

2024



T.C.  
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**İNSAN EMBRİYONAL KARSİNOM HÜCRE HATTINDA  
KÜÇÜK VCP İLE ETKİLEŞEN PROTEİN (SVIP) VE  
ETKİLEŞİMDE OLDUĞU UBİKÜTİN PROTEAZOM  
SİSTEM PROTEİNLERİNİN EKSPRESYONLARININ  
BELİRLENMESİ**

DOKTORA TEZİ

**Şeyma KİPEL**

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ PROGRAMI

Şeyma KİPEL

Ankara, 2024



T.C.  
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İNSAN EMBRİYONAL KARSİNOM HÜCRE HATTINDA  
KÜÇÜK VCP İLE ETKİLEŞEN PROTEİN (SVIP) VE  
ETKİLEŞİMDE OLDUĞU UBİKÜTİN PROTEAZOM  
SİSTEM PROTEİNLERİNİN EKSPRESYONLARININ  
BELİRLENMESİ**

DOKTORA TEZİ

**Şeyma KİPEL**

**Dr. Öğr. Üyesi Hilal NAKKAŞ**

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ PROGRAMI

**Bu tez çalışması AYBÜ BAP birimi tarafından 2446 ve  
TÜBİTAK tarafından 123S833 numaralı proje ile desteklenmiştir.**

Ankara, 2024

**T.C.**  
**ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

İnsan Embriyonal Karsinom Hücre Hattında Küçük VCP ile Etkileşen Protein (SVIP) ve  
Etkileşimde Olduğu Ubikülin Proteazom Sistem Proteinlerinin Ekspresyonlarının  
Belirlenmesi

Şeyma KİPEL

Doktora Tezi

31/05/2024

Tez Danışmanı

Dr. Öğr. Üyesi Hilal NAKKAŞ

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Sevil ÇAYLI

Doç. Dr. Selma ÇALIŞKAN

Dr. Öğr. Üyesi Hilal NAKKAŞ

Dr. Öğr. Üyesi Şule KIZIL

Dr. Öğr. Üyesi Emine Nazlı HAYIRLI ÖZYOL

Okuduğumuz ve Savunmasını dinlediğimiz bu tezin bir Doktora derecesi için  
gereken tüm kapsam ve kalite şartlarını sağladığını beyan ederiz.

Prof. Dr. Sena KAPLAN

Enstitü Müdürü

Bu tezin Doktora derecesi için gereken tüm şartları sağladığını tasdik ederim.

## BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tezde kullanılmış olan tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

31.05.2024

Şeyma KİPEL

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca sevgisini, desteğini ve yardımını benden hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Hilal NAKKAŞ'a en derin minnet ve şükranlarımı sunuyorum. Akademik hayatın zorluklarında ayakta kalmanın en önemli noktası her zaman sizin yanınızda olan bir danışman hocanızın olmasıdır. Ben bu açıdan çok şanslıydım, bu yüzden Hilal hocama ayrıca çok teşekkür ederim.

Tez sürecimin en başından beri yanımda olan ve her çözüm için kendisini aradığımda sorularımı dinleyen kıymetli hocam Prof. Dr. Sevil ÇAYLI'ya, bana desteğini hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocam Prof.Dr. Meltem ÖZGÜNER'e, anabilim dalımız sevgili öğretim üyeleri Dr. Öğr. Üyesi Bahar KARTAL'a, Dr. Öğr. Üyesi Tuba ÖZDEMİR SANCI'ya, Dr. Öğr. Üyesi Ebru ALİMOĞULLARI'na ve Dr. Öğr. Üyesi İlkay PIŞKİN'e teşekkür ederim.

Tez sürecinin zor ve yorucu dönemlerinde her zaman yanımda olup bana destek olan canım arkadaşlarım Dr. Öğr. Üyesi Gizem İLTER AKTAŞ'a, Öğr. Üyesi Simge ÇELEBİ AYLAN'a ve Translasyonel Tıp Anabilim Dalından Kübra FİDAN KAYA'ya çok teşekkür ederim. Tezimin en son zamanlarında aramıza katılan ve bana her zaman yardımcı olmaya çalışan Elif YAVAŞ'a teşekkür ederim.

RT-PCR istatistiksel analiz kısmında bana yardımcı olan Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Merkez Laboratuvarı'ndan Öğretim Görevlisi Oğuz ARI'ya katkıları için teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasına maddi destek sağlayan TÜBİTAK'a ve AYBÜ BAP birimine teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca her zaman yanımda olan ve bana benden daha çok inanan sevgili arkadaşlarıma ve dostlarıma çok teşekkür ederim. Bu süreç sizlerin desteği olmadan çok çok zor olurdu. İyi ki varsınız. Bir araya geldiğimizde hayallerimizden konuştuğumuz ve her zaman bana inanan çok güzel kalpli, muhteşem bir sporcu ve çok güçlü bir kadına canım Zehra GÜNEŞ'e çok teşekkür ederim.

Ve en büyük teşekkürüm, bugünlere gelmemi sağlayan, aldığım her kararda yanımda olan, her zaman sevgilerini ve güvenlerini kalbimde hissettiğim canım annem ve babama...Sizin sevginiz ve desteğiniz her zaman benimle olsun, iyi ki varsınız...

# İÇİNDEKİLER

<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>vi</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>ix</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>x</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>xi</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>xiii</b>
<b>TABLolar DİZİNİ</b> .....	<b>xviii</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>4</b>
2.1. İnsan Testis Histolojisi .....	4
2.2. Seminifer Tübüller .....	6
2.2.1. Sertoli Hücreleri .....	8
2.2.2. Spermatogenik Hücreler .....	9
2.2.3. Leydig Hücreleri.....	10
2.3. Spermatogenez .....	10
2.3.1. Spermatogenez Sürecinin Önemli Noktaları .....	14
2.3.2. Spermatogenezi Uyarıcı Hormonal Faktörler.....	15
2.3.3. Epididimide Spermin Olgunlaşması .....	16
2.3.4. Spermin Depolanması .....	16
2.3.5. Olgun Sperm Fizyolojisi.....	16
2.4. Testis Kanseri .....	17
2.4.1. Germ Hücre Tümörleri .....	19
2.5. Testis Kanseri ve İnfertilite .....	21
2.6. Small Valosin Interacting Protein.....	23
2.7. Androjen Reseptör.....	23
2.8. Ubikütin.....	24
2.9. Ubikütin Spesifik Peptidase 26 .....	25
2.10. Ubiquitous Expressed Transcript .....	26
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM</b> .....	<b>27</b>
3.1. Materyaller .....	27
3.1.1. Hücre Hatları .....	27
3.1.2. Antikorlar.....	27

3.1.3. Primerler .....	28
3.1.4. SVIP siRNA ve Kontrol siRNA .....	28
3.1.5. Mikroskoplar .....	29
3.2. Yöntemler .....	29
3.2.1. Hücre Kültürü .....	29
3.2.2. Morfolojik Değerlendirme ve Hematoksilen-Eozin Boyama... 30	
3.2.3. İmmünotokimyasal Boyama: .....	31
3.2.4. siRNA (Small Interfering RNA) Transfeksiyonu .....	31
3.2.5. Hücre Canlılık Analizi .....	33
3.2.6. Western Blot Analizi için Örneklerin Hazırlanması .....	34
3.2.7. Western Blot Analizi .....	34
3.2.8. İmmünofloresan Boyama .....	36
3.2.9. RNA İzolasyonu, Komplementer DNA Sentezi ve Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR .....	37
3.2.10. İstatistiksel Analiz .....	41
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>42</b>
4.1. Morfolojik Değerlendirme Bulguları .....	42
4.2. İnsan Testis Embriyonal Karsinom Hücre Hattında SVIP ve Ubikutin Proteinlerinin İmmünotokimya Boyama ile Varlığının Gösterilmesi ile İlgili Bulgular .....	44
4.3. İnsan Testis Embriyonal Karsinom, İnsan Leydig ve Fare Sertoli Hücre Hatlarında SVIP, Ubikutin, AR, USP26 ve UXT Proteinlerinin Varlığının Tespit Edilmesi ile İlgili Bulgular .....	45
4.4. Hücre Canlılık Analizi ile İlgili Bulgular .....	61
4.5. İnsan Testis Embriyonal Karsinom, İnsan Leydig ve Fare Sertoli Hücrelerinde SVIP siRNA'lar ile SVIP Ekspresyonunun Baskılanması Sonrası Morfolojik Değerlendirme Bulguları .....	62
4.6. İnsan Testis Embriyonal Karsinom, İnsan Leydig ve Fare Sertoli Hücre Hatlarında SVIP siRNA Transfeksiyonu Sonrası SVIP, Ubikutin, AR, USP26 ve UXT Proteinlerinin İmmünofloresan Boyama Bulguları .....	66
4.6.1. İnsan Testis Embriyonal Karsinom Hücrelerinde İmmünofloresan Boyama Bulguları .....	66

4.6.2. İnsan Leydig Hücrelerinde İmmünofloresan Boyama Bulguları.....	72
4.6.3. Fare Sertoli Hücrelerinde İmmünofloresan Boyama Bulguları.....	78
4.7. İnsan Testis Embriyonal Karsinom, İnsan Leydig ve Fare Sertoli Hücre Hatlarında SVIP siRNA Transfeksiyon Sonrası SVIP, Ubikütin, AR, USP26 ve UXT Proteinlerinin Ekspresyonlarının Western Blot Analiz Bulguları .....	84
4.7.1. İnsan Testis Embriyonal Karsinom Hücrelerinde Western Blot Analiz Bulguları .....	84
4.7.2. İnsan Leydig Hücrelerinde Western Blot Analiz Bulguları.....	86
4.7.3. Fare Sertoli Hücrelerinde Western Blot Analiz Bulguları .....	88
4.8. İnsan Testis Embriyonal Karsinom, İnsan Leydig ve Fare Sertoli Hücre Hatlarında SVIP siRNA Transfeksiyon Sonrası qRT-PCR Analiz Bulguları .....	90
4.8.1. İnsan Testis Embriyonal Karsinom Hücrelerinde qRT-PCR Analiz Bulguları .....	90
4.8.2. İnsan Leydig Hücrelerinde qRT-PCR Analiz Bulguları .....	92
4.8.3. Fare Sertoli Hücrelerinde qRT-PCR Analizlerinin Değerlendirilmesi.....	93
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>95</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>108</b>
<b>7. KAYNAKLAR.....</b>	<b>111</b>
<b>8. EKLER.....</b>	<b>120</b>
<b>EK-1. Özgeçmiş.....</b>	<b>120</b>

## ÖZET

### İnsan Embriyonal Karsinom Hücre Hattında Küçük VCP ile Etkileşen Protein (SVIP) ve Etkileşimde Olduğu Ubikütin Proteazom Sistem Proteinlerinin Ekspresyonlarının Belirlenmesi

SVIP, endoplasmik retikulumla ilişkili protein yıkımında görevli olan p97/VCP 'ye bağlanarak fonksiyonunu ve otofajiyi düzenleyen bir proteindir. SVIP'in sinir sistemi harici diğer hücre ve dokulardaki ekspresyonu hakkında literatürde çok az çalışma vardır. SVIP ile ilgili yapılan son çalışmalar SVIP'in androjene duyarlı bir protein olduğunu ve ekspresyonunun androjenler tarafından düzenlendiğini göstermiştir. Androjenler, önemli steroid hormonlardır ve ikincil cinsiyet özellik gelişiminde etkileri büyüktür. Ayrıca erkek üreme sisteminde spermatogenezin başlaması ve devam etmesinde de rolleri vardır. Androjen reseptörlerinin mutasyonları genellikle erkek üreme gelişimi bozukluğu olan hastalarda görülür ve erkek infertilitesine neden olabilir. İnfertilite popülasyonun yaklaşık %7'sini etkileyen patolojik bir durumdur. Testis tümörleri 15-34 yaş arası erkeklerde en sık görülen malign tümörlerdir. Testis tümörlerinin yaklaşık %95'i germ hücrelerinden kaynaklanır. Erkek üreme sisteminde ubikütin proteazom sisteminin (UPS), infertilite üzerinde etkisi olduğuna dair çalışmalar vardır. Bu nedenle UPS'in bileşenleri olan USP26 ve UXT ekspresyonlarının araştırılması testis biyolojisi için önemlidir.

Bu bilgiler ışığında tezimde insan testis embriyonal karsinom hücrelerinde (CRL-2073) SVIP ve etkileşimde olduğu UPS proteinlerinin ekspresyonlarını belirlemek için ve SVIP siRNA transfeksiyonu sonrası baskılanan SVIP ekspresyonunun diğer proteinler üzerindeki etkilerini görmek için SVIP, AR, Ubikütin, USP26 ve UXT ekspresyonları immunofloresan, western blot ve qRT-PCR yöntemleriyle analiz edilmiştir. Ayrıca kontrol grubu olarak daha önce SVIP ekspresyonu gösterilmiş olan insan Leydig ve fare Sertoli hücre hatları kullanılmıştır. CRL-207 hücrelerinde kontrol siRNA ve SVIP siRNA grupları karşılaştırıldığında immunofloresan ve western blot sonuçlarına göre SVIP, AR ve USP26 ve Ubikütin ekspresyonları azalmış, UXT ekspresyonu ise artmıştır. qRT-PCR sonucuna göre ise SVIP siRNA verilen grupta SVIP gen ekspresyonu azalmış, AR, Ubikütin, USP26 ve UXT gen ekspresyonları artmıştır.

Sonuç olarak bu çalışma ile insan testis embriyonal karsinom hücrelerinde ilk defa SVIP ve etkileşimde olduğu UPS proteinlerinin ekspresyonu gösterildi ve literatüre önemli bir katkı sağlandı.

**Anahtar kelimeler:** Embriyonal karsinom, SVIP, UPS, AR.

## ABSTRACT

### **Determination of Expression of Small VCP Interacting Protein (SVIP) and Interacting Ubiquitin Proteasome System Proteins in Human Embryonal Carcinoma Cell Line**

SVIP is a protein that regulates its function and autophagy by binding to p97/VCP, which is involved in protein degradation associated with the endoplasmic reticulum. There are very few studies in the literature about the expression of SVIP in cells and tissues other than the nervous system. Recent studies on SVIP have shown that SVIP is an androgen-sensitive protein and its expression is regulated by androgens. Androgens are important steroid hormones and have great effects on the development of secondary sex characteristics. They also play a role in the initiation and continuation of spermatogenesis in the male reproductive system. Mutations of androgen receptors are often seen in patients with disorders of male reproductive development and can cause male infertility. Infertility is a pathological condition that affects approximately 7% of the population. Testicular tumors are the most common malignant tumors in men between the ages of 15-34. Approximately 95% of testicular tumors arise from germ cells. There are studies showing that the ubiquitin proteasome system (UPS) in the male reproductive system has an effect on infertility. Therefore, investigating the expressions of USP26 and UXT, which are components of the UPS, is important for testicular biology.

In the light of this information, in my thesis, to determine the expressions of SVIP and the UPS proteins with which it interacts in human testicular embryonal carcinoma cells (CRL-2073) and to see the effects of suppressed SVIP expression on other proteins after SVIP siRNA transfection, the expressions of SVIP, AR, Ubiquitin, USP26 and UXT were analyzed by immunofluorescence, western blot and qRT-PCR methods. In addition, human Leydig and mouse Sertoli cell lines, which have previously been shown to express SVIP, were used as control groups. When control siRNA and SVIP siRNA groups were compared in CRL-207 cells, SVIP, AR, USP26 and Ubiquitin expressions decreased, while UXT expression increased, according to immunofluorescence and western blot results. According to the qRT-PCR results, SVIP gene expression decreased and AR, Ubiquitin, USP26 and UXT gene expressions increased in the group given SVIP siRNA.

As a result, this study demonstrated the expression of SVIP and its interacting UPS proteins in human testicular embryonal carcinoma cells for the first time, making a significant contribution to the literature.

**Keywords:** Embryonal carcinoma, SVIP, UPS, AR.

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: Santigrat derece
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
AMH	: Antimüllerian Hormon
AR	: Androjen reseptörü
cDNA	: Complementer DNA (Tamamlayıcı DNA)
DMEM	: Dulbeco's Modified Eagle Medium
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
ECL	: Kemiluminisans
ER	: Endoplazmik Retikulum
ERAD	: Endoplasmic Reticulum Associated Protein Degradation
FBS	: Fetal Bovine Serum
FITC	: Fluorescein isothiocyanate
FSH	: Folikül Uyarıcı Hormon
HE	: Hematoksilen Eozin
HRP	: Horse Radish Peroksidaz
kDA	: kilo Dalton
LH	: Luteinize edici Hormon
PBS	: Fosfat Tampon Tuz Çözeltisi
PBS	: Phosphate Buffer Saline
PCR	: Polimeraz Chain Reaktion
PFA	: Paraformaldehit
PTM	: Peritübüler Miyoid
RIPA	: Radioimmunoprecipitation
RNA	: Ribonükleik asit
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR	: Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
siRNA	: Small Interfering RNA
SVIP	: Küçük VCP ile etkileşen protein (Small Valosin Interacting Protein)

TNM	: Tümör- Nod- Metastaz
UPS	: Ubikütün Proteazom Sistemi
USP26	: Ubiquitin Spesific Peptidase 26
UXT	: Ubiquitin Expressed Transcript
YWHAZ	: Tirozin 3-Monooksijenaz/Triptofan 5-Monooksijenaz Aktive Edici Protein, Zeta Polipeptit



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Testisin genel yapısının mikroskopik gösterimi .....	4
Şekil 2.2. Testisin şematik gösterimi .....	5
Şekil 2.3. Testisin histolojik görünümü .....	6
Şekil 2.4. Seminifer tübüllerin genel yapısı .....	7
Şekil 2.5. Seminifer tübül yapısı .....	7
Şekil 2.6. İnsan seminifer epitelinin şematik gösterimi .....	9
Şekil 2.7. Seminer tübül ve tübülün dışındaki interstisyel dokudaki hücrelerin şematik çizimi .....	10
Şekil 2.8. Spermatogenezin şematik gösterimi .....	12
Şekil 2.9. Spermatogenik seri hücrelerinin histolojik görünümü .....	13
Şekil 2.10. Spermatogenik seri hücrelerinin histolojik görünümü .....	13
Şekil 2.11. Sperm yapısı .....	15
Şekil 2.12. Testis Kanseri şematik gösterimi .....	17
Şekil 2.13. UPS tarafından proteinlerin yıkılması .....	25
Şekil 3.1. Hücrelerde hematoksilin ve eozin boyama işlemi .....	30
Şekil 3.2. Hücrelere siRNA transfeksiyon uygulanması .....	32
Şekil 3.3. Hücrelerin thoma lamında tripan mavisi ile boyanması .....	33
Şekil 3.4. Western blot yürütme cihazında örneklerin yürütmesi ve Ponceu boyası ile membrandaki bantların görüntülenmesi .....	35
Şekil 3.5. Floresan mikroskop ile örneklerin görüntülenmesi .....	37
Şekil 3.6. RNA izolasyonu sonrası OD260/280 ölçümü .....	39
Şekil 4.1. İnsan testis embriyonal karsinom hücrelerinin ışık mikroskopik görüntüsü .....	42
Şekil 4.2. İnsan Leydig hücrelerinin ışık mikroskopik görüntüsü .....	43
Şekil 4.3. Fare Sertoli hücrelerinin ışık mikroskopik görüntüsü .....	43
Şekil 4.4. İnsan embriyonal karsinom hücrelerinde SVIP ve Ubikülin proteinlerinin immünohistokimyasal olarak gösterilmesi .....	44
Şekil 4.5. İnsan testis embriyonal karsinom hücrelerinde SVIP ekspresyonunun immünofloresan görüntüsü .....	46
Şekil 4.6. İnsan testis embriyonal karsinom hücrelerinde Ubikülin ekspresyonunun immünofloresan görüntüsü .....	47

