Ubiquitin proteasome system proteins in testicular torsion induced apoptosis in rats. P045. Page:il37. 28th Annual Meeting of ESHRE, Istanbul Turkey, 1 July-4 July 2012.

B2. Karaca Z, Cayli S, **Ocakli S**, Kesici H, Erdemir F, Aslan H, Tas U. Endothelin A type A receptor antagonist reduces torsion induced testicular damage in rats. P043. Page:il36. 28th Annual Meeting of ESHRE, Istanbul Turkey, 1 July-4 July 2012.

B3. Tas U, Cayli S, Inanir A, Ozyurt B, **Ocakli S**, Karaca ZI, Sarsılmaz M. Aquaporin 1 ve 3 expressions in the intervertebral disc of rats with aging. International Journal of Experimental and Clinical Anatomy. 6 Suppl, S51, IVth International Symposium of Clinical and Applied Anatomy, P43, 28 June-1st July 2012, Ankara, Turkey

B4. Caylı S, Ocaklı S, Erdemir F. The relationship between Valosin containing protein (p97/VCP) and BMP signaling in the developing rat testis and epididymis. P121, page 189, FEBS Special Meeting. Protein Quality Control and Ubiquitin Systems in Health and Disease 14-16 November 2012 Kusadası, Aydın

D. Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler :

E. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

E1. Caylı S, Ocaklı S, Erdemir F. Gelişmekte olan sıçan testisinde Übikütün Proteazom Yolağı ile BMP-Smad sinyal yolağı arasındaki ilişki. Cell and Tissue Biology Research. S04. Sayfa: 30. XI. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi. 16-19 Mayıs 2012 Denizli, Türkiye.

E2. Ocaklı S, Caylı S, Erdemir F. İnsan Sperm Kalitesi ve Ubikütün Proteazom Sistem Belirteçleri. Cell and Tissue Biology Research. P102. Sayfa: 150. XI. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi. 16-19 Mayıs 2012 Denizli, Türkiye.

E3. Ocaklı S, Caylı S, Demirtürk F. Preeklampitik Plasentada p97/ valosin İçeren Proteinin Değişmiş İfadesi. p 114. 21. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi (Uluslararası Katılımlı)28-31 Mayıs 2013, Mersin

F-Katıldığı Uluslararası Kongreler:

1. 28th Annual Meeting of the European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE), 2012, Istanbul, Turkey
2. Asya ve Afrika Steroloji Kongresi, 2012, Samsun, Türkiye.

G-Katıldığı Ulusal Kongreler:

1. XI. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 2012, Denizli, Türkiye.
2. 21.Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi, 2013, Mersin, Türkiye