<b>Şekil 4.7.</b> <i>İnsan testis embriyonal karsinom hücrelerinde AR ekspresyonunun immüofloresan görüntüsü.</i> .....	48
<b>Şekil 4.8.</b> <i>İnsan testis embriyonal karsinom hücrelerinde USP26 ekspresyonunun immüofloresan görüntüsü.</i> .....	49
<b>Şekil 4.9.</b> <i>İnsan testis embriyonal karsinom hücrelerinde UXT ekspresyonunun immüofloresan görüntüsü.</i> .....	50
<b>Şekil 4.10.</b> <i>İnsan Leydig hücrelerinde SVIP ekspresyonunun immüofloresan görüntüsü.</i> .....	51
<b>Şekil 4.11.</b> <i>İnsan Leydig hücrelerinde Ubikutin ekspresyonunun immüofloresan görüntüsü.</i> .....	52
<b>Şekil 4.12.</b> <i>İnsan Leydig hücrelerinde AR ekspresyonunun immüofloresan görüntüsü.</i> .....	53
<b>Şekil 4.13.</b> <i>İnsan Leydig hücrelerinde USP26 ekspresyonunun immüofloresan görüntüsü.</i> .....	54
<b>Şekil 4.14.</b> <i>İnsan Leydig hücrelerinde UXT ekspresyonunun immüofloresan görüntüsü.</i> .....	55
<b>Şekil 4.15.</b> <i>Fare Sertoli hücrelerinde SVIP ekspresyonunun immüofloresan görüntüsü.</i> .....	56
<b>Şekil 4.16.</b> <i>Fare Sertoli hücrelerinde ubikutin ekspresyonunun immüofloresan görüntüsü.</i> .....	57
<b>Şekil 4.17.</b> <i>Fare Sertoli hücrelerinde AR ekspresyonunun immüofloresan görüntüsü.</i> .....	58
<b>Şekil 4.18.</b> <i>Fare Sertoli hücrelerinde USP26 ekspresyonunun immüofloresan görüntüsü.</i> .....	59
<b>Şekil 4.19.</b> <i>Fare Sertoli hücrelerinde UXT ekspresyonunun immüofloresan görüntüsü.</i> .....	60
<b>Şekil 4.20.</b> <i>Canlılık analizi sonuç grafiği</i> .....	61
<b>Şekil 4.21.</b> <i>İnsan testis embriyonal karsinom hücrelerinin SVIP transfeksiyonu öncesi ve sonrası morfolojilerinin ışık mikroskobik görüntüsü</i> .....	63
<b>Şekil 4.22.</b> <i>İnsan Leydig hücrelerinin SVIP transfeksiyonu öncesi ve sonrası morfolojilerinin ışık mikroskobik görüntüsü</i> .....	64
<b>Şekil 4.23.</b> <i>Fare Sertoli hücrelerinin SVIP transfeksiyonu öncesi ve sonrası morfolojilerinin ışık mikroskobik görüntüsü</i> .....	65

<b>Şekil 4.24.</b> <i>CRL-2073 hücre hattında SVIP proteinin Kontrol siRNA ve SVIP siRNA uygulamaları sonrası immünofloresan mikroskopik görüntüleri.....</i>	67
<b>Şekil 4.25.</b> <i>CRL-2073 hücre hattında Ubikutin proteinin Kontrol siRNA ve SVIP siRNA uygulamaları sonrası immünofloresan mikroskopik görüntüleri.....</i>	68
<b>Şekil 4.26.</b> <i>CRL-2073 hücre hattında AR proteinin kontrol siRNA ve SVIP siRNA uygulamaları sonrası immünofloresan mikroskopik görüntüleri.....</i>	69
<b>Şekil 4.27.</b> <i>CRL-2073 hücre hattında USP26 proteinin kontrol siRNA ve SVIP siRNA uygulamaları sonrası immünofloresan mikroskopik görüntüleri.....</i>	70
<b>Şekil 4.28.</b> <i>CRL-2073 hücre hattında UXT proteinin kontrol siRNA ve SVIP siRNA uygulamaları sonrası immünofloresan mikroskopik görüntüleri.....</i>	71
<b>Şekil 4.29.</b> <i>SVIP, Ubikütin, AR, USP26 ve UXT proteinlerinin transfeksiyon sonrası ekspresyonlarının immünofloresan boyama sonucuna göre istatistiksel karşılaştırma grafikleri .....</i>	72
<b>Şekil 4.30.</b> <i>10-HUI03 hücre hattında SVIP proteininin kontrol siRNA ve SVIP siRNA uygulamaları sonrası immünofloresan mikroskopik görüntüleri.....</i>	73
<b>Şekil 4.31.</b> <i>10- HUI03 hücre hattında Ubikutin proteinin kontrol siRNA ve SVIP siRNA uygulamaları sonrası immünofloresan mikroskopik görüntüleri.....</i>	74
<b>Şekil 4.32.</b> <i>10-HUI03 hücre hattında AR proteinin kontrol siRNA ve SVIP siRNA uygulamaları sonrası immünofloresan mikroskopik görüntüleri .....</i>	75
<b>Şekil 4.33.</b> <i>10-HUI03 hücre hattında USP26 proteinin kontrol siRNA ve SVIP siRNA uygulamaları sonrası immünofloresan mikroskopik görüntüleri.....</i>	76
<b>Şekil 4.34.</b> <i>10-HUI03 hücre hattında UXT proteinin kontrol siRNA ve SVIP siRNA uygulamaları sonrası immünofloresan mikroskopik görüntüleri.....</i>	77

<b>Şekil 4.35.</b> <i>SVIP, Ubikütin, AR, USP26 ve UXT proteinlerinin transfeksiyon sonrası ekspresyonlarının immunofloresan boyama sonucuna göre istatistiksel karşılaştırma grafikleri. ....</i>	78
<b>Şekil 4.36.</b> <i>CRL-2618 hücre hattında SVIP proteinin kontrol siRNA ve SVIP siRNA uygulamaları sonrası immünofloresan mikroskopik görüntüleri.....</i>	79
<b>Şekil 4.37.</b> <i>CRL-2618 hücre hattında Ubikütin proteinin kontrol siRNA ve SVIP siRNA uygulamaları sonrası immünofloresan mikroskopik görüntüleri.....</i>	80
<b>Şekil 4.38.</b> <i>CRL-2618 hücre hattında AR proteinin kontrol siRNA ve SVIP siRNA uygulamaları sonrası immünofloresan mikroskopik görüntüleri.....</i>	81
<b>Şekil 4.39.</b> <i>CRL-2618 hücre hattında USP26 proteinin kontrol siRNA ve SVIP siRNA uygulamaları sonrası immünofloresan mikroskopik görüntüleri.....</i>	82
<b>Şekil 4.40.</b> <i>CRL-2618 hücre hattında UXT proteinin kontrol siRNA ve SVIP siRNA uygulamaları sonrası immünofloresan mikroskopik görüntüleri.....</i>	83
<b>Şekil 4.41.</b> <i>SVIP, Ubikütin, AR, USP26 ve UXT proteinlerinin transfeksiyon sonrası ekspresyonlarının immünofloresan boyama sonucuna göre istatistiksel karşılaştırma grafikleri. ....</i>	84
<b>Şekil 4.42.</b> <i>CRL-2073 hücre hattında kontrol siRNA ve SVIP siRNA ile transfeksiyon sonrası Western Blot analizi bant görüntüleri. ....</i>	85
<b>Şekil 4.43.</b> <i>USP26, AR, Ubikütin, UXT ve SVIP, proteinlerinin transfeksiyon sonrası ekspresyonlarının western blot analizi sonrası istatistiksel karşılaştırma grafikleri. ....</i>	86
<b>Şekil 4.44.</b> <i>10-HUI03 hücre hattında kontrol siRNA ve SVIP siRNA ile transfeksiyon sonrası Western Blot analizi bant görüntüleri. ....</i>	87
<b>Şekil 4.45.</b> <i>USP26, AR, Ubikütin, UXT ve SVIP SVIP, proteinlerinin transfeksiyon sonrası ekspresyonlarının western blot analizi sonrası istatistiksel karşılaştırma grafikleri ....</i>	88
<b>Şekil 4.46.</b> <i>CRL-2618 hücre hattında kontrol siRNA ve SVIP siRNA ile transfeksiyon sonrası Western Blot analizi bant görüntüleri. ....</i>	89

<b>Şekil 4.47.</b> <i>USP26, AR, Ubikütin, UXT ve SVIP SVIP, proteinlerinin transfeksiyon sonrası ekspresyonlarının western blot analizi sonrası istatistiksel karşılaştırma grafikleri. ....</i>	90
<b>Şekil 4.48.</b> <i>CRL-2073 hücre hattında SVIP siRNA transfeksiyonu sonrası qRT-PCR analizi sonrası istatistiksel karşılaştırma grafikleri. ....</i>	91
<b>Şekil 4.49.</b> <i>10-HUI03 hücre hattında SVIP siRNA transfeksiyonu sonrası qRT-PCR analizi sonrası istatistiksel karşılaştırma grafikleri ....</i>	93
<b>Şekil 4.50.</b> <i>CRL-2618 hücre hattında SVIP siRNA transfeksiyonu sonrası qRT-PCR analizi sonrası istatistiksel karşılaştırma grafikleri ....</i>	94



## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo 2.1.</b> <i>TNM sınıflandırma sistemi</i> .....	18
<b>Tablo 2.2.</b> <i>Germ hücreli tümörlerin sınıflandırılması</i> .....	20
<b>Tablo 3.1.</b> <i>Çalışmada kullanılan primer antikolar</i> .....	27
<b>Tablo 3.2.</b> <i>Çalışmada kullanılan sekonder antikolar</i> .....	28
<b>Tablo 3.3.</b> <i>Çalışmada kullanılan primer dizileri</i> .....	28
<b>Tablo 3.4.</b> <i>Çalışmada kullanılan siRNA'lar</i> .....	28
<b>Tablo 3.5.</b> <i>Çalışmada kullanılan mikroskop çeşitleri</i> .....	29
<b>Tablo 3.6.</b> <i>cDNA sentez reaksiyonu</i> .....	39
<b>Tablo 3.7.</b> <i>cDNA reaksiyon koşulları</i> .....	39
<b>Tablo 3.8.</b> <i>RT-PCR içeriği</i> .....	40
<b>Tablo 3.9.</b> <i>qRT-PCR koşulları</i> .....	40
<b>Tablo 4.1.</b> <i>Hücre hatlarına kontrol siRNA ve SVIP siRNA uygulaması sonrası canlı hücre sayıları</i> .....	61

# 1. GİRİŞ

Testisler skrotum içerisinde yer alan organlardır. Sperm üretilmesi ve androjen salgılanması iki ana görevidir (Kierszenbaum ve Tres, 2015). Testis hacminin çoğunluğunu seminifer tübüller oluşturur ve duvarı seminifer epitel ile döşelidir. Epitel iki ana hücre grubunu içerir; somatik hücreler (Sertoli) ve spermatogonik hücreler (spermatogonyum, spermatosit ve spermatid). Sertoli hücreleri gelişmekte olan spermatogonik hücrelerin korunması, beslenmesi ve desteklenmesinden sorumludur. Leydig hücreleri, testiste tübüllerin arasında bulunan hücrelerdir ve testosteron üretiminden sorumludur (Ross ve Pawlina, 2006).

Testis kanserleri 15-34 yaş arası erkeklerde en sık görülen solid tümörlerdir. Testis tümörlerinin bilinen kesin bir nedeni olmamakla birlikte germ hücreli tümörlerin etyolojisinde hem doğumsal hem de edinsel faktörlerin önemli olduğu bilinmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün yapmış olduğu sınıflandırmaya göre, testis kanserlerinin yaklaşık %90-95'ini germ hücreli tümörler oluşturur (Baird vd., 2018). Germ hücre tümörleri seminom ve non-seminom (Embriyonal karsinom, Yolk sac tümörü, İntratübüler vb.) olmak üzere iki ana gruba ayrılır. Embriyonal karsinom, testiküler germ hücreli tümörlerin yaklaşık %10'nu oluşturur.

Erkek infertilitesi (kısırlığı), popülasyonun yaklaşık %7'sini etkileyen çok faktörlü patolojik bir durumdur. İnfertilite genel olarak doğuştan kaynaklı problemler, anatomik veya patolojik sorunlar, cinsel problemler, travma veya toksik maruziyetten kaynaklanır. Erkek infertilitesi genetik olarak oldukça karışık bir mekanizmaya sahiptir. Spermatogenezde en az 2000 genin rol alması bunun bir göstergesidir. Genetik olarak ana sebepler kromozomlarındaki anomaliler ve otozoma bağlı gen mutasyonları olsa da vakaların yaklaşık %40'ında infertilitenin etiyolojisi tam olarak bilinmemektedir (Krausz vd., 2015). Testis dokusunun moleküler mekanizmalarını tam olarak aydınlatılabilmek için gelecekte daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır (Arıcı ve Erdemir, 2023).

Küçük VCP ile etkileşen protein (SVIP), endoplazmik retikulum (ER) ilişkili protein yıkımında görev alan p97/VCP'ye bağlanarak fonksiyonunu düzenleyen bir proteindir. Yapılan çalışmalarda SVIP'in p97/VCP ile etkileşerek otofajiyi düzenlediği gösterilmiştir (Nagahama vd., 2003). SVIP'in tümör baskılayıcı rolü tanımlanmış ve ekspresyonu artan ER stresi ve kanser büyümesinin inhibisyonu ile ilişkilendirilmiştir (Llinàs-Arias vd.,2019). SVIP androjene yanıt veren bir gen olarak tanımlanmıştır ve ekspresyonunun androjenler tarafından düzenlendiği gösterilmiştir (Romanuik vd.,2010). Androjenlerin yüksek oranda eksprese edildiği fare testisinde SVIP'in hücrel lokalizasyonu ve ekspresyonun, immünohistokimyasal analizler ve western blot analizi ile gösterildi. Akcan vd. (2020)'nin yaptığı çalışma testiste SVIP varlığını gösteren ilk çalışmadır.

Androjenler çok önemli steroid hormonlardır ve ikincil cinsiyet özellik gelişimi, spermatogenezin başlatılması ve sürdürülmesi gibi pek çok erkek üreme sistemi fonksiyonunun düzenlenmesini sağlarlar. Androjen reseptörü (AR), ligand bağımlı transkripsiyon proteinidir ve vücutta yaygın olarak bulunan steroid reseptör süper ailesinin bir üyesi olarak androjenlerin fonksiyonunun ayarlanmasında yer alır ve spermatogenezde önemli rol oynar (Wang vd., 2009). Androjenler, AR'ye bağlanarak ve hedef genin ekspresyonunu başlatarak spermatogeneze katılır. AR geninin polimorfizmleri AR'nin yapısını değiştirebilir ve onun androjenleri bağlama aviditesini etkiler. DNA dizileme tekniklerinin gelişmesiyle birlikte AR geninin polimorfizmlerinin erkek infertilitesi ile ilişkisi üzerine yapılan çalışmalar popüler bir konu haline gelmiştir (Zhou vd., 2016). Androjen reseptörlerinin mutasyonları genellikle erkek üreme sistemi gelişimi bozukluğu olan hastalarda görülür ve bazı erkek infertilite vakalarından sorumlu olabilir. AR'nin gelişen germ hücre dizisinde ifade edilip edilmediği literatürde tartışmalı bir konudur. Genellikle etkilerini testiküler Sertoli ve peritübüler miyoid (PTM) hücreleri aracılığıyla gösterdiği düşünülmektedir (O'Hara ve Smith, 2015). Spermatogenezde AR sinyali, testosteron seviyelerinin kimyasal olarak baskılandığı kemirgen modellerinde veya AR'nin transgenik bozulmasına sahip modellerde araştırılmıştır. Bu modeller, özellikle spermatogonyal hücre sayılarının korunması, kan-testis bariyer bütünlüğü ve mayoz bölünmenin tamamlanması gibi AR sinyali gerektiren spermatogenez adımlarını kesin olarak belirlemiştir. Bu çalışmalar ile birlikte erkek doğurganlığının desteklenmesinde androjenlerin temel yapısı incelenmiştir (Hiort ve Holterhus, 2003). Testis seminifer tübüllerinin duvar yapısı spermatogenez bozukluğu olan erkeklerde sıklıkla değişir. Bu

nedenle hem Leydig hem de peritübüler hücrelerde androjen sentezini ve ekspresyonunu doğrudan düzenleyen SVIP gibi proteinlerin tanımlanması, erkek infertilite tedavisine yönelik yeni yaklaşımların geliştirilmesi için büyük öneme sahiptir (Akcan vd., 2020).

Daha önce yapmış olduğumuz primer insan testis dokusuna ait olan testis tümörü ile ilgili çalışmada seminom ve non-seminom tümör gruplarında p97/VCP proteini ile etkileşimde olduğu otofaji ve Ubikütin proteazom sistemi (UPS) ilişkili proteinlerin ekspresyonları gösterilmiştir (Nakkaş vd., 2021). Yapılan immünohistokimya boyama sonucuna göre p97/VCP, Ubikütin ve otofajik proteinlerin ekspresyonlarının tümörlü dokularda, normal dokuyla karşılaştırıldığında anlamlı derecede farklı olduğu gözlenmiştir. Biz de yaptığımız çalışmanın verilerinden yola çıkarak bu tez çalışmasında insan testis embriyonal karsinom hücre hattında SVIP, Ubikütin ve bu proteinlerin etkileşimde oldukları UPS proteinlerin (UXT ve USP26) ekspresyonlarının belirlenmesi hedefledik.

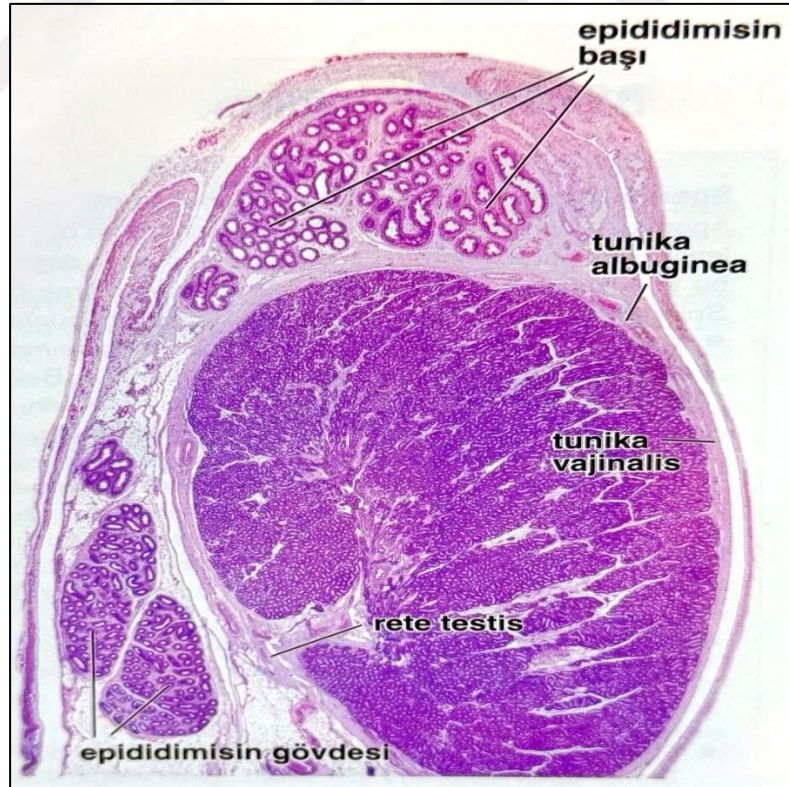
USP26 (Ubiquitin spesifik peptidase 26), insan testisinde spesifik olarak eksprese edilen bir gendir (Sakai vd., 2019). İnsanlarda USP26, Leydig hücrelerinde ifade edilir ve aynı zamanda Sertoli hücreleri ve androjen reseptörü ile birlikte lokalize olur. Ayrıca USP26'nın in vitro çalışmalarda spermatogenez ve steroid üretiminde yer alan AR hormonunun neden olduğu etkiyi düzenleyici olarak görev yaptığı bildirilmiştir (Zhou vd., 2016). UXT (Ubiquitous expressed transcript), özellikle spermatogenez mekanizmasında yer alan önemli bir proteindir. Literatürde yer alan bir çalışmada, UXT ekspresyonu durdurulmuş fare testislerinin hacminin kontrol grubuna göre daha küçük olduğu ve sperm içermediği gösterilmiştir. Böylece bu çalışmada UXT'nin spermatogenez için önemli bir protein olduğu gösterilmiştir (Schafner vd., 2018). Bu yüzden bu tez çalışmasında SVIP-USP26- UXT-AR ilişkisine bakılması insan testis biyolojisi ve infertilite mekanizmasındaki olası rollerine ışık tutması açısından önemlidir. Ayrıca SVIP'in androjene yanıt veren bir gen olarak tanımlandığı bilindiğinden ve Sertoli, Leydig ve peritübüler hücrelerde SVIP varlığının gösterilmesi ve SVIP'in erkek üreme sistemi ve infertilite ile bir ilişkisi olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca insan embriyonal karsinom hücrelerine SVIP siRNA ile transfeksiyon yapıldıktan sonra SVIP, Ubikütin ve bu proteinler ile etkileşimde olan USP26, UXT ve AR ekspresyonlarının nasıl etkileneceğini araştırmak çalışmanın hedeflerindedir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. İnsan Testis Histolojisi

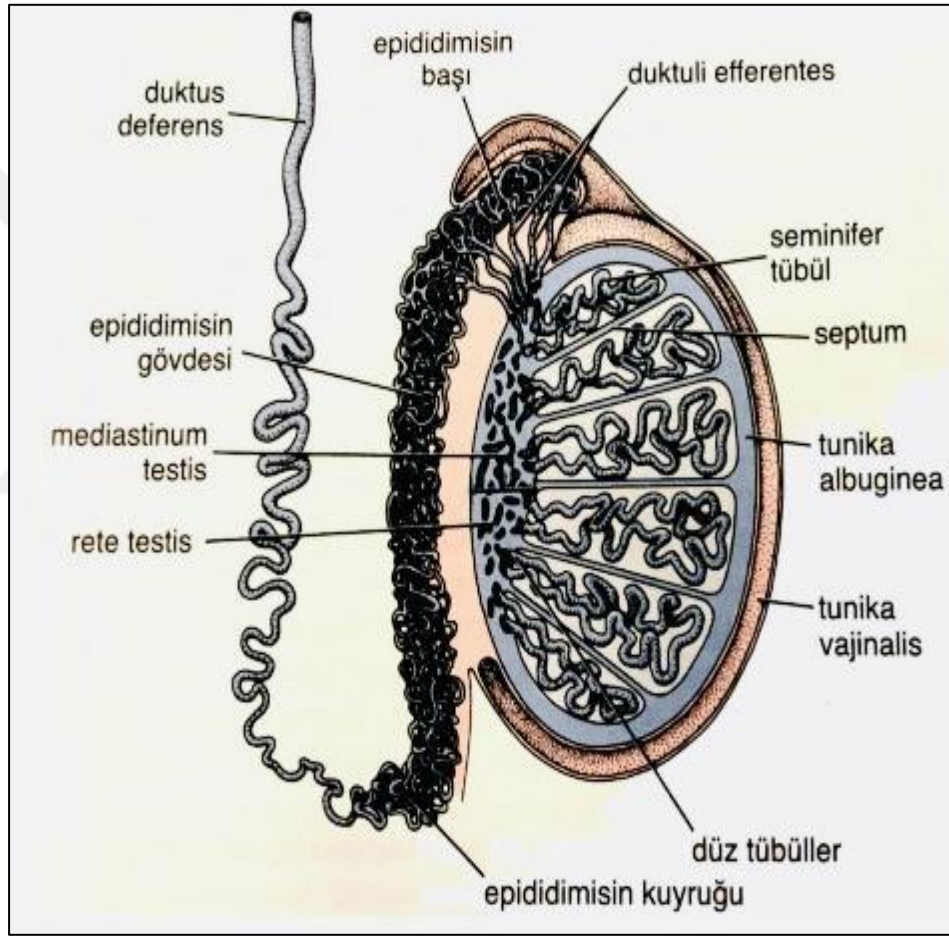
Testisler skrotumun içerisinde yer alan bir çift organdır. Spermiumların kanal yolu ile atılması ile ekzokrin, testosteron üretimi ile endokrin fonksiyona sahiptirler. Dış kısımda kalın bir kapsül ile çevrili olup bu kapsül içten dışa 3 tabakadan oluşur (Ross ve Pawlina, 2006; Eşrefoğlu, 2016).

- Tunika vasküloza: Çok sayıda kan damarı içeren gevşek bağ dokusundan oluşur.
- Tunika albuginea: Kapsülün en kalın tabakasıdır. Fibroelastik bağ dokusu içerir. Testislerin arka kısmında kalınlaşarak mediastinum testisi oluşturur.
- Tunika vajinalis: Peritonun devamıdır. Testisi dış kısımdan sarar.

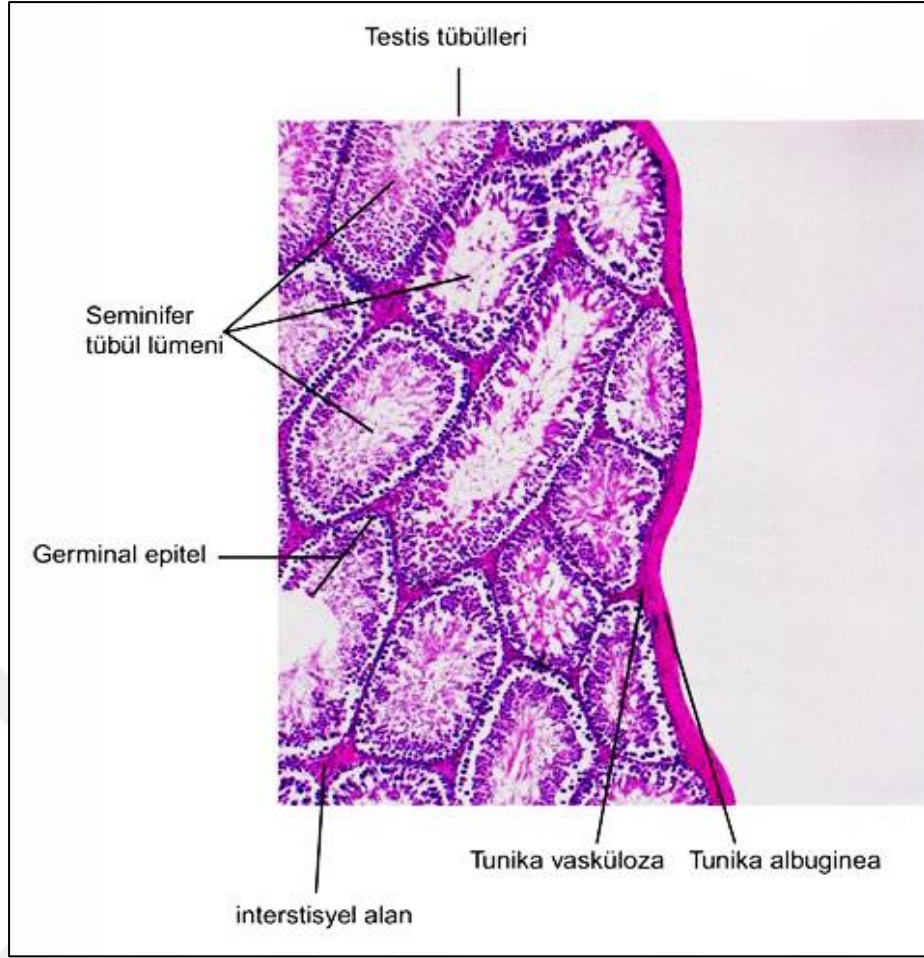


**Şekil 2.1.** Testisin genel yapısının mikroskopik gösterimi (Boya: Hematoksilen-Eozin (HE)) (Ross ve Pawlina, 2006).

Kapsülden uzanan septum yapıları testisi yaklaşık 250 lobüle ayırır. Her testis lobülü sinir, damar ve gevşek bağ dokusu ile sarılı 1-4 adet seminifer tübül içerir. Lobül yapısı aynı zamanda Leydig (interstisyel) hücrelerini içeren bağ dokusu yapısındaki stromayı da içermektedir. Kıvrımlı tübüllerin devamı niteliğindeki düz seyreden tübüller birbirleri ile anastomozlaşan kanallar olan rete testis ile devam ederler. Rete testis, duktuli efferentes aracılığı ile epididimisin baş kısmına bağlanır. Duktus epididimis duktus deferense bağlanır ve duktus deferens devamında duktus ejakulatoryus ile prostatik üretraya açılır (Ross ve Pawlina, 2006; Eşrefoğlu, 2016).



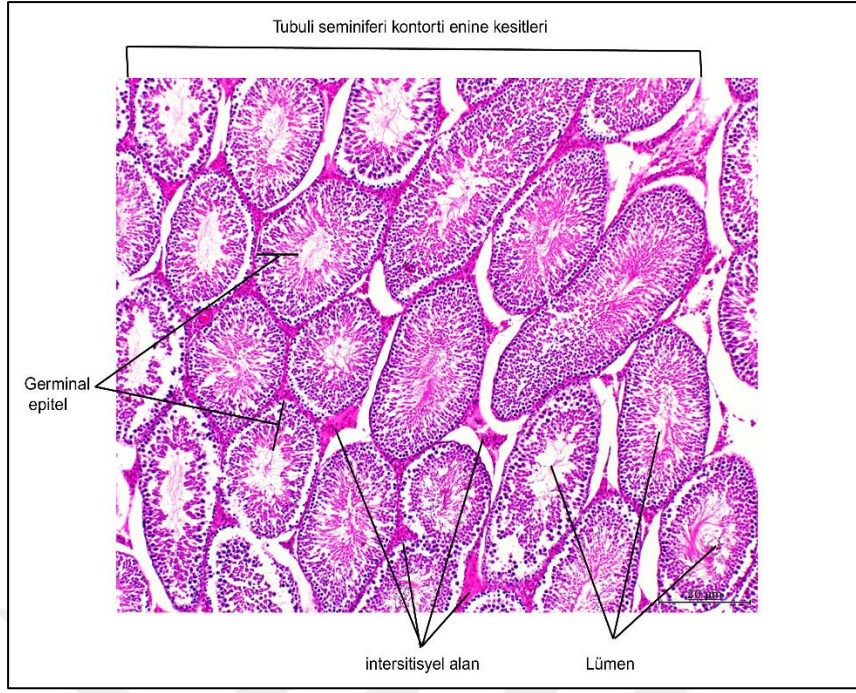
**Şekil 2.2.** Testisin şematik gösterimi (Ross ve Pawlina, 2006).



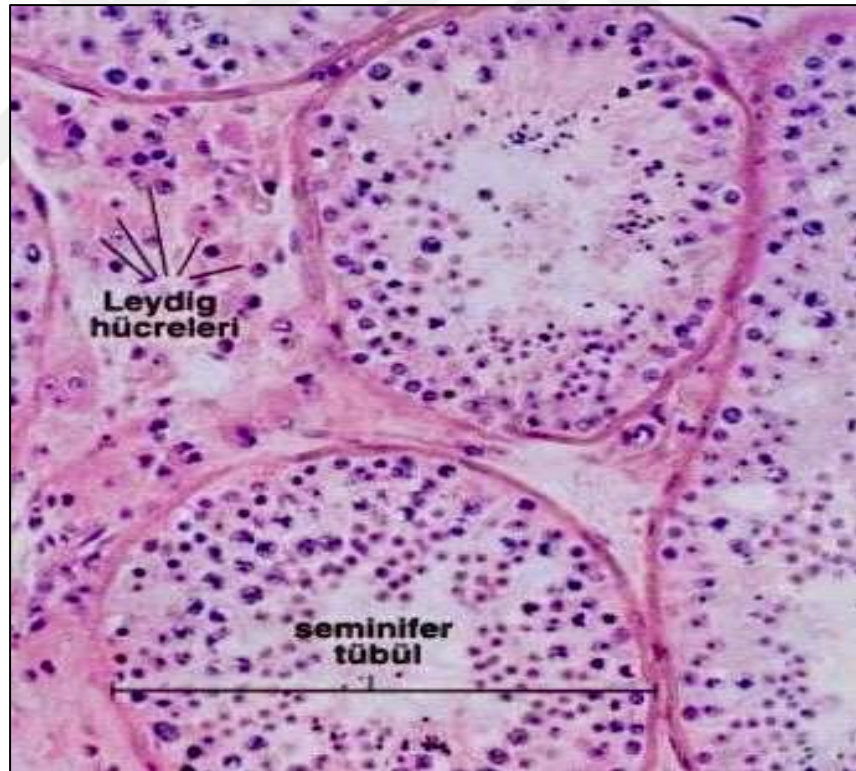
**Şekil 2.3.** Testisin histolojik görünümü (Boya: HE, Bar: 100  $\mu$ m) (Tufan, 2019).

## 2.2 Seminifer Tübüller

Testis hacminin büyük çoğunluğunu oluşturan seminifer tübüller yaklaşık 50 cm uzunluğunda ve 150 -250  $\mu$ m çapındadır. Seminifer tübülün duvarı lümenini kaplayan, çok katlı epitel olan seminifer epitel veya germinal epitel ve ince bağ dokusu yapısında olan tunika propriadan oluşur (Gartner, 2013). Tunika propria, seminifer tübüllerin bazal laminasının etrafında kollajen liflerden ve miyoid hücrelerden oluşan bağ dokusudur. Miyoid hücreler, bol miktarda aktin filamentleri içermesi sebebiyle düz kas özelliği gösterirler (Ross ve Pawlina, 2006). Seminifer epitel, Sertoli hücrelerinden ve spermatogenik seri hücrelerinden oluşur.



Şekil 2.4. Seminifer tübüllerin genel yapısı (Boya:HE, Bar: 20 µm) (Tufan, 2019).



Şekil 2.5. Seminifer tübül yapısı (Boya, HE) (Ross ve Pawlina,2006).

### 2.2.1. Sertoli Hücreleri

Sertoli hücreleri, seminifer tübüllerin epitelyal destek hücreleridir. Gelişmekte olan gonadların epitelyal cinsiyet kordonlarından kaynaklanırlar. Sertoli hücreleri, bazal membrandan lümene kadar uzanan hücrelerdir. Çoğalan ve farklılaşan germ hücrelerini çevreleyerek ve bu hücrelerin etrafında cepler oluşturarak besin sağlarlar (Ross ve Pawlina, 2006).

Sertoli hücreleri, bazal bölme (bazal laminaya yakın olan) ve adluminal bölme (lümene yakın olan) olmak üzere seminifer tübülü iki bölmeye ayıran sürekli sıkı bağlantılar ile birbirine bağlıdır. Bazı moleküllerin bazal ve adluminal bölmeler arasından geçişi gerçekleşemez ve bölmeler arasındaki bu yapıya kan testis bariyeri denir. Mitotik spermatogonya bazal bölmede kalır. Farklılaşan hücreler adluminal bölme girer (University of Leeds, 2004).

Sertoli hücreleri germ hücresi progenitörlerini destekler ve besin maddelerinin yakındaki kılcal damarlardan aktarılmasına yardımcı olur (O'Donnell vd.,2022). Gelişmekte olan spermatogonyumların beslenmesini Sertoli hücreleri sağlar. Sertoli hücreleri tarafından oluşturulan kan-testis bariyeri, gelişmekte olan spermatogonyumları, spermatositleri, spermatidleri ve olgun spermatozoayı kandan etkili bir şekilde izole eder. Farklılaşan spermatozoa, bu hücrelerin periferik sitoplazmasındaki ceplere yerleşir.

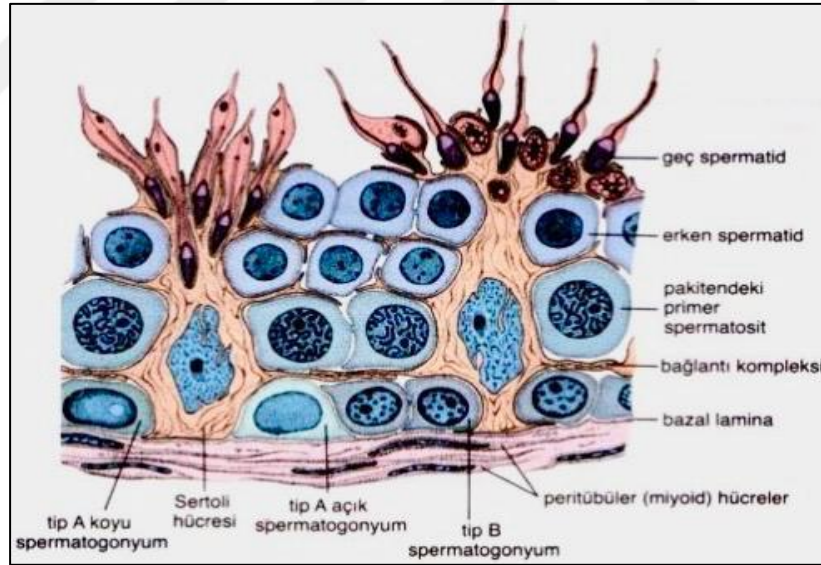
Sertoli hücreleri ayrıca spermatozoonların gelişimi için gerekli olan testosterona bağlanan ve onu konsantre eden bir protein de dahil olmak üzere testis sıvısı üretir. Ayrıca farklılaşan hücrelerin lümene translokasyonuna ve spermiyogenezden kalan fazla sitoplazmanın ve dejenere germ hücrelerinin fagositozuna yardımcı olur (Eşrefoğlu, 2016).

### 2.2.2. Spermatogenik Hücreler

Spermatogenik hücreler mitozla bölünür, ardından mayoz bölünmeyle gametler oluşturulur ve bunlar spermiyogenez süreciyle sperme olgunlaşır. Gelişen spermatogenik hücreler, olgun bir spermatozoon oluşana kadar sitoplazmik köprülerle bağlı kalır.

Spermatogenik hücreler, 4-8 katlı hücre tabakaları şeklinde dizilim gösterirler. Olgunlaşmamış haldeki spermatogonyum hücreleri bazal laminanın üzerinde yerleşim gösterirler. Spermatogonyal kök hücreden köken alan spermatogonyumlar, puberte döneminde mitoz hücre bölünmesi geçirir ve 3 tip spermatogonyaya oluşur.

- Tip A (koyu); rezerv kök hücreler olan spermatogonyumlardır.
- Tip A (açık); kök hücreleri yenileyen spermatogonyumlardır. Açık A spermatogonyumun yeni spermatozoon oluşturması yaklaşık 2 ay sürer.
- Tip B; farklılaşan progenitörler olan spermatogonyumlardır ve spermatozoonları oluştururlar (Ross ve Pawlina, 2006).

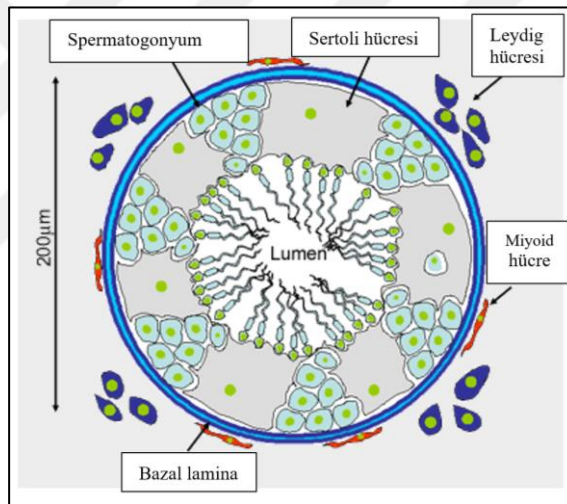


**Şekil 2.6.** İnsan seminifer epitelinin şematik gösterimi (Ross ve Pawlina, 2006).

### 2.2.3. Leydig Hücreleri

Leydig hücreleri 'interstisyel' hücrelerdir, tübüllerin arasında yer alırlar. Çok sayıda kolesterol-lipid damlacığı içerdikleri için soluk boyanan sitoplazmaları vardır. Leydig hücreleri, hipofizden gelen lutenizasyon hormonuna (LH) yanıt olarak testosteron üretir ve salgılar. Kolesterol, testosteron üretiminin ilk aşamasında kullanılır.

Testosteron spermatozoa üretimini, aksesuar cinsiyet bezlerinden salgıyı ve erkek ikincil özelliklerinin kazanılmasını teşvik eder. Bu süreç, LH'nin Leydig hücrelerini testosteron üretmesi için uyardığı ergenlik sonrası başlar. Folikül uyarıcı hormon (FSH), Sertoli hücrelerini seminifer tübüllerin lümenine androjen bağlayıcı protein salgılaması için uyarır. Testosteronun lümeninde bağlanması, gelişen spermatogonyaya için yerel bir testosteron kaynağı sağlar.



**Şekil 2.7.** Seminer tübül ve tübülün dışındaki interstisyel dokudaki hücrelerin şematik çizimi (University of Leeds, 2004).

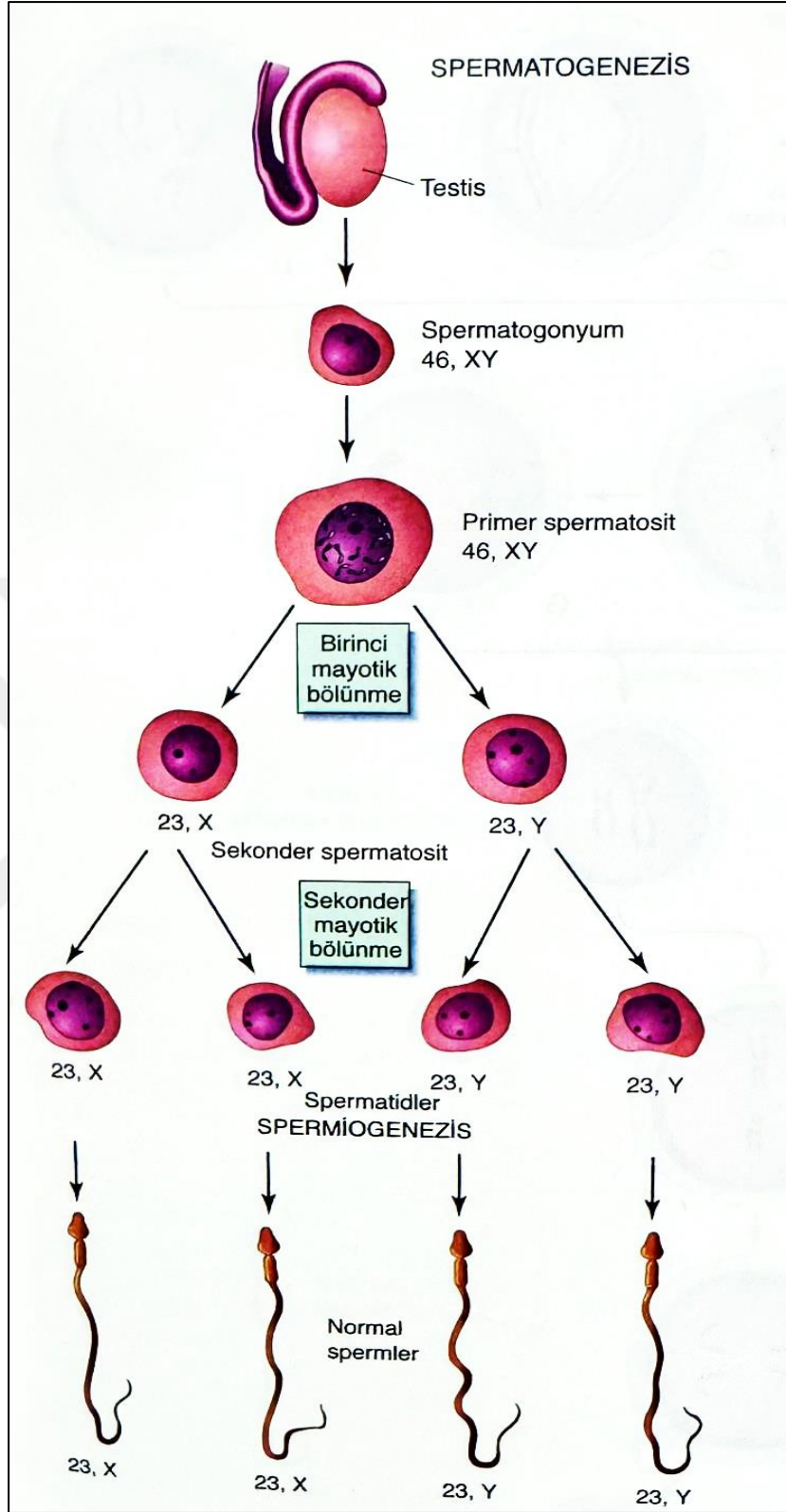
### 2.3. Spermatogenez

Gamet (sperm ve yumurta) üretimi, gametogenez (spermatogenez ve oogenez) adı verilen bir prosedürdür. Spermatogenezde, mayoz bölünmeyle üretilen dört gametten her biri olgun bir spermatozoona dönüşür.

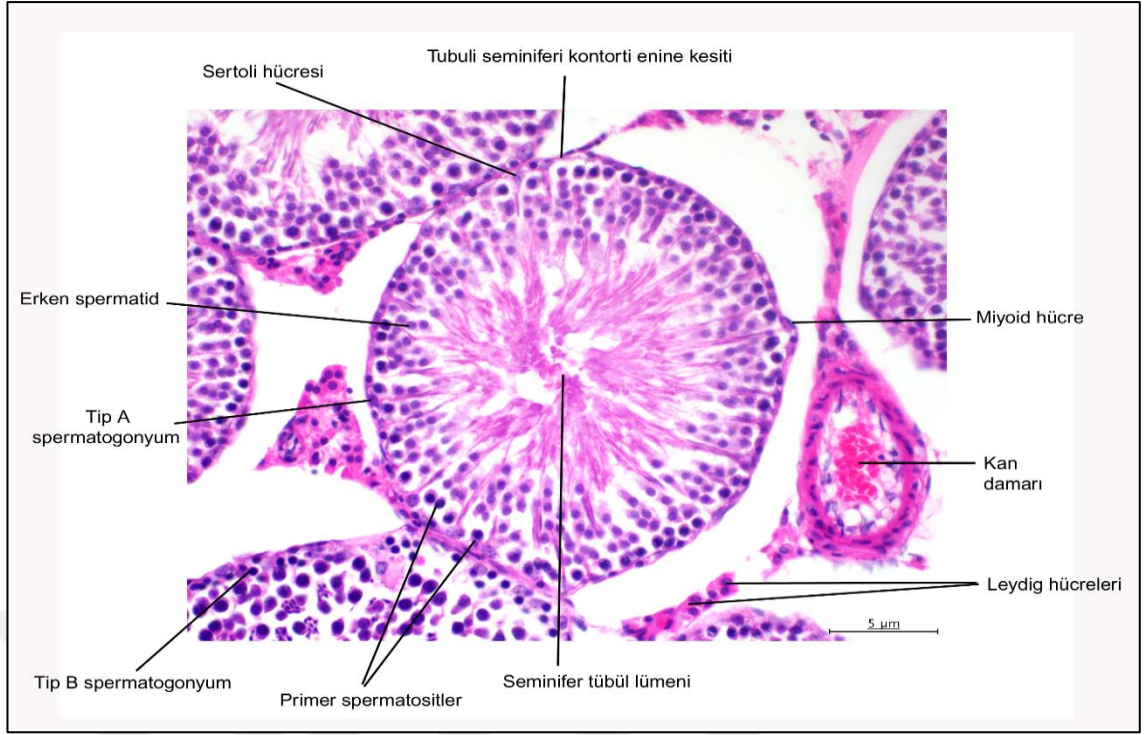
Spermatogenezde ilkel germ hücreleri ergenlikten önce az sayıda bulunur. Ergenlikten sonra testosteronun etkisiyle seminifer tübüllerde ön hipofiz gonadotropik hormonlarının uyarması sonucu spermatogenez meydana gelir.

Seminifer túbüllerin germinal epiteli, spermatogenik seri hücrelerini ve Sertoli hücrelerini içerir. Spermatogenezin ilk aşamasında spermatogonya, Sertoli hücreleri arasından seminifer túbülün merkezi lümenine doğru göç eder. Spermatogenik hücreler mitozla bölünür, ardından mayoz bölünmeyle gametler oluşturulur ve bunlar spermiyogenez süreciyle sperme olgunlaşır. Spermatogenik seri hücreleri, olgun bir spermatozoon oluşana kadar sitoplazmik köprülerle birbirlerine bağlı kalır (Eşrefoğlu, 2022).

Bariyeri geçerek adlüminal bölüme giren spermatogonya, büyük primer spermatositleri oluşturacak şekilde giderek değişir ve genişler. Primer spermatositlerin her biri mayoz bölünmeye uğrayarak iki sekonder spermatosit oluşturur. Daha sonra bunlar da bölünerek spermatidleri oluşturur ve en son aşamada spermatidler de spermatozoon (sperm) haline gelir (Moore vd., 2018).



**Şekil 2.8.** *Spermatogenezin şematik gösterimi (Moore vd., 2018).*



**Şekil 2.9.** Spermatogenik seri hücrelerinin histolojik görünümü (Boya, HE, Bar: 5 µm) (Tufan, 2019).



**Şekil 2.10.** Spermatogenik seri hücrelerinin histolojik görünümü (Boya: HE, Bar: 2 µm) (Tufan, 2019).

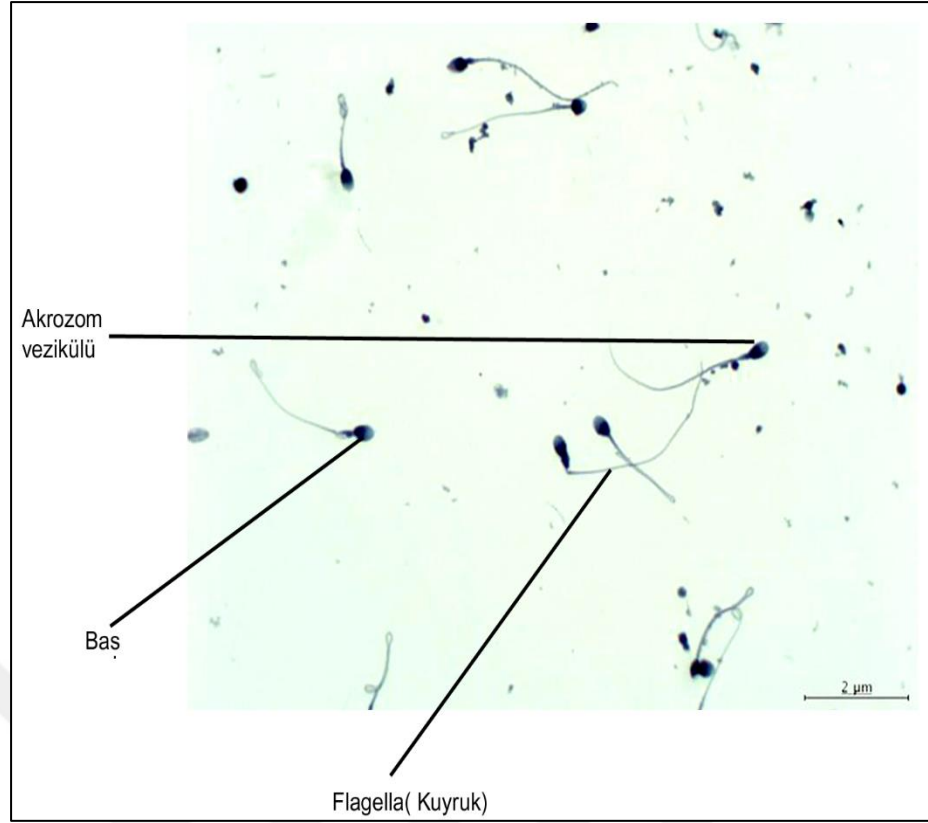
Spermatisit aşamasından spermatid aşamasına geçiş sırasında spermatisitin 46 kromozomu (23 çift kromozom) ayrılır ve 23 kromozom bir spermatide, 23 kromozom da ikinci spermatide gider. Bu aynı zamanda kromozomal genleri de böler, böylece fetüsün genetik özelliklerinin yarısı baba tarafından sağlanırken diğer yarısı anne

tarafından sağlanan oositten elde edilir. İnsanda spermatogonyadan spermatozoaya kadar spermatogenezin tüm periyodu yaklaşık 74 gün sürer (Moore vd., 2018).

### **2.3.1. Spermatogenez Sürecinin Önemli Noktaları**

Cinsiyet Kromozomları: Her bir spermatogonyumdaki 23 çift kromozomdan biri, doğacak çocuğun cinsiyetini belirleyen genetik bilgiyi taşır. Bu çift, dişi kromozomu olarak adlandırılan bir X kromozomu ve erkek kromozomu olan bir Y kromozomundan oluşur.

Sperm Oluşumu: Spermatidler ilk oluştuğunda hala epiteloid hücrelerin olağan özelliklerine sahiptirler, ancak kısa süre sonra farklılaşmaya ve uzamaya başlarlar. Her sperm bir baş ve bir kuyruktan oluşur. Baş, yüzeyi çevresinde yalnızca ince bir sitoplazmik tabaka ve hücre zarını barındıran yoğunlaştırılmış çekirdeği içerir. Başın ön üçte ikisinin dış tarafında, esas olarak Golgi aygıtından oluşan, akrozom adı verilen kalın bir başlık bulunur. Bu, hyaluronidaz (dokulardaki proteoglikan filamentlerini sindirebilen enzim) ve güçlü proteolitik enzimler (proteinleri sindirebilen) dahil olmak üzere, diğer hücre lizozomlarında bulunanlara benzer bir dizi enzim içerir. Bu enzimler spermin yumurtaya girip onu döllemesinde önemli rol oynar. Flajellum adı verilen sperm kuyruğunun üç ana bileşeni vardır: (1) toplu olarak aksonem adı verilen, 11 mikrotübülden oluşan merkezi bir iskelet; bunun yapısı, diğer hücre türlerinin yüzeylerinde bulunan silyumlarınkine benzer. ; (2) aksonemi kaplayan ince bir hücre zarı; ve (3) kuyruğun proksimal kısmında (kuyruğun gövdesi olarak adlandırılır) aksonemi çevreleyen bir mitokondri topluluğu. Kuyruğun ileri-geri hareketi (kamçı hareketi) spermin hareketliliğini sağlar. Bu hareket, aksonemi oluşturan ön ve arka tübüller arasındaki ritmik uzunlamasına kayma hareketinden kaynaklanır. Bu işlem için gereken enerji, kuyruk gövdesindeki mitokondriyumlar tarafından sentezlenen adenosin trifosfat formunda sağlanır. Normal sperm sıvı bir ortamda 1 ila 4 mm/dakika hızla hareket eder. Bu onların yumurtayı bulmak için kadın genital yolundan geçmesine olanak tanır (University of Leeds, 2004).



**Şekil 2.11.** Sperm yapısı (Boya: Papa nicolau, Bar: 2 µm) (Tufan, 2019).

### 2.3.2. Spermatogenezi Uyarıcı Hormonal Faktörler

Spermatogenezde rol oynayan önemli hormonlar şu şekildedir;

1. Testosteron: Testisin interstisyumunda yer alan Leydig hücreleri tarafından salgılanır. Sperm oluşumunun ilk aşaması olan testis germinal hücrelerinin büyümesi ve bölünmesi için gereklidir.
2. Luteinize Edici Hormon (LH): Ön hipofiz bezinden salgılanır ve Leydig hücrelerini testosteron salgılaması için uyarır.
3. Folikül Uyarıcı Hormon (FSH): Ön hipofiz bezi tarafından salgılanır ve Sertoli hücrelerini uyarır. Bu uyarı olmadan spermatidlerin sperme dönüşümü (spermiyogenez süreci) gerçekleşmez.
4. Büyüme hormonu: Testislerin arka plandaki metabolik fonksiyonlarını kontrol etmek için gereklidir. Büyüme hormonu özellikle spermatogonyumların erken bölünmesini sağlar.

### **2.3.3. Epididimiste Spermin Olgunlaşması**

Sperm olgunlaşması, fizyolojik faktörleri ve biyolojik mekanizmaları içeren karmaşık bir süreçtir. Testislerdeki seminifer tübüllerden epididimise kadar her adım olgun ve sağlıklı sperm hücrelerinin üretilmesinde önemli bir rol oynar. Spermatogenez mekanizması ile üretilen spermlerin olgunlaşmasının gerçekleştiği yer epididimistir. Burada amaç olgunlaşmamış spermin üç bölgesi (baş, gövde ve kuyruk) boyunca tamamen olgunlaşıp aktif hale gelinceye kadar depolanmasına ve taşınmasına yardımcı olmaktır. Seminifer tübüllerden ve epididimisin ilk kısımlarından alınan spermler hareketsizdir ve bir yumurtayı dölleyemezler. Bununla birlikte, sperm epididimiste 18 ila 24 saat kadar kaldıktan sonra, epididimis sıvısındaki bazı inhibitör proteinler ejakülasyon sonrası hareketlilik kabiliyetini geliştirirler. Seminifer tübüllerde oluştuktan sonra spermin epididimiste bulunan 6 metre uzunluğundaki tübülden geçmesi birkaç gün sürer. Bu süreçte yavaş yavaş hareket kabiliyeti ve membran protein içeriği gibi özellikleri geliştirerek sonunda bir yumurtayı döllemelerini sağlar (Cooper, 2007; Sullivan ve Miessset, 2016).

### **2.3.4. Spermin Depolanması**

Yetişkin bir insanın iki testisi her gün 120 milyona kadar sperm oluşturur. Sperm hücresinin, olgun bir sperm olma aşamasına kadar gereken süre yaklaşık 74 gündür. Oluşan bu olgun spermler epididimide depolanır. Epitel hücreler bu depolanmaya yardımcı olan faktörleri salgılar. Bu faktörlerin görevi, depolama sırasında spermi hareketsiz bir durumda tutmak için tasarlanmış bir lümen ortamı sağlamaktır. Bu hareketsiz duruma ilişkin pek çok faktör hala bilinmemekle birlikte, lüminal pH'ın düzenlenmesinin ve spesifik protein ve enzimlerin varlığının bir rol oynadığı düşünülmektedir (James vd, 2020).

### **2.3.5. Olgun Sperm Fizyolojisi**

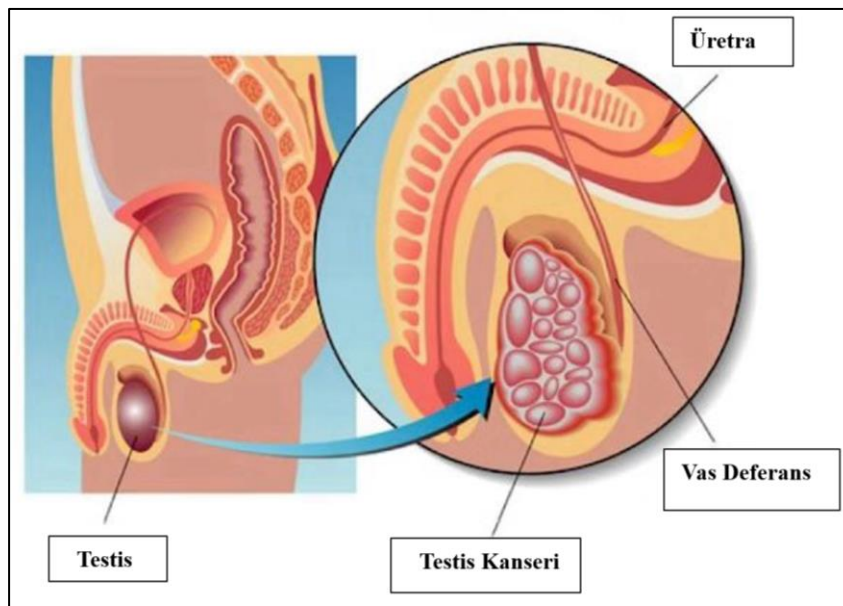
Normal hareketli sperm, sıvı ortamda 1 ila 4 dakika arasında kamçılı hareket etme kapasitesine sahiptir. Spermin aktivitesi, ejakülatlı semende olduğu gibi nötr veya hafif alkali bir ortamda büyük ölçüde artar, ancak hafif asidik bir ortamda büyük ölçüde baskılanır. Güçlü bir asidik ortam spermin hızlı ölümüne neden olabilir. Sıcaklık arttıkça spermin aktivitesi belirgin şekilde artar, ancak metabolizma hızı da artar, bu da spermin

ömrünün önemli ölçüde kısalmasına neden olur. Sperm testislerin genital kanallarında baskılanmış halde haftalarca yaşayabilmesine rağmen, ejaküle edilen spermin kadın genital kanalında yaşam beklentisi sadece 1-2 gündür (Roldan ve Teves, 2020).

#### 2.4. Testis Kanseri

Testis kanserleri, testis hücrelerinde gelişen kanser türlerinin genel adıdır. Genellikle bir tane testis etkilenir, ancak bazı durumlarda her ikisi de etkilenebilir. Testis kanseri büyüdükçe lenf nodlarına yayılabilir. Testis kanserlerinin yaklaşık %90-95'i öncül hücreler olan germ hücrelerinden kaynaklanır.

Testis kanserleri 15-34 yaş arası erkeklerde en sık görülen solid tümörlerdir. Testis tümörlerinin bilinen kesin bir nedeni olmamakla birlikte germ hücreli tümörlerin etyolojisinde hem doğumsal hem edinsel faktörlerin önemli olduğu bilinmektedir (Van Der Zwan vd.,2013). Fetal dönemde testisler karın içinde gelişir. Gelişen testisler skrotuma doğru hareket eder. Testis kendiliğinden inmiyorsa operasyon uygulanır. İnmemiş testis ile doğan kişilerde testis kanseri gelişme olasılığı daha yüksektir. Aile öyküsü etkili olabilir. Babası veya kardeşi testis kanseri olanlarda, testis kanseri görülme riski daha fazladır. Doğumsal dış genital organ anomalisi olanlarda testis kanseri gelişme riski daha yüksek olur (Smith vd., 2018; Yazici vd., 2023).



Şekil 2.12. Testis Kanseri şematik gösterimi (Napuri, 2016).

Testis kanserleri bazı durumlarda semptom göstermeyebilir. En sık görülen semptom testislerde şişme ve morfolojik değişikliklerdir. Ayrıca testis dokusunda ağırlık artışı ve hassasiyet de görülebilir. Fiziksel muayene, ultrasonografi, kan testleri ve bilgisayarlı tomografi taraması sonuçları testis kanseri ihtimalini düşündürür. Ancak bu testler direk tanı için yeterli olmaz. Tanıda altın standart, etkilenen testisin cerrahi olarak çıkarılmasıdır. Bu operasyona orşiektomi denir. Testis kanseri genellikle yalnızca bir testiste görülür. Bu nedenle her iki testisin de alınması nadirdir. Eğer her iki testis de alınırsa testosteron üretilemez ve bu durum infertiliteye neden olur (Yılmaz ve Yuvaç, 2022).

Testis kanseri için çeşitli evreleme sistemleri vardır ancak en sık kullanılan Tümör-Nod-Metastaz (TNM) sistemidir (Tablo 2.1).

**Tablo 2.1.** *TNM sınıflandırma sistemi (Cancer Council, 2023).*

<b>T (Tumour)</b>	Tümörün yalnızca testis bölgesinde olup olmadığını açıklar. Sadece testis de ise T1, yakınındaki kan damarlarına ya da dokuya yayılmış ise T2, T3 veya T4 olarak sınıflandırılır.
<b>N (Nodes)</b>	Tümörün lenf nodlarına yayılıp yayılmadığını açıklar. Eğer yayılmadıysa N0, lenf nodlarına yayıldıysa N1 veya N2 olarak sınıflandırılır.
<b>M (Metastasis)</b>	Tümörün uzak bölgelere yayılıp yayılmadığını açıklar. Eğer yayılmadıysa M0, lenf düğümleri, organlar veya kemiklere yayıldıysa M1 olarak sınıflandırılır.

Bu sınıflandırmaya göre testis kanseri için evreleme yapılır.

Evre 1: Erken evre olarak tanımlanır. Kanser sadece testiste bulunur.

Evre 2: Kanser testis dışında yakındaki lenflere de yayılmıştır.

Evre 3: İleri evre olarak tanımlanır. Kanser vücudun uzak bölgelerine de yayılım göstermiştir.

Belirlenen evreye göre tedavi aşamasına geçilir. Kişinin genel sağlığı, sahip olduğu testis kanseri türü (Seminom veya non-seminom), tümörün boyutu, kan testinde tümör belirteç seviyeleri ve kanserin yayılıp yayılmadığı tedaviyi etkileyen faktörlerdir.

Testis kanseri için kemoterapi gören kişilerde lösemi riski biraz daha yüksektir. Radyasyon tedavisi gören kişilerde, radyasyona maruz kalan bölgelerde ikinci bir kanser gelişme riski daha yüksektir. Bazı kişilerde testis kanseri tedavisi sonrası düşük testosteron seviyeleri görülür. Düşük testosteron seviyesi cinsel istediğ azalması gibi sorunlara neden olabilir. Kemoterapi ve radyasyon tedavisi sperm üretimini azaltabilir veya sağlıklı spermelere neden olur. Bu etkiler geçici veya kalıcı olabilir (Cancer Council, 2023).

Az sayıda testis tümörü, testiste destekleyici ve hormon üreten hücrelerde başlar. Bunlara stromal tümör denir. 2 ana tipi vardır; Leydig ve Sertoli hücre tümörleri. Genellikle iyi huylu seyrederekler.

Genel olarak testis tümörleri Germ hücreli tümörler ve Non-germ hücreli tümörler olmak üzere 2 ana gruba ayrılır. Germ hücreli tümörlerde kendi içerisinde Seminom ve Non-seminom (embriyonal karsinom, Yolk sac, Teratom, Koryokarsinom) olmak üzere ayrılır. Non-germ hücreli tümörler ise Leydig hücreli tümörler, Sertoli hücreli tümörler, Gonodblastom ve Sekonder tümörler olmak üzere ayrılır (Reuter, 2005).

#### **2.4.1. Germ Hücre Tümörleri**

Dünya Sağlık Örgütü'nün yapmış olduğu sınıflandırmaya göre, germ hücreli tümörler tüm testis kanserlerinin yaklaşık %95'ini oluşturur (Baird vd., 2018). Germ hücreleri vücuttaki iki hücre tipinden biridir. Germ hücreleri, pluripotent kök hücrelerden oluşur. Pluripotent kök hücreler vücuttaki herhangi bir hücreye dönüşebilir veya farklılaşabilir. Böylece pluripotent kök hücreler germ hücreleri veya somatik hücreler haline gelebilir. Pluripotent kök hücrelerin diğer hücre tiplerine dönüşme sürecine kimyasal sinyalleşme aracılık eder. Sinyal görevi gören kimyasallar arasında büyüme faktörleri ve hormonlar bulunur. Normal sinyallere yanıt vermeyen kök hücreler, kontrolsüz bir şekilde büyüyerek germ hücre tümörlerine neden olabilir.

Germ hücre tümörleri, Seminom ve non-seminom olmak üzere iki ana gruba ayrılır (Tablo 2.2). Germ hücreli tümörlerin gelişiminde genetik ve çevresel faktörler rol oynamaktadır. Germ hücreli tümörlerin gelişimine ilişkin en kabul edilen teori,

fetal gonositlerin anormal hücre bölünmesine uğramasına neden olan bir başlatıcı olayı içermektedir (Hardell vd., 1998; Oosterhuis ve Looijenga, 2003).

**Tablo 2.2.** *Germ hücreli tümörlerin sınıflandırılması.*

<b>Seminom</b>	<b>Non-seminom</b>
Yavaş gelişme eğilimindedirler.	Hızlı gelişme eğilimindedirler.
Genellikle 25-45 yaş arasında görülür.	Genellikle 10-25 yaş arasında görülür.
	4 ana tipi vardır (Embriyonal karsinom, Yolk Sac tümörü, Koryokarsinom, Teratom).

#### Testis Embriyonal Karsinom:

Embriyonal karsinom en sık görülen ve genellikle vücudun diğer bölgelerine metastaz yapan agresif bir germ hücreli tümördür. En yüksek insidans 20-30 yaş arası kişilerde görülür (Gerber vd., 2017). Embriyonal karsinom, belirgin pleomorfizm ve çeşitli histolojik paternlere sahip primitif epitelyal hücrelerle karakterize edilen bir germ hücreli tümördür. Saf formda mevcut olabilir ancak sıklıkla karışık germ hücreli tümörün bir parçasıdır. Saf germ hücreli tümörlerin yaklaşık %3-10'u embriyonal karsinomlardır ve embriyonal karsinomlar, karışık germ hücreli tümörlerin %80'inden fazlasında mevcuttur (Iczkowski, 2023). Diğer germ hücreli tümörlerde olduğu gibi, embriyonal karsinomlarında intratübüler malign germ hücrelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Germ hücreli tümörler, OCT3/4 ekspresyonu tarafından yönetilen pluripotent hücreler gibi normal embriyogenezin birçok özelliğini gösterir (De Jong, 2007). Aslında metilasyon çalışmaları, epigenetik fenomenin germ hücreli neoplazilerin oluşumunda önemli bir rol oynayabileceğini göstermiştir (Hatada vd., 2008).

Embriyonal karsinomlar testis parankiminde bulunur. Bu tümörler genellikle seminomlardan daha küçüktür. Testisin tamamını değiştirmezler ancak paratestiküler dokuyu (tunika albuginea yoluyla), rete testisi ve epididimisi istila etme eğilimleri vardır (Sharp ve Mitchell, 2013). Vasküler invazyon yaygındır.

Embriyonal karsinomun nedeni tam olarak bilinmemektedir. Germ hücrelerin anormal farklılaşmasının etkili olduğu düşünülmektedir. Ancak bunun mekanizması ile ilgili literatürde yeterli açıklayıcı çalışma bulunmamaktadır.

Embriyonel karsinomun aşamaları şu şekildedir;

Aşama 0: Bu aşama kanser öncesi olarak kabul edilir ve henüz gerçek bir tümör olmadığından "in situ" olarak adlandırılır. Ancak kanser hücreleri mevcut ve çoğalmaya başlamıştır.

Aşama 1: Tümör hala testiste lokalizedir. Aşama 1'in üç alt grubu vardır: IA, IB ve IS. Bu, tümör istilasının testis dokusunun ne kadar derininde olduğunu gösterir.

Aşama 2: Kanser, midenin arkasındaki ve altındaki lenf düğümleri ve pelvis gibi testisin yakınındaki bölgelere yayılmıştır.

Aşama 3: Kanser, lenf düğümlerinin ötesine geçerek göğüs ve akciğerler gibi diğer organ ve dokulara yayılmıştır (Cancer Council, 2023).

Daha önce yapmış olduğumuz insan testis dokusuna ait olan testis tümörü ile ilgili çalışmadan yola çıkarak, bu çalışmamızda germ hücre tümörleri içerisinde non-seminom grupta en sık görülen tümöre ait olan insan testis embriyonel karsinom hücre hattını seçtik. Bir önceki çalışmamızda immünohistokimyasal boyama ile yaptığımız analizleri burada protein ve gen düzeyinde de çalışarak bir adım ileri götürmeyi hedefledik.

## **2.5. Testis Kanseri ve İnfertilite**

Testis kanseri ve erkek infertilitesi arasındaki ilişki tıp literatüründe yaygın olarak tanımlanmaktadır. Testis kanseri infertilite nedeni olabilir ya da her iki durum ortak etiyolojik faktörün sonucu olarak ortaya çıkabilir. Kanserin fertilité üzerine etkisinin yanı sıra testis tümörlerinde tümöre yakın olan parankim doku hasarı, B-hCG veya parakrin faktörlerin sekresyonu ve kan akımında meydana gelen değişim sonucu spermatogenez mekanizması etkilenebilir (Büyükalpelli vd., 2015).

Erkek infertilitesinin testis kanseri için iyi tanımlanmış bir risk faktörü olduğu tespit edilmiştir. Erkek infertilitesine yol açan spesifik durumlar bu riski azaltabilir veya artırabilirken, çeşitli çalışmalar erkek infertilitesi ile testis kanseri arasında genel bir ilişki olduğunu göstermiştir. Bu ilişki ortak etyopatoloji bulguları, histolojik kanser öncesi ilişkiler ve popülasyona dayalı kanıtlarla desteklenmektedir. Bu nedenle

infertilite problemi olan tüm hastalar için kapsamlı bir risk değerlendirmesi yapılması gerekmektedir. Bu değerlendirme klinik öykü, ultrason muayenesi ve semen analizi parametrelerine dayanarak gerçekleştirilir. Yapılandırılmış bir takip programının uygulanması ve devam ettirilmesi testis kanserinin ve preinvaziv lezyonların invaziv olmayan tanısı için yeni araçların geliştirilmesi, erkek infertil hastalara büyük fayda sağlayacaktır. Bu ilerlemeler erken tespit ve müdahaleyi mümkün kılacak ve sonuçların ve yönetimin iyileşmesine yol açacaktır (Maiolino vd., 2023).

Testis kanseri çeşitli nedenlerden dolayı erkek üreme potansiyeli için önemli bir risk faktörüdür. Tüm kanserler erkeklerin üreme sağlığını etkileyebilir ve muhtemelen germ hücrelerinde önceden var olan kusurlar, kanserin sistemik etkileri ile birlikte endokrin ve immünolojik sistemlerdeki bozukluklar da ortaya çıkmaktadır (Agarwal, 2005). Ancak kanserler arasında testis kanseri semen kalitesi üzerinde en fazla etkiyi göstermektedir. Oligospermi, testis kanserli erkeklerin tedavi öncesi semen numunelerinin %52'sinde bulunurken, diğer kanserli erkeklerde bu oran %12-30'dur (Williams, 2009). Dahası, seminomların sperm üretimi üzerinde seminom dışı tümörlere göre daha önemli bir etkiye sahip olduğu görülmektedir ve hatta iyi huylu tümörlerin bile sperm üretimi üzerinde etkisi olduğu görülmektedir (Rives vd., 2012).

Testis kanserinin tedaviye bağlı faktörleri, erkek üreme potansiyelini etkileyebilir. Hem orşiektomide (Petersen vd.,1999; Jacobsen vd., 2001) hem de testis koruyucu cerrahide cerrahi hasar meydana gelir, ancak ikinci durumda sperm parametrelerinde ameliyat sonrası anlamlı bir düşüş görülür (Ory vd., 2021). Kemoterapi ve radyoterapi tedavilerinin de olumsuz etkileri vardır. Testis kanseri tedavilerinin kümülatif zararlı etkileri vardır; çünkü ameliyat artı kemoterapi ve radyoterapi gören hastalar en düşük sperm konsantrasyonu değerlerini gösterirler (Ping vd., 2014; Okada vd., 2019).

## 2.6. Small Valosin Interacting Protein (SVIP)

Küçük VCP ile etkileşen protein olan SVIP, endoplazmik retikulum (ER) ilişkili protein yıkımında görev alan ve ATPaz olan p97/VCP'ye bağlanarak fonksiyonunu düzenleyen bir proteindir. Yapılan çalışmalarda SVIP'in p97/VCP ile etkileşerek otofajiyi düzenlediği gösterilmiştir (Nagahama vd., 2003). SVIP'in tümör baskılayıcı rolü tanımlanmış ve SVIP'in ekspresyonunun artan ER stres ve kanser büyümesinin inhibisyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Llinàs-Arias vd., 2019).

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda SVIP'in merkezi ve periferik sinir sisteminde lokalize olduğu gösterilmiştir. Ayrıca son çalışmalarda, SVIP ve p97/VCP'nin nöronal hücre gövdesinde kolokalizasyon gösterdiği bulunmuştur (Wu vd., 2013). Endoplazmik retikulum ilişkili protein yıkımının (Endoplasmic reticulum associated protein degradation- ERAD) işlevselliğini koruyan SVIP'in sinir sistemi haricindeki doku ve hücrelerdeki ekspresyonu hakkında literatürde çok az çalışma vardır. Fare testis dokusunda yapılan bir çalışmada Leydig hücrelerinin sitoplazmasında SVIP'in eksprese edildiği gösterilmiştir. Leydig hücrelerinde SVIP'in tam rolü açıklığa kavuşturulamasa da, SVIP varlığı ve lokalizasyonu ile ilgili önemli ipuçları verilmiştir. Prepuberte döneminde ve erişkin yaşamında, SVIP Leydig hücrelerinde olduğu gibi Sertoli hücrelerinin sitoplazmasında da bulunmuştur. SVIP geni androjene yanıt veren bir gen olarak tanımlanmıştır ve ekspresyonunun androjenler tarafından düzenlediği gösterilmiştir. Androjenlerin yüksek oranda eksprese edildiği fare testisinde SVIP'in hücrel lokalizasyonu ve ekspresyonu immunohistokimyasal analizler ve western blot analizi ile gösterilmiştir. Akcan vd. (2020)'nin çalışması, testiste SVIP varlığını gösteren ilk çalışmadır.

## 2.7. Androjen Reseptör (AR)

Androjenler çok önemli steroid hormonlardır ve ikincil cinsiyet özellik gelişimi, spermatogenezin başlatılması ve sürdürülmesi gibi birçok erkek üreme sistemi fonksiyonunun düzenlenmesini sağlarlar.

AR, ligand bağımlı bir transkripsiyon proteini ve vücutta yaygın olarak bulunan steroid reseptör süper ailesinin bir üyesi olarak androjenlerin fonksiyonunun ayarlanmasında ve spermatogenezde önemli rol oynar (Wang vd., 2009). Androjenler,

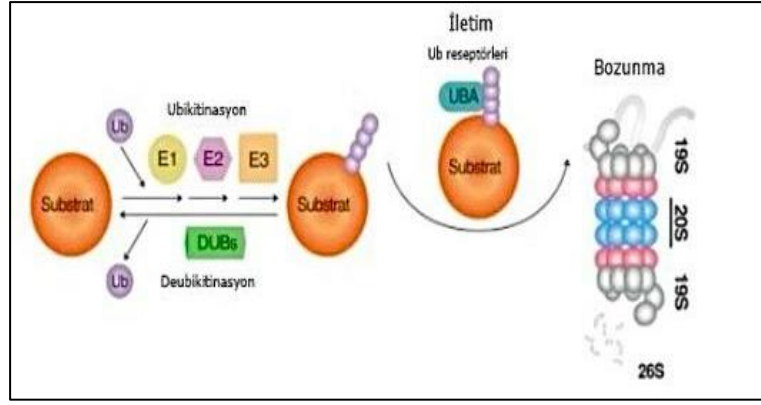
AR'ye bağlanarak hedef genin ekspresyonunu başlatır ve spermatogeneze katılır. AR geninin polimorfizmleri AR'nin yapısını değiştirebilir ve onun androjenleri bağlama aviditesini etkiler. DNA dizileme tekniklerinin gelişmesiyle birlikte AR geninin polimorfizmlerinin erkek infertilitesi ile ilişkisi üzerine yapılan çalışmalar popüler bir konu haline gelmiştir (Zhou vd., 2016).

AR mutasyonları genellikle erkek üreme sistemi gelişimi bozukluğu olan hastalarda görülür ve bazı erkek infertilite vakalarında sorumlu olabilir. Androjenler eylemlerini AR yoluyla gösterir ve testisteki sinyalizasyonları spermatogenez için esastır. AR'lerin testis dokusunda Leydig, Sertoli ve peritübüler hücrelerde olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte AR'nin germ hücrelerindeki ekspresyonu tartışmalıdır (Johnston vd., 2001). Testis dokusundaki germ hücrelerinde AR'nin varlığını da yokluğunu da destekleyen yayınlar vardır (Tsai vd., 2006). Bu konu literatürde tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Bu tez çalışması germ hücrelerinde AR ekspresyonunun olup olmadığı konusunda da literatüre katkı sağlayacaktır.

Spermatogenezde AR sinyali, testosteron seviyelerinin kimyasal olarak baskılandığı kemirgen modellerinde veya AR'nin transgenik bozulmasına sahip modellerde araştırılmıştır. Bu modeller, özellikle spermatogonyum sayılarının korunması, kan-testis bariyer bütünlüğü ve mayoz bölünmenin tamamlanması gibi AR sinyali gerektiren spermatogenez adımlarını kesin olarak belirlemiştir (Hiort ve Holterhus, 2003).

## **2.8. Ubikütin**

Ubikütin, 76 aminoasitten oluşan bir proteindir. Ubikütin hedef proteinlere ubikütin aktive edici enzim (E1), ubikütin bağlayıcı enzim (E2) ve tanıyıcı protein (E3) yardımı ile kovalent olarak bağlanır (Ciechanover, 1998). Poliubikütilenen proteinler daha sonra 26S proteazom tarafından yıkılırlar (Cao ve Zheng, 2004). Ubikütin Proteazom Sistemi (UPS), tüm ökaryotlarda fonksiyon gören lizozomal olmayan ve proteazom tarafından bozunması için proteinlerin ubikütin ile etiketlendiği bir yolaktır.



**Şekil 2.13.** UPS tarafından proteinlerin yıkılması (Pakkaya, 2020).

## 2.9. Ubiquitin Specific Peptidase 26 (USP26)

USP26, geniş bir deubikitinasyon enzim ailesinin üyesidir ve insan testisinde spesifik olarak eksprese edilen bir gendir (Sakai vd., 2019). Ubikitinasyon, hücrel proteinlerin stabilitesi ve bozulmasında yer alan önemli bir biyolojik süreçtir. İnsanlarda USP26, Leydig hücrelerinde ifade edilir ve aynı zamanda Sertoli hücreleri ve AR ile kolokalize olur. USP26, normal testis gelişimi ve spermatogenezin sürdürülmesi için gereklidir ve potansiyel olarak testiste AR düzenleyici olarak görev yapar. Ayrıca USP26, üç önemli nükleer reseptör etkileşim motifi içerir ve AR ubikitinasyonunu ve transkripsiyonel aktiviteyi modüle etmek için bu motifler aracılığıyla AR'ye bağlanır (Ma vd., 2016).

Literatürde yer alan bir çalışmada USP26 ekspresyonu durdurulduğu zaman, testiste USP26 ekspresyonunun olmaması AR'nin düzensizliği ile sonuçlanmış ve testis gelişiminde anormallik ve spermatogenez mekanizmasında bozukluk görülmüştür (Tian vd., 2019). Yapılan çalışmalar USP26'nın erkek infertilitesi ile ilgili olduğunu göstermektedir. Lin vd. (2011)'nin yaptığı bir çalışmada, USP26 mutasyonlarının spermatogenez ve hormon salgılanmasını etkileyerek erkek infertilitesine neden olduğu bulunmuştur.

Mekanizma olarak AR yolunun, USP26 ve erkek infertilitesi ilişkisinde rol oynadığı düşünülmektedir. Testosteron gibi androjenler, normal erkek üreme sistemi gelişimi ve işlevi için gerekli olan steroid hormonlardır. Spermatogenez mekanizması için testiste AR sinyali önemlidir.

## 2.10. Ubiquitous Expressed Transcript (UXT)

UXT, spermatogenez mekanizmasında yer alan önemli bir proteindir. Literatürde yer alan bir çalışmada UXT'nin germ hücrelerinde spermatogenez ve fertilité için gerekli bir protein olduğu gösterilmiştir (Thomas vd., 2020). Başka bir çalışmada, UXT'nin germ hücrelerindeki rolünü göstermek için, germ hücre hattında UXT nakavt edilmiş fare modeli ile çalışılmıştır. UXT kaybı spermatogenik döngü sırasında germ hücrelerinin sayısının azalmasına neden olmuştur. Ayrıca UXT ekspresyonu durdurulmuş fare testislerinin hacminin kontrol grubuna göre daha küçük olduğu ve sperm içermediği gösterilmiştir. Böylece bu çalışmada UXT'nin spermatogenez için önemli bir protein olduğu gösterilmiştir (Schafler vd., 2018).

Bizim çalışmamızda USP26 ve UXT proteinlerini seçme nedenimiz bu proteinlerin UPS yolağı ile ilgili olması ve testis biyolojisi için önemli proteinler olmasıdır. Literatürde kullandığımız kontrol grubu olan Leydig ve Sertoli hücre hatlarında bu proteinlere bakılmış, fakat CRL-2073 hücrelerinde ilk kez bakılacak olması önemlidir.

Tüm bu verilen bilgiler ışığında, bizim bu çalışmada ki amacımız insan embriyonal karsinom hücrelerinde SVIP'in, Ubikutin aracılı sinyal yolağı molekülleri (Ubikutin, USP26 ve UXT) ve AR protein ekspresyonları üzerinde etkisinin olup olmadığını göstermektir.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyaller

##### 3.1.1. Hücre Hatları

In vitro çalışmalarda insan testis dokusuna ait CRL-2073 (NCCIT/ATCC) embriyonal karsinom hücre hattı kullanıldı. Bu hücre hattı yetişkin testis dokusunda pluripotent embriyonal karsinomlu bir erkek hastadan izole edilmiş, adherent (yapışkan) özellik gösteren germ hücreli tümörlerden oluşmaktadır. Pluripotent özellikte olan hücre dizisi somatik ve ekstraembriyonik farklılaşma yeteneğine sahiptir. Farklılaşmamış hücreler seminom ve embriyonal karsinom arasındaki ara aşamaya eşdeğerdir.

In vitro çalışmalarda kontrol grubu olarak insan testis dokusundan izole edilen 10-HU103 (HLC) Leydig hücresi kullanıldı. Bu hücre hattı adherent özelliktedir. Diğer kontrol grubu olarak kullanılan hücre hattı ise fare testis dokusundan izole edilen 15P-1 /CRL- 2618 (ATC) Sertoli hücresidir. Bu hücre hattı da adherent özelliktedir. Sertoli hücre grubunda fare hücre hattı seçilmesinin sebebi, insan testis dokusuna ait Sertoli hücre hattının olmamasıdır.

##### 3.1.2. Antikorlar

Hücre hatları üzerinde gerçekleştirilen immünofloresan ve western blot analizlerine uygun olan primer ve sekonder antikorlar seçildi. Kullanılan antikorlar ve dilüsyon oranları Tablo 3.1 ve Tablo 3.2' de gösterilmiştir.

**Tablo 3.1.** Çalışmada kullanılan primer antikorlar.

Primer Antikor	Firma	Dilüsyon oranı (İmmünofloresan)	Dilüsyon oranı (Western blot)
SVIP (HPA39807)	Sigma	1:100	1:500
Ubiquitin (STJ97753)	St John's	1:100	1:1000
AR (STJ97233)	St John's	1:100	1:1000
USP26 (STJ110306)	St John's	1:100	1:1000
UXT (Q9UBK9)	Cusa Bio	1:100	1:1000
Beta Aktin (ab8229) Beta Aktin (STJ91464)	Abcam St John's	-----	1:1000 1:1500

**Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan sekonder antikorlar**

Sekonder Antikor	Firma	Dilüsyon oranı (Immünofloresan)	Dilüsyon oranı (Western blot)
Anti rabbit IgG FITC	Abcam	1:250	-----
Anti Mouse IgG Texas Red	Abcam	1:250	-----
Goat anti rabbit HRP	Abcam	-----	1:1000
Goat anti Mouse HRP	Abcam	-----	1:1000

### 3.1.3. Primerler

Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) analizlerinde kullanılan primerler, makaleler kaynak alınarak seçildikten sonra Primer Blast online programı kullanılarak kontrol edildi. Kullanılan primerlerin baz dizilimleri Tablo 3.3.'de verilmiştir.

**Tablo 3.3. Çalışmada kullanılan primer dizileri**

Gen Adı	Primer Dizisi (5'-----3')
SVIP	F: GAGGCTGCAGAGAGAAGACA R: AGCCCACTTGATTGCAGATAA
Ubikutin B (UBB)	F: ATGATCCTGAGGTGACACGC R: GCGTACCCACACATCACTAGA
AR	F: AGCTACTCCGGACCTTACG R: AGGTGCCATGGGAGGGTTAG
USP26	F: CAAAGAACCTCCTAAGACC R: AGATGGCTGACAACACTAA
UXT	F: CGGCCTGAGGAGCCCAT R: AGTCCTTGGTGAGGCTGTTG
YWHAZ (Referans Gen)	F: CTGGCCCTCAACTTCTCTGT R: AATGGCTTCATCGAAAGCTG

### 3.1.4. SVIP siRNA ve Kontrol siRNA

Hücre hatlarında SVIP gen ekspresyonunu baskılamak amacıyla SVIP siRNA'lar ile transfeksiyon işlemi yapıldı. Kontrol olarak ise kontrol siRNA kullanıldı. Kullanılan siRNA'lar Tablo 3.4'de verilmiştir.

**Tablo 3.4. Çalışmada kullanılan siRNA'lar**

SVIP siRNA'lar (Qiagen / GS258010)	-SI04714038 -SI04714031 -SI04709544 -SI04709537
Kontrol siRNA (Qiagen / 1027281)	-1027298

### 3.1.5. Mikroskoplar

Deneyle sırasında kullanılan mikroskoplar Tablo 3.5’de verilmiştir.

**Tablo 3.5.** *Çalışmada kullanılan mikroskop çeşitleri*

Mikroskop Çeşitleri	Marka
Işık Mikroskop	Nicon, Eclipse E100
Floresan Mikroskop	Olympus, BX43
Ters Işık Mikroskop (Inverted)	Olympus, IX73

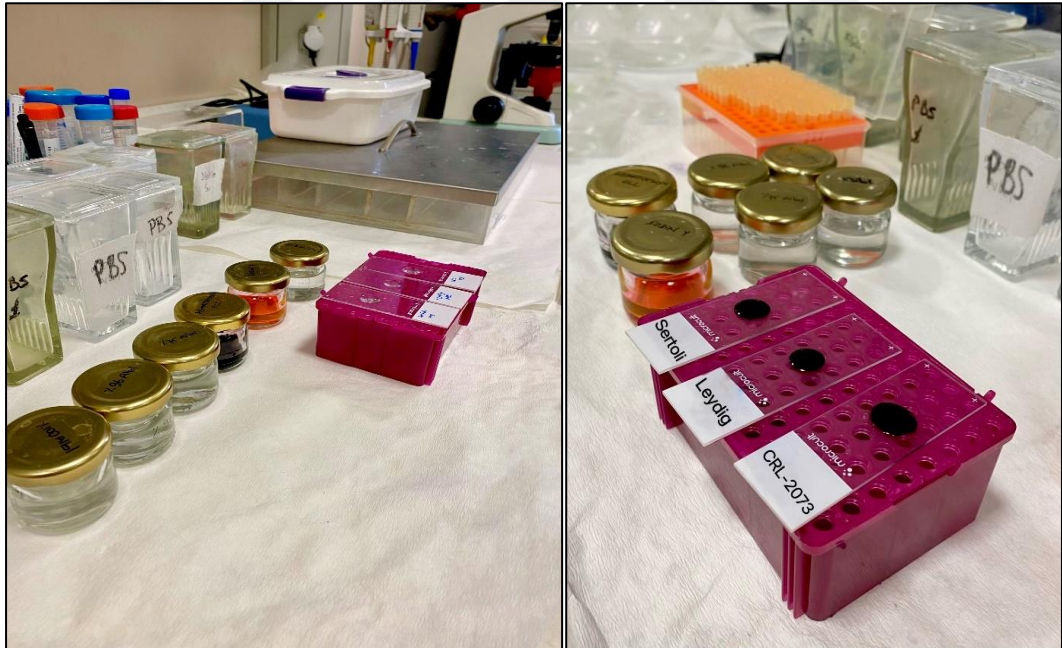
## 3.2. Yöntemler

### 3.2.1. Hücre Kültürü

Embriyonal karsinom hücre hattı (CRL-2073) ilk çoğaltılırken, hücrelerde en yüksek canlılık seviyesini sağlamak için firmanın protokolünde yazdığı gibi kültüre edilerek çoğaltıldı. İlk aşamada hücrelerin bulunduğu kriyo tüp 37<sup>0</sup>C’lik su banyosunda yaklaşık 2 dakikada çözüldü. Tüpün etrafı alkol ile temizlendikten sonra hücre kültür kabini içerisine alındı. Tüpün içeriği 10 ml’lik steril falkon tüpüne aktarıldı ve 125 g’de 5 dakika santrifüj (Hettich, Almanya) edildi. Hücre peleti süspansiyon edilerek T25 ve T75 cm<sup>2</sup> flaklara ekim yapıldı. CRL-2073 hücre hattı için RPMI-1640 (with L-glutamine, HEPES, Gibco Capricorn) medyum içerisine %5 Fetal Bovine Serum (FBS, Capricorn) ve %1 antibiyotik (penisilin-streptomisin) (Gibco, 15140-122) eklenerek kullanıldı. Flaklar 37<sup>0</sup>C ve %5 CO<sub>2</sub>’ li ortam içeren inkübatörde (Panasonic) inkübe edildi. İlk ekim olduğu için hücrelerin yapışıp yapışmadığını anlamak için hücreler her gün kontrol edildi. Hücreler yapıştıktan sonra 2 günde bir besiyeri değişimi yapıldı. Hücreler %80-90 yoğunluğa ulaşınca hücrelerin üzerine 4 ml Tripsin-EDTA (%0.25) (Gibco) eklendikten sonra 5 dakika 37<sup>0</sup>C inkübatörde bekletildi. Flak yüzeyinden kalkan hücreler invert mikroskopta kontrol edildi. Daha sonra hücreler 15 ml’lik steril falkon tüplerinde 4500 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant kısmı atılarak hücre peletine medyum eklenerek süspansiyon edildi. Hücrelerin bir kısmı T25 cm<sup>2</sup>’lik flaklara ekildi bir kısmı da dondurularak -80<sup>0</sup>C’de saklandı. Kontrol grubu olarak kullanılan Leydig hücresi (10-HU103) DMEM- Hams F-12 (Capricorn) besiyerine eklenerek ekimleri yapıldı. Diğer kontrol grubu olarak kullanılan Sertoli hücresi (CRL-2618) DMEM (Glucose with L-Glutamine, Capricorn) besiyerine eklenerek ekimleri yapıldı.

### 3.2.2. Morfolojik Değerlendirme ve Hematoksilen-Eozin Boyama

CRL-2073 (insan testis embriyonal karsinom hücre hattı), 10-HU103 (insan testis Leydig hücre hattı) ve CRL-2618 (fare testis Sertoli hücre hattı) hücrelerinin morfolojik analizleri için hematoksilen eozin boyama yapıldı. 6 kuyucuklu hücre plakalarının içerisine konulan yuvarlak lamellerin üzerine 2 ml hücre besiyeri içerisinde süspansiyon olarak hücreler ekildi. Lamellere yapışan hücrelerin üzerinden medyumlar çekilerek Fosfat Tampon Tuz Çözeltisi (PBS) ile yıkandı. %4 Paraformaldehit (PFA) hücrelerin üzerine eklenerek 10 dakika beklendi ve böylece hücrelerin fikse edilmesi sağlandı. Fiksasyon sonrası hücreler PBS ile yıkandı. Daha sonra yuvarlak lameller lam üzerine alındı. Hücreler sırasıyla %100, %96 ve %75 alkol serilerinde 2'şer dakika bekletilerek geçirildi ve distile su ile yıkandı. Hematoksilen (Sigma-Aldrich) ile 5 dakika bekletildi. Distile su ile yıkandıktan sonra Eozin (Sigma-Aldrich) ile 1 dakika bekletildi. %75, %96 ve %100 alkol serilerinden hızlıca geçirildi. 30 dakika Ksilol de bekletildi ve entellanla kapatıldı. Işık mikroskop ile görüntüleme yapıldı.



Şekil 3.1. Hücrelerde hematoksilen ve eozin boyama işlemi.

### 3.2.3. İmmünohistokimyasal Boyama:

İnsan testis embriyonal karsinom hücre hattında (CRL-2073) SVIP ve Ubikütin proteinlerinin çekirdek ve sitoplazmadaki yerleşim ve ekspresyonlarını göstermek amacıyla immünohistokimyasal boyama yapıldı. Bu teknik sırasında uyguladığımız basamaklar aşağıda sıralanmıştır.

- 1) İmmünohistokimya boyaması için hücreler 6 kuyucuklu hücre plaklarının içerisine yerleştirilen yuvarlak lameller üzerine ekildi.
- 2) Hücreler belirli bir yoğunluğa ulaştıkça hücrelerin medyumları çekildi ve hücreler PBS ile yıkandı. Daha sonra hücreler 15 dakika %4'lük paraformaldehit (PFA) ile fikse edildi.
- 3) Lam üzerine alınan lamellerin etrafı pappen ile çizildi ve PBS ile yıkandı. Spesifik olmayan bağlanmaları engellemek için bloklama solüsyonu ile 1 saat inkübe edildi.
- 4) İnkübasyon sonrası PBS ile tekrar yıkandı. Belirli bir dilüsyonda hazırlanan primer antikorlar (SVIP ve Ubikütin, 1:50) lamellerin üzerini kaplayacak şekilde eklendi ve gece boyu +4°C'de inkübe edildi.
- 5) Ertesi gün primer antikorlar çekilerek PBS ile yıkandı. Daha sonra Biotinli sekonder antikor ile 1 saat inkübe edildi. PBS ile yıkandıktan sonra Streptavidin solüsyonu ile 30 dakika inkübe edildi. Reaksiyonun görünür hale gelebilmesi için AEC solüsyonu hazırlanıp üzerlerine eklendi ve mikroskop altında kontrol edilerek inkübasyon süresi ayarlandı.
- 6) Yıkamanın ardından çekirdek boyanması için Mayer's Hematoksilen ile 30 saniye inkübe edildi ve su bazlı kapatıcı ile kapatıldı. Değerlendirmeler ışık mikroskobu ile yapıldı.

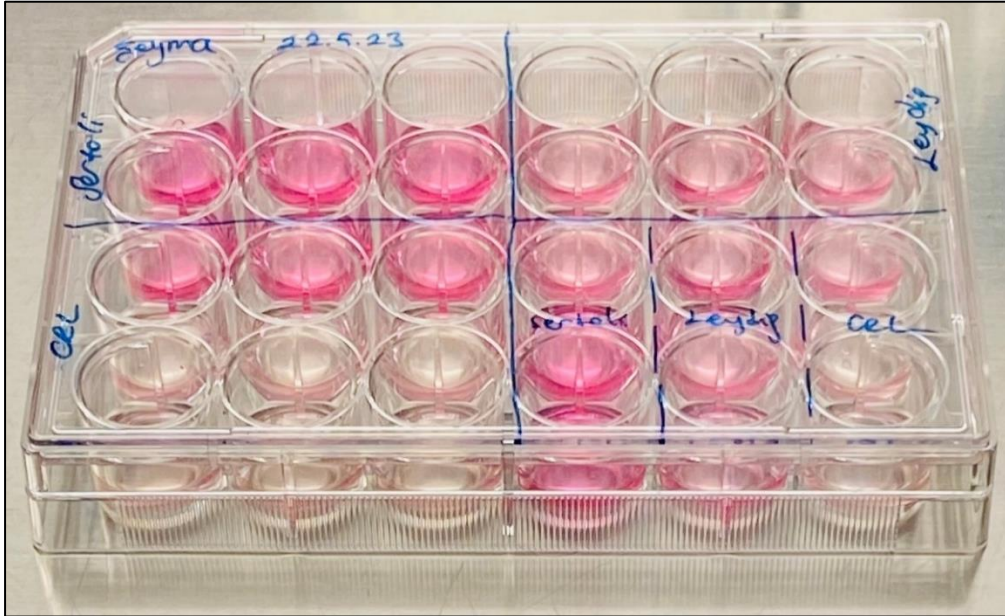
### 3.2.4. siRNA (Small Interfering RNA) Transfeksiyonu

RNA interferansı, gen ifadesini negatif yönde düzenleyen bir mekanizmadır. Bu mekanizmada amaç genlerin transkripsiyon sonrasında susturulmasıdır. RNA inhibisyon yolları küçük RNA parçası olan ve protein kodlamayan small interfering RNA (siRNA) ve mikro RNA (miRNA) tarafından düzenlenir. Her iki RNA'nın etki mekanizması aynıdır. Hücre içerisinde endonükleaz (dicer) adı verilen enzimler tarafından işlenirler ve RISC (RNA-induced silencing complex) adı verilen ATP

bağımlı RNA ile indüklenen susturma komplekslerine bağlanırlar (Ark, 2017). siRNA'lar ekzojen veya endojen RNA'lardan sentezlenir, miRNA'lar ise endojen RNA'lardan sentezlenir. siRNA'ların etki mekanizması mRNA'ların yıkılması aracılığı ile etki gösterirken, miRNA'lar translasyonun baskılanması ile etkisini gösterir. Endonükleazlar aracılığı ile elde edilen sentetik siRNA'lar birçok genin susturulması amacıyla kullanılmaktadır (Ark, 2017; Alshaer vd., 2021).

CRL-2073, 10-HU103 ve CRL-2618 hücre hatlarında SVIP'in fonksiyonunu belirlemek amacı ile hücrelerdeki gen ekspresyonunun baskılanması için transfeksiyon yapıldı. SVIP için 4 farklı siRNA bir arada kullanıldı. SVIP çok küçük ve spesifik bir molekül olduğu için siRNA uygulaması sonrası SVIP baskılanmasının daha etkin olması için 4 farklı siRNA karışım şeklinde bir arada kullanıldı. Transfeksiyonda XtremeGENE HP DNA transfeksiyon reaktifi (6366244001, Sigma) ( $\mu\text{l}$ )'nin siRNA ( $\mu\text{g}$ )'ya oranı 2,5:0,5 (40 pmol) olacak şekilde kullanıldı (Şahin, 2021). Kontrol siRNA için de literatüre göre belirlenen doz ile hücrelere uygulama yapıldı. Transfeksiyon işlemi sırasında uyguladığımız basamaklar aşağıdaki gibidir:

1. Gün: 500  $\mu\text{l}$  medyum içerisinde 75.000 hücre olacak şekilde 24 kuyucuklu hücre plaklarına ekim yapıldı.

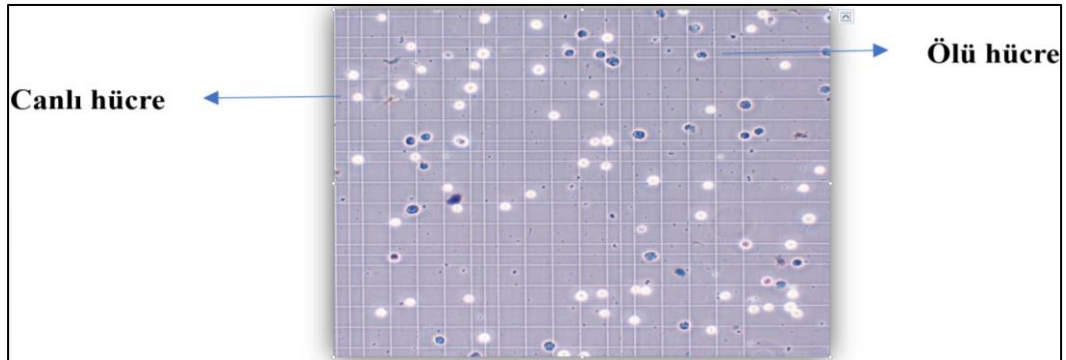


**Şekil 3.2.** Hücrelere siRNA transfeksiyon uygulanması.

2. Gün: SVIP siRNA ve kontrol siRNA için ayrı ayrı iki ependorf tüp hazırlandı. SVIP siRNA için hazırlanan tüpe 46 µl FBS ve Pen-Strep içermeyen transfeksiyon medyumunu ve 4 farklı siRNA'den 1'er µl eklendi. Kontrol siRNA için hazırlanan tüpe 48 µl transfeksiyon medyumunu ve 2 µl kontrol siRNA eklendi. Her iki tüpün üzerine 47,5 µl transfeksiyon medyumunu içerisinde 2,5 µl reaktif eklendi (Toplam hacim 100 µl). 15 dk oda ısısında bekletildikten sonra damla damla kuyucuktaki medyum üzerine eklendi.
3. Gün: Kuyucuklardaki medyumlar çekildi, yıkama işlemi yapılmadan FBS ve Pen-Strep içeren medyumlar eklendi.
4. Gün: Kuyucuklardaki medyumlar çekilip atıldıktan sonra PBS ile yıkandı ve hücreler 50 µl Tripsin-EDTA ile kaldırıldı. Transfekte edilen hücreler Western Blot ve qRT-PCR yöntemlerinde kullanılmak üzere -80°C'de saklandı.

### 3.2.5. Hücre Canlılık Analizi

CRL-2073, 10-HU103 ve CRL-2618 hücre hatlarında SVIP gen ekspresyonunun baskılanması için uygulanan SVIP siRNA dozu literatüre göre belirlendi (Alimoğulları, 2020; Şahin, 2021). Transfeksiyon işlemi sonrası hücre canlılık analizi yapıldı. Bu analiz için tripan mavisi boyası (T8154, Sigma) kullanıldı. Bu analizde, hücreler canlı ise boya hücre membranından içeri giremez ve canlı hücreler renksiz görünür. Fakat canlılığını kaybeden hücreler boyayı alarak mavi renkte görünür. Ependorf tüpün içerisinde 50 µl süspanse halde bulunan örneğin üzerine 50 µl tripan mavisi eklendi. Daha sonra alınan örnek thoma lamına yerleştirildi. Alanda bulunan tüm hücreler (canlı ve ölü) sayıldı. Hücre canlılık analizi için bu sayım işlemi 2 kere tekrar edildi. Boyayı alan hücrelerin sayımı yapıp tüm hücrelere oranlanarak hücre canlılığı tespit edildi (Freshney, 2020).



**Şekil 3.3.** Hücrelerin thoma lamında tripan mavisi ile boyanması.

### 3.2.6. Western Blot Analizi için Örneklerin Hazırlanması

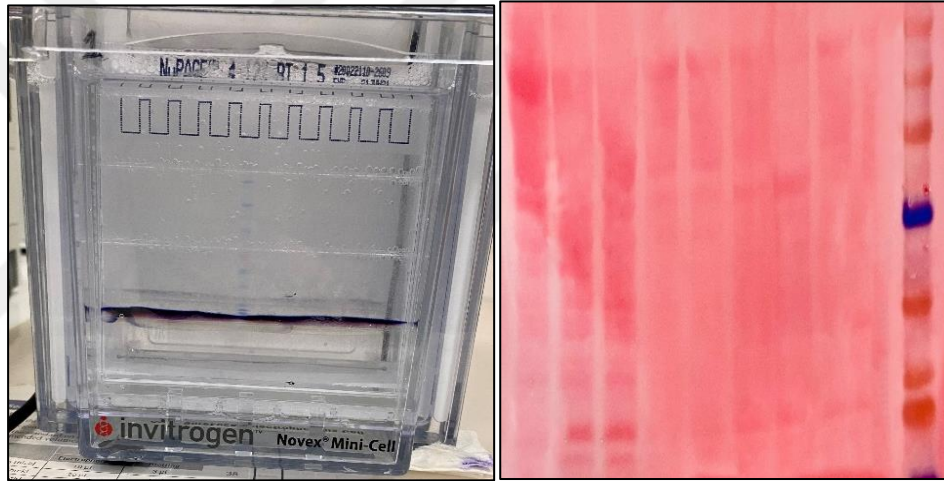
Western blot analizi için 6 kuyucuklu hücre plaklarına ekilen hücrelerin medyumunu çekildi ve PBS ile 2 kere yıkandı. RIPA lizis solüsyonu (50 mM Tris-HCl pH: 8.0, 150 mM NaCl, %1 NP-40) içerisine kullanmadan hemen önce 1:100 oranında proteaz inhibitör kokteyli eklendi ve her kuyucuğa 50 µl eklenerek hücre kazıyıcı ile kazıma işlemi yapıldı. Daha sonra hücreler ependorf tüplere toplandı ve örnekler buz üzerinde sonikatörden (Bandelin, Sonopuls) geçirildi. Örnekler 14000 rpm'de 10 dakika boyunca 4°C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası ependorfun alt kısmındaki bulutsu kısım bırakılarak üst kısmında kalan süpernatantı ayrı ependorfa konuldu ve -20°C'ye kaldırıldı.

### 3.2.7. Western Blot Analizi

Western blot, belirli bir doku homojenatı, ekstrakt örneği veya hücredeki belirli proteinleri tespit etmek için kullanılan semikantitatif bir tekniktir (Ark, 2017). Doğal proteinleri 3 boyutlu yapıya göre veya denatüre proteinleri polipeptit uzunluğuna göre ayırmak için jel elektroforezi kullanır. Proteinler daha sonra bir membrana (genel olarak nitroselüloz veya PVDF) aktarılır ve burada hedef proteine özgü antikorlarla bant oluştururlar. Biz de bu teknik ile SVIP, Ubikutin, AR, USP26 ve UXT proteinlerinin ekspresyonlarını inceledik. Her hücre hattı için bütün proteinler 3 tekrar ile çalışıldı. Bu teknik sırasında uyguladığımız basamaklar aşağıda sıralanmıştır:

- 1) Daha önceden western için hazırlanan örneklerin üzerine sample buffer (%20 SDS, 625 mµ Tris, %9 B-Mercaptoethanol; AppliChem, Darmstadt, %0.3 bromphenol blue; Sigma-Aldrich, Steinheim, %50 gliserol) eklenerek dilüe edildi ve daha sonra 95°C'de 10 dakika kaynatılarak jele yüklemeye hazır hale getirildi.
- 2) Hazır jel Novex %4-12 Bis-Tris Gel (NUPAGE, Invitrogen) elektroforez tankına (XCell SureLock) yerleştirildi ve jelde bulunan tarak çıkarıldıktan sonra kuyucuklar tek tek enjektör ile kontrol edildi. Jelin üzerine kaplayacak şekilde Running Buffer (760 ml distile su, 40 ml SDS Running Buffer -20X) eklendi. Örneklerden sırası ile 20 µl kuyucuklara yüklendi ve kontrol amacıyla bir kuyucuğa 7 µl marker yüklendi.
- 3) Örnekler jele yüklendikten sonra güç kaynağı (Consort) 200 V'a ayarlanarak 1,5 saat boyunca proteinlerin yürütülmesi sağlandı.

- 4) Protein transferi için yarı-kuru transfer sistemi olan semidry blotlama cihazı (Scis-Plas) kullanıldı. Cihaza ilk olarak 3 kat blotlama solüsyonu (3,025 gr Tris, 14,4 gr Glycine, 200 ml Methanol, 800 ml distile su) ile ıslatılmış filtre kağıdı, sonra ıslatılmış membran (NitroBind Pure Nitrocellulose Membran), üzerine jel ve sonra tekrar 3 kat filtre kağıdı yerleştirildi. Jeldeki proteinlerin membrana aktarılması için 200 miliamper de 1,5 saat blotlama yapıldı.
- 5) Blotlama bittikten sonra membrana transfer olan proteinler Ponceu boyası (0,1 gr Ponceu-Roth, Karlsruhe, 1,5 ml acetic acid, 100 ml distile su) ile boyanarak bantların görünmesi sağlandı. Daha sonra distile su ile yıkanan membranın üzerine süt tozu (0,5 gr süt tozu- BioRad, 50 ml PBS Tween-1X) döküldü ve oda ısısında 1 saat inkübe edildi.



**Şekil 3.4.** *Western blot yürütme cihazında örneklerin yürümesi ve Ponceu boyası ile membrandaki bantların görüntülenmesi.*

- 6) Membran belirlenen dilüsyon oranlarında (Tablo 3.1) hazırlanmış olan primer antikolar (SVIP, Ubikutin, AR, USP26 ve UXT) ile gece boyu 4<sup>0</sup>C de inkübe edildi. Bu primer antikoların dışında western blot gibi protein tespiti içeren analizlerde kontrol proteini olarak kullanılan Beta Aktin proteinine de bakıldı.
- 7) 1 gecelik inkübasyon sonrası membranlar 1 saat PBS Tween 20 ile yıkandı.
- 8) Belirlenen dilüsyonlarda hazırlanan sekonder antikolar (Tablo 3.2) ile 1 saat oda ısısında inkübe edildi.
- 9) İnkübasyon sonrası membran PBS ile yıkandı. Membrandaki proteinlerin görüntülenmesi amacıyla kemilüminesans (ECL-Enhanced Chemilüminisans) reaktifi kullanıldı. Reaktif membrana döküldükten sonra

2-3 dakika karanlıkta bekletildi. Sonra membran UVP görüntüleme cihazının içine yerleştirilerek bantlar görüntülendi.

- 10) Western blot analizi sonucunda görüntülenen bantlar Image J programı ile analiz edildi.

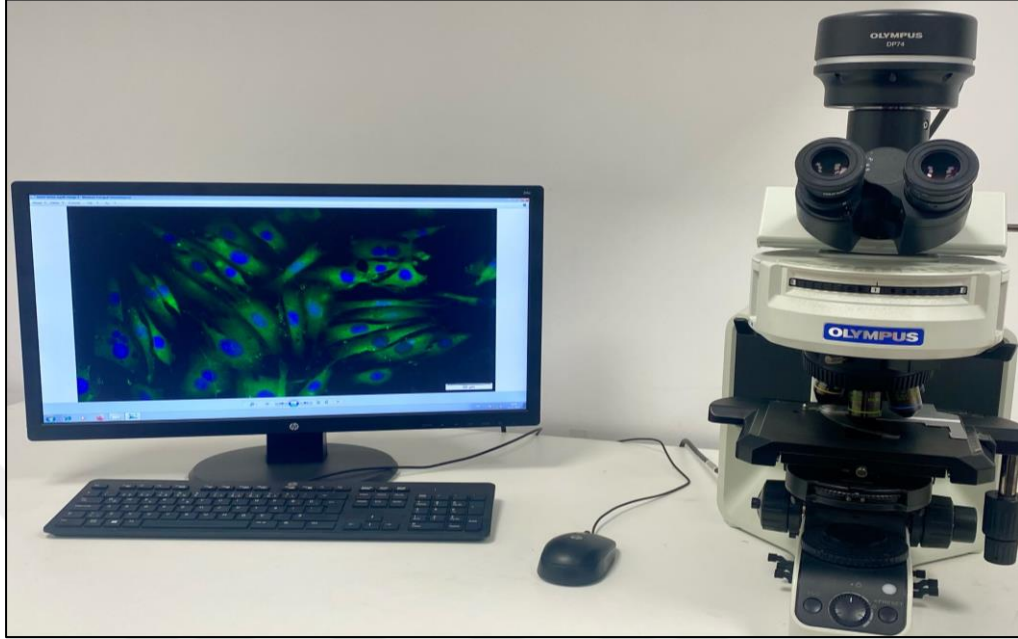
Her bir protein için görüntülenen bant, toplam protein miktarını gösteren Beta Aktin bandına orantılandı. Kontrol siRNA ve SVIP siRNA grupları arasındaki farklılıklar GraphPad Prism 10 programı kullanılarak analiz edildi.

### 3.2.8. İmmüno Floresan Boyama

İmmüno Floresan boyama, proteinlerin hücre içerisindeki lokalizasyonlarını incelemeye dayanan mikroskopik bir yöntemdir. Hücrede gösterilmeye çalışılan protein antijen, bu proteinin saptanmasını sağlayan protein ise antikordur. Biz de bu teknik ile SVIP, Ubikutin, AR, USP26 ve UXT proteinlerinin lokalizasyonunu inceledik. Bu teknik sırasında uyguladığımız basamaklar aşağıda sıralanmıştır:

- 1) İmmüno Floresan çalışmalar için hücreler 24 kuyucuklu hücre plaklarının içerisine yerleştirilen yuvarlak lameller (12x12mm, Nest) üzerine ekildi.
- 2) Hücreler belirli bir yoğunluğa ulaşıncaya hücrelerin medyumları çekildi ve hücreler PBS ile yıkandı. Daha sonra hücreler 15 dakika %4'lük paraformaldehit (PFA) ile fikse edildi ve sonra tekrar PBS ile yıkandı.
- 3) Kuyucuklar içindeki lameller lam üzerine alınarak Pappen ile etrafi çizildi. İstenmeyen antijenlerin bloklanması amacıyla süper blok kiti (Abcam) ile 1 saat bloklama işlemi yapıldı. Bloklama sonrası hücreler tekrar PBS ile yıkandı.
- 4) Dilüsyon oranları belirlenen primer antikolarlar (Tablo 3.1) hazırlanıp, hücrelerin üzerini kaplayacak şekilde damlatıldı ve +4°C'de gece boyu inkübasyona bırakıldı.
- 5) Ertesi gün primer antikolar çekilip PBS ile yıkandı ve dilüsyonları belirlenen sekonder antikolar (Tablo 3.2) ile 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası sekonder antikor çekildi ve tekrar PBS ile yıkandı.
- 6) Temiz bir lama bir damla floresan kapatma medyumunu (Fluoroshield mounting medium with DAPI, Abcam) damlatıldı ve yuvarlak lamellerin hücre kısmı altına kalacak şekilde kapatıldı. Olympus BX53 floresan mikroskop ve CellSens yazılım programı ile görüntüleme yapıldı.

- 7) İmmünofloresan boyama sonucunda, hücrelerin çekirdek ve sitoplazmalarında bulunan protein ekspresyonlarının analizi için Image J programı kullanıldı.



**Şekil 3.5.** Floresan mikroskop ile örneklerin görüntülenmesi.

### **3.2.9. RNA İzolasyonu, Komplementer DNA (cDNA) Sentezi ve Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR (qRT-PCR)**

CRL-2073, 10-HU103 ve CRL-2618 hücre hatlarında SVIP, Ubiquitin, AR, USP26 ve UXT gen ekspresyonlarının gösterilmesi amacıyla Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR (qRT-PCR) yöntemi kullanıldı. qRT-PCR yönteminde amaç DNA amplifikasyonu ile doğru orantılı olarak artan floresan sinyallerinin ölçülerek kantitatif sonuçların elde edilmesidir (Heid vd.,1996).

Bu yöntemde öncelikle SVIP, Ubiquitin, AR, USP26 ve UXT gen ekspresyonları CRL-2073, 10-HU103 ve CRL-2618 hücre hatlarında belirlenmiştir. Her hücre hattında her gen kendi içerisindeki tekrarlar dışında farklı zamanlarda elde edilen lizatlardan 2 tekrarlı olarak çalışıldı. Sonrasında hem SVIP siRNA ile transfekte edilmiş hem de kontrol siRNA'lar ile transfekte edilmiş CRL-2073, 10-HU103 ve CRL-2618 hücrelerde bu proteinlerin gen ekspresyonları belirlenmiştir. qRT-PCR için ilk olarak hücrelerden RNA izolasyonu yapıldı. Toplam RNA elde edildikten sonra ise komplementer DNA (cDNA) sentezi yapıldı. En son aşamada genlere özgü primerler ile hedef gen bölgesi çoğaltıldı.

### RNA İzolasyonu:

RNA izolasyonu için DNA, RNA and protein pürifikasyon kiti kullanıldı (Macherey- Nagel). Bu teknik sırasında uyguladığımız basamaklar aşağıda sıralanmıştır:

- 1) 6 kuyucuklu hücre plaklarına ekilen hücrelerin üzerine 250 µl Tripsin-EDTA eklendi ve hücrelerin kalkması sağlandı. Daha sonra Tripsin-EDTA'nın etkisini durdurmak için her kuyucuğa 1 ml medyum eklendi ve her kuyucuğun içeriği ependorfa alındı.
- 2) Ependorflar 5 dakika 3000 g'de santrifüj (CT 15RE-VWR) edildi. Santrifüj sonrası üst kısım (süpernatant) atıldı, altta kalan pelletin üzerine 350 µl RA1 ve 3,5 µl Beta-mercaptoethanol eklendi ve pelet iyice süspanse edildi.
- 3) Örnekler pembe filtreli kolonlara eklendi ve 1 dakika 11,000 g'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst filtreli kısım atıldı (DNA olan kısım). Alttaki kısım yeni bir ependorfa alındı.
- 4) Ependorfların her birine 350 µl %70'lik etanol eklendi. Örnekler mavi filtreli kolonlara alındı ve 1 dakika 11.000 g'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası dipteki kısım atıldı ve filtrenin üstünde kalan RNA ile devam edildi. Bu örnekler tekrar 1 dakika 11.000 g'de santrifüj edildi.
- 5) Altta kalan kısım yeni tüpe alındı ve üzerine 350 µl MDB eklendi ve 1 dakika 11,000 g'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası alttaki kısım atıldı ve üst kısım ile devam edildi.
- 6) 10 µl rDNAaz (liyophlize olan rDNAaz içerisine 550 µl RNAaz içermeyen su eklenerek hazırlandı) ve 90 µl reaksiyon buffer karıştırıldı ve bu karışım oda ısısında 15 dakika bekletildi. Daha sonra bu karışım mavi filtreli RNA örneklerinin üzerine kolon içerisindeki membrana değmeden eklendi.
- 7) Örneklerin üzerine 200 µl RA2 Buffer eklendi ve 1 dakika 11.000 g'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası alt kısım atıldı ve üst kısım yeni tüpe alındı.
- 8) Örneklerin üzerine 600 µl RA3 (Wash buffer) eklendi ve 1 dakika 11.000 g'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası alt kısım atıldı ve üst kısım yeni tüpe alındı.
- 9) Örneklerin üzerine 250 µl RA3 eklendi ve 2 dakika 11.000 g'de santrifüj edildi.
- 10) Mavi kolonlar temiz ependorflara alındı ve üzerlerine 40 µl RNAaz içermeyen su eklendi. Örnekler 1 dakika 11.000 g'de santrifüj edildi ve altta kalan kısım ayrıldı. RNA ölçümü yapılana kadar örnekler -80 °C de saklandı.

- 11) Toplam RNA miktarı Nanodrop spektrofotometre cihazı ile ölçüldü. Örneklerden 2 µl cihaza eklendikten sonra 260 ve 280 nm dalga boylarında ölçüm alındı. Literatür bilgilerine göre OD260/280 değerleri 1,5-2,0 arasında olan toplam RNA'lar saf kabul edildi (Shen vd.,2022).



**Şekil 3.6.** RNA izolasyonu sonrası OD260/280 ölçümü.

#### Komplementer DNA (cDNA) Sentezi:

Nepenthe cDNA Sentez kiti kullanılarak bütün RNA'lardan üreticinin protokolüne göre cDNA'lar elde edildi.

**Tablo 3.6.** cDNA sentez reaksiyonu.

Malzemeler (1 reaksiyon için)	Hacim (Toplam hacim 20 µl)
Buffer karışımı (2X)	10 µl
Enzim karışımı	2 µl
RNAaz içermeyen su	6 µl
RNA	2 µl

RNA en son eklenerek Tablo 3.6 da yer alan tüm reaktifler karıştırıldı. Daha sonra hazırlanan tüpler Thermal Cycler (27220) cihazına yerleştirildi. Cihazdan kite uygun olan reaksiyon koşulları (Tablo 3.7) seçildi ve cDNA sentezlendi.

**Tablo 3.7.** cDNA reaksiyon koşulları.

Döngü sayısı	Süre	Sıcaklık
1 döngü	4 dakika	95°C
30 döngü	30 saniye	94°C
	30 saniye	57°C
	30 saniye	72°C
1 döngü	5 dakika	72°C

### Primer Hazırlığı:

Literatür kaynak alınarak belirlenen primerler Primer Blast online programından kontrol edildi. Dizayn edilen gen primer dizilimleri Oligomer firmasına sentezlettirildi. Liyofilize şekilde gelen primerler firmanın protokolüne uygun olarak DNAaz-RNAaz içermeyen suda çözülüp 100 µM'lık stok çözeltiler hazırlandı.

### Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR (qRT PCR):

Sentezlenen cDNA'lar Nepenthe 2x Master Mix Green kiti ile bütün genler için (SVIP, Ubikütin, AR, USP26, UXT ve referans gen olarak YWHAZ) gerçek zamanlı PCR yapmak üzere kullanıldı. Referans gen olarak tercih edilen YWHAZ geni daha önce laboratuvarımızda kullanılan ve çalıştığından emin olunan bir gen olduğu için tercih edildi (Şahin, 2021). qRT-PCR içeriği Tablo 3.8'de verilmiştir.

**Tablo 3.8.** *RT-PCR içeriği.*

Malzemeler (1 reaksiyon için)	Hacim (Toplam hacim 14 µl)
2X Master Karışım	5 µl
Primer Karışımı (Forward+ Reverse)	0,6 µl
Nükleaz içermeyen su	8,4 µl
cDNA	1 µl

qRT-PCR işlemi Corbett Rotor-Gene cihazında Tablo 3.9'de belirtilen koşullarda gerçekleştirildi. CT (Cycle threshold) değerleri ve grafikler Rotor-Gene software programından alındı.

**Tablo 3.9.** *qRT-PCR koşulları.*

Döngü sayısı	Süre	Sıcaklık
1 döngü	10 dakika	96°C
25-35 döngü	15 saniye 80 saniye 30-60 saniye	95°C 50-60°C 72°C
1 döngü	5 dakika	72°C

### 3.2.10. İstatistiksel Analiz

Hücre kültüründeki CRL-2073 (insan testis embriyonal karsinom hücre hattı), 10-HU103 (insan testis Leydig hücre hattı) ve CRL-2618 (fare testis Sertoli hücre hattı) hücre hatlarına ait floresan boyanmalarda görülen farklılıklar Image J programı ile analiz edildi. Kontrol siRNA ve SVIP siRNA grupları arasındaki değerleri analiz etmek için GraphPad Prism 10 programı kullanıldı. Gruplar arasında ortaya çıkabilecek farklılıkları karşılaştırmak için Student's t testi kullanıldı. Anlamlılık  $p < 0.05$  olarak değerlendirildi.

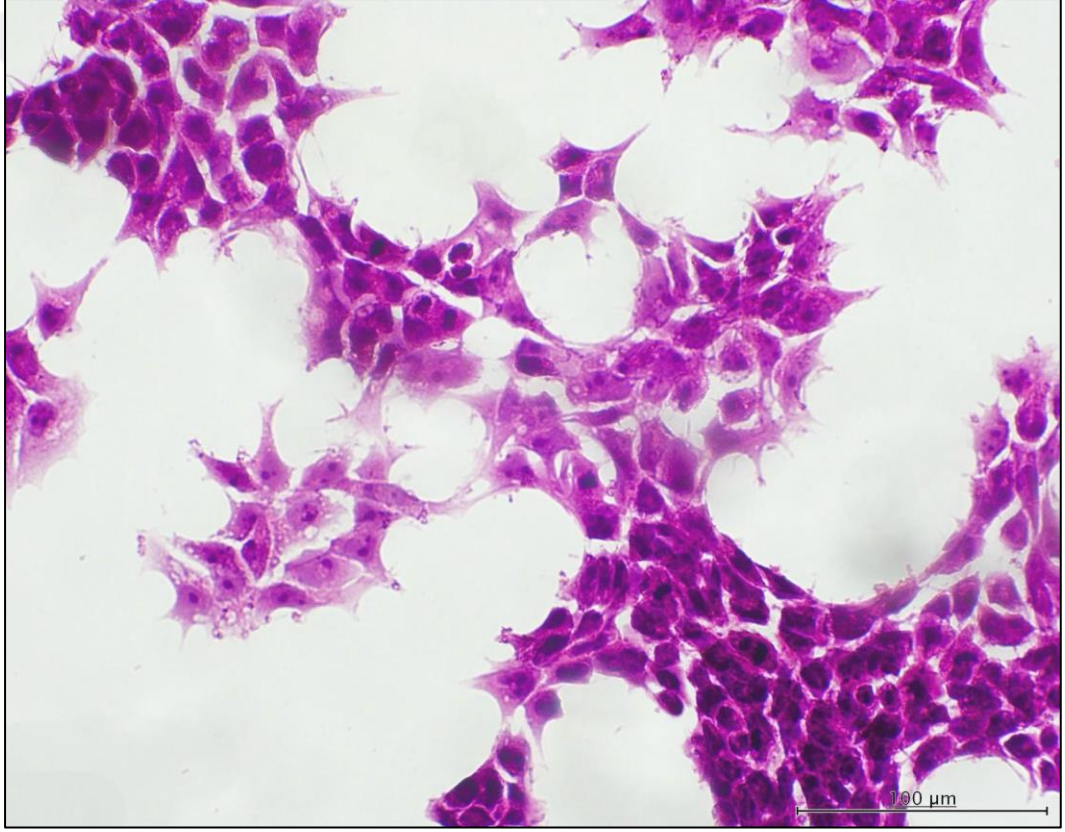
Western blot analizleri sonunda oluşan bantlardaki yoğunluk farklılıkları ve gruplar arasındaki karşılaştırma ve farklılıklar Image J programında analiz edildi. Western blot analizinde bir proteine ait elde edilen bant görüntüsü beta aktin bant görüntüsüne oranlandı ve istatistiksel olarak analiz edildi. Okutulmuş olan değerler arasındaki farklılıklar GraphPad Prism 10 istatistik programı kullanılarak belirlendi ve anlamlılık  $p < 0.05$  olarak değerlendirildi.

qRT-PCT analizinde çalışan gen örneklerinin CT değerlerinden referans gen (YWHAZ) CT değerleri çıkarıldı ve her gen için  $\Delta$ CT değerleri hesaplandı. Sonra her bir gen için kontrol siRNA ve SVIP siRNA  $\Delta$ CT değerleri hesaplandı. Kontrol siRNA  $\Delta$ CT değerinden kontrol  $\Delta$ CT değeri çıkarılarak her gen için  $\Delta\Delta$ CT değeri hesaplandı. Bu değerler  $2^{-\Delta\Delta$ CT formülünde yerlerine konuldu ve her bir gen için kat değişimi değerleri elde edildi. İstatistiksel olarak grupların karşılaştırılmasında GraphPad Prism 10 programı kullanıldı. T-test kullanılarak p değerleri hesaplandı. Anlamlılık  $p < 0.05$  olarak değerlendirildi.

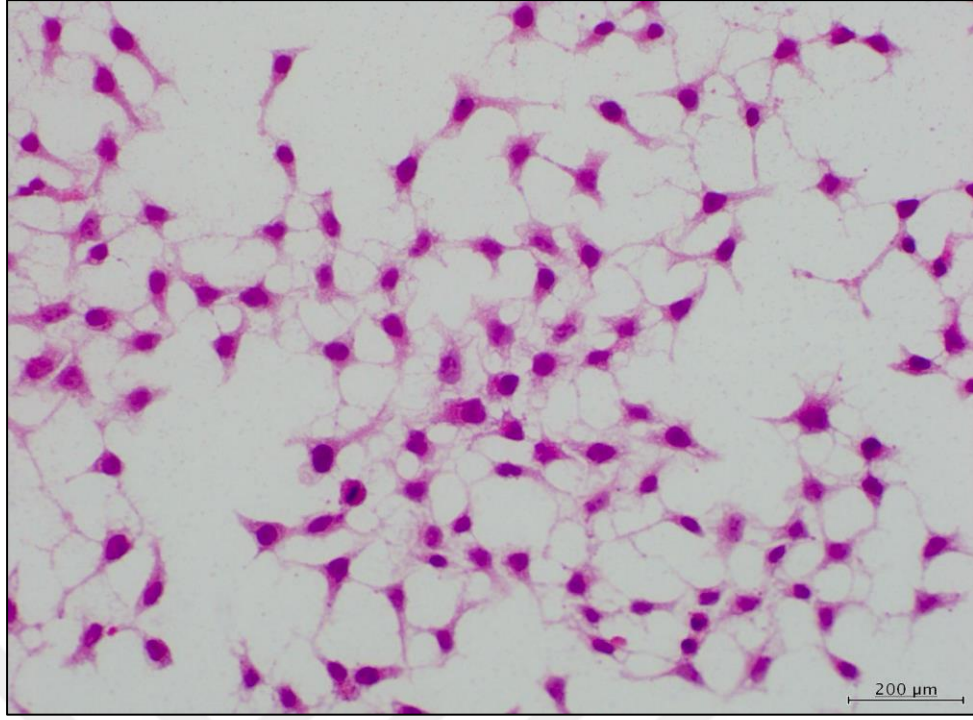
## 4. BULGULAR

### 4.1. Morfolojik Değerlendirme Bulguları

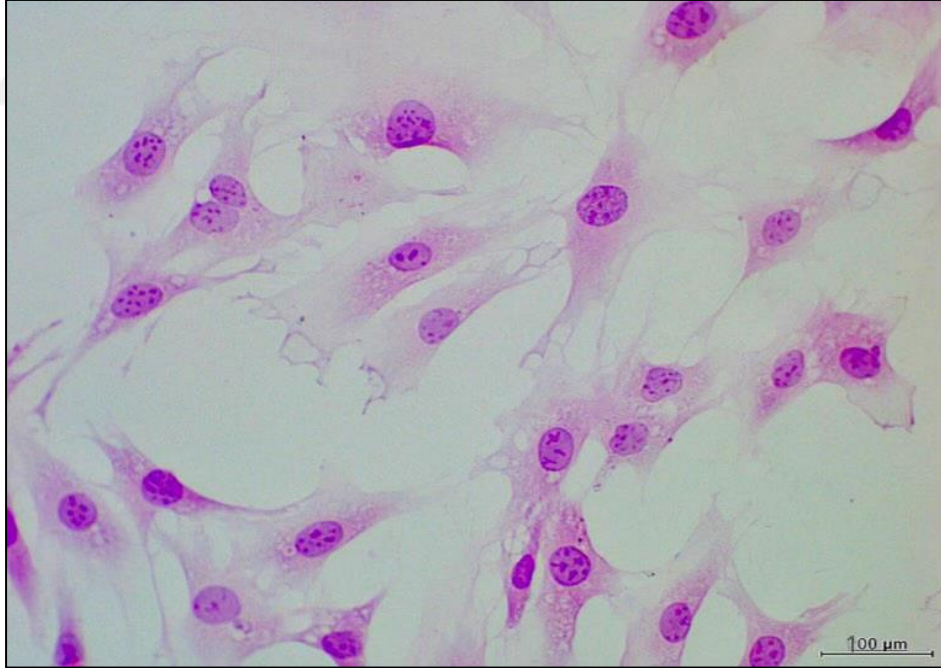
Deneylere başlamadan önce CRL-2073 (insan testis embriyonal karsinom hücre hattı), 10-HU103 (insan testis Leydig hücre hattı) ve CRL-2618 (fare testis Sertoli hücre hattı) hücrelerinin morfolojik analizleri için Hematoksilen ve Eozin (HE) boyama yapıldı. Yapılan HE boyama sonucuna göre hücrelerin morfolojilerinin hücre hatlarının sitesinde yer alan ürün bilgisi kısmındaki morfolojide olduğu gözlemlendi (Şekil 4.1, Şekil 4.2 ve Şekil 4.3).



**Şekil 4.1.** İnsan testis embriyonal karsinom hücrelerinin (CRL-2073) ışık mikroskopik görüntüsü (Boya: HE, Bar: 100 µm).



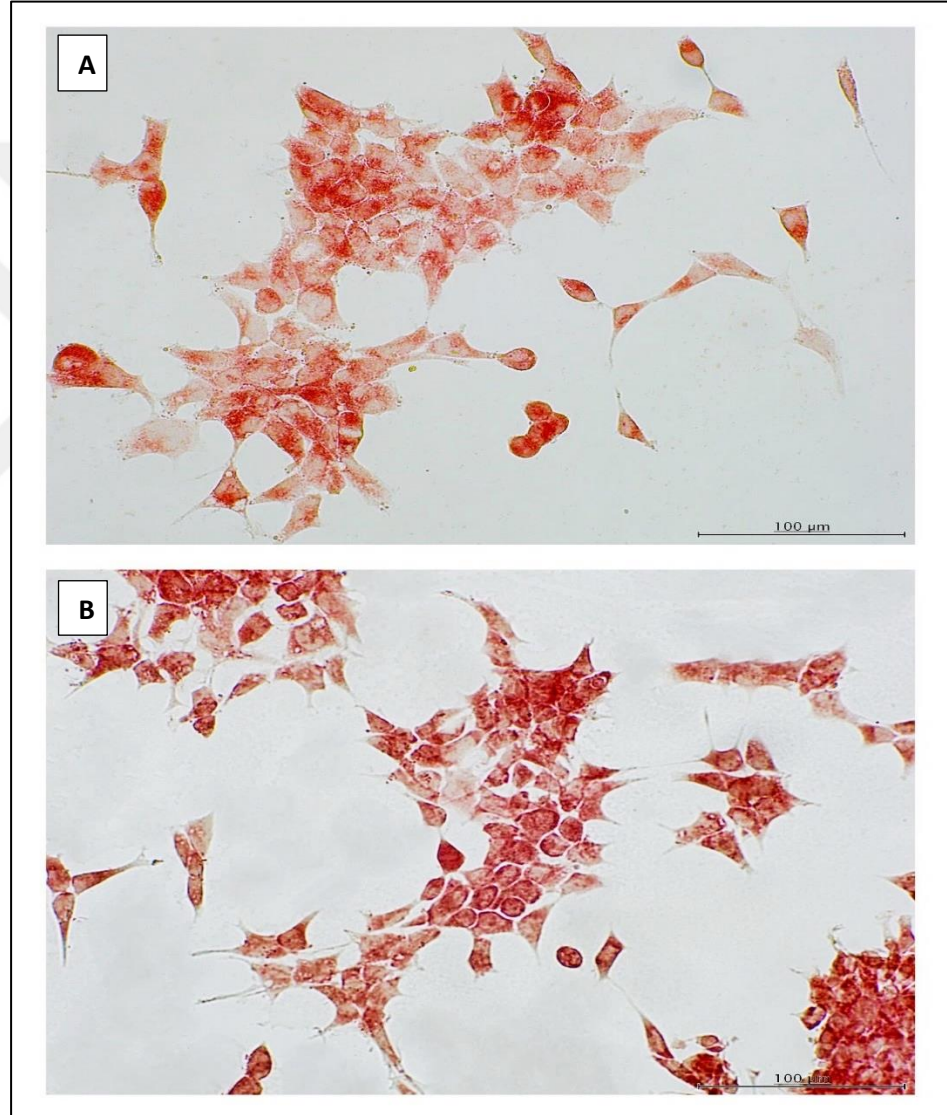
**Şekil 4.2.** İnsan Leydig hücrelerinin (10-HU103) ışık mikroskopik görüntüsü (Boya: HE, Bar: 200 µm).



**Şekil 4.3.** Fare Sertoli hücrelerinin (CRL-2618) ışık mikroskopik görüntüsü (Boya: HE, Bar: 100 µm).

#### 4.2. İnsan Testis Embriyonal Karsinom Hücre Hattında SVIP ve Ubikütin Proteinlerinin İmmünohistokimya Boyama ile Varlığının Gösterilmesi ile İlgili Bulgular

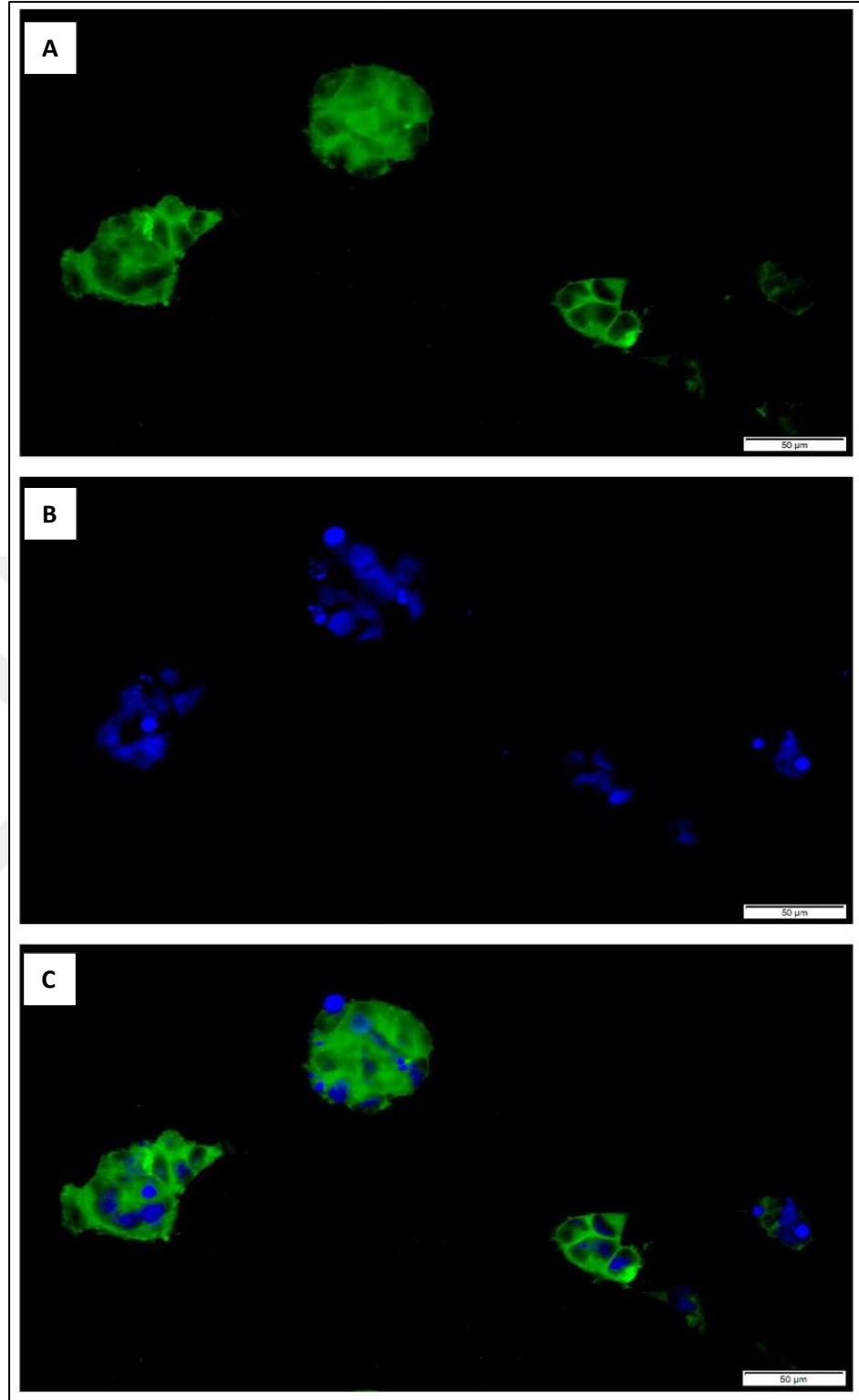
İnsan testis embriyonal karsinom hücre hattında daha önce SVIP protein ekspresyonuna bakılmamıştır. Bu tez çalışmasında ilk olarak protein ekspresyonunun var olup olmadığını anlamak için CRL-2073 hücrelerinde immünohistokimya yöntemi ile SVIP ve Ubikütin proteinlerinin var olduğu gösterildi (Şekil 4.4).



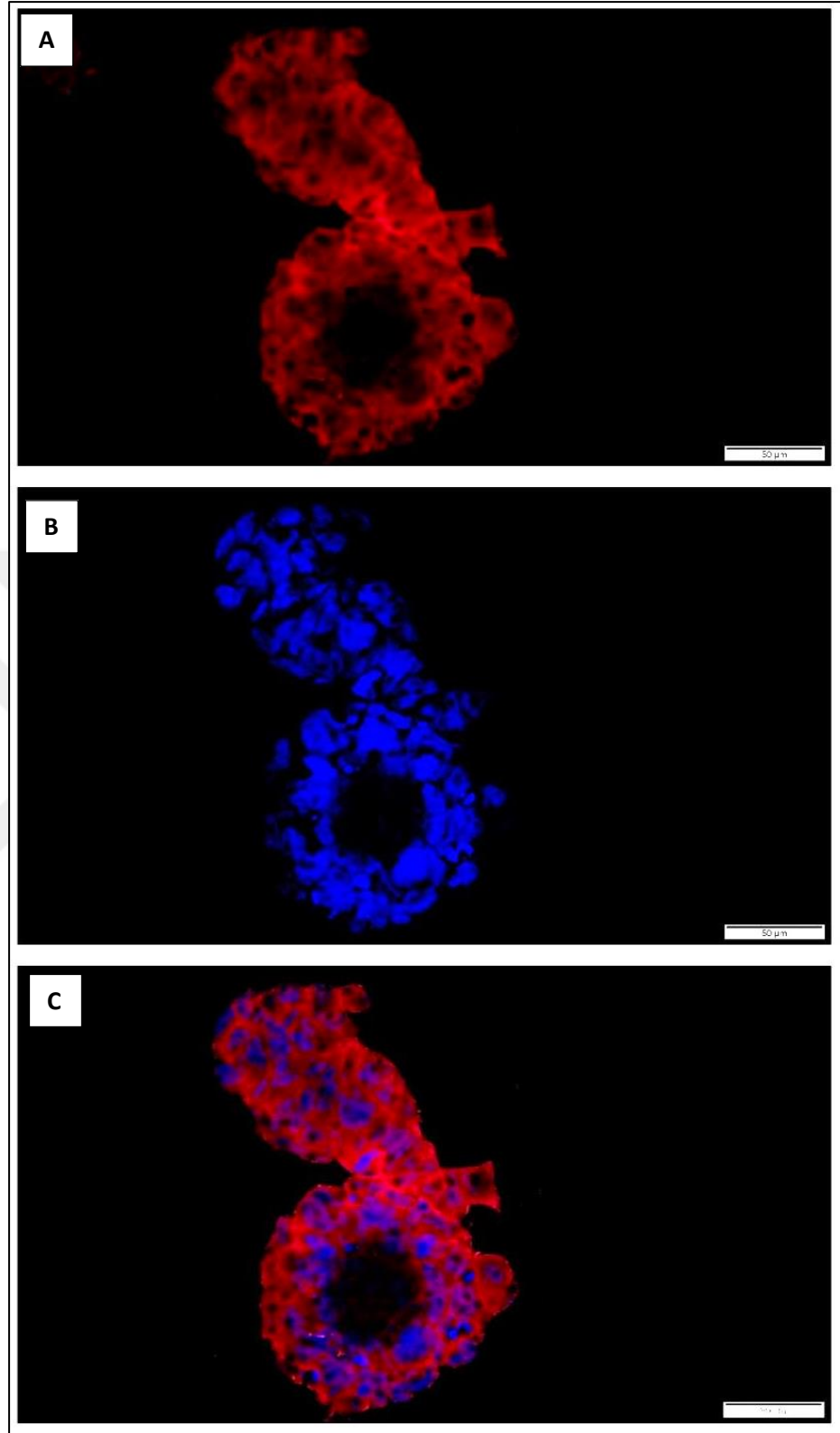
**Şekil 4.4.** İnsan embriyonal karsinom hücrelerinde SVIP ve Ubikütin proteinlerinin immünohistokimyasal olarak gösterilmesi (Bar: 100 µm, x400 büyütme).  
**A:** SVIP (1:50 dilüsyon) ve **B:** Ubikütin (1:50 dilüsyon).

### **4.3. İnsan Testis Embriyonal Karsinom, İnsan Leydig ve Fare Sertoli Hücre Hatlarında SVIP, Ubikutin, AR, USP26 ve UXT Proteinlerinin Varlığının Tespit Edilmesi ile İlgili Bulgular**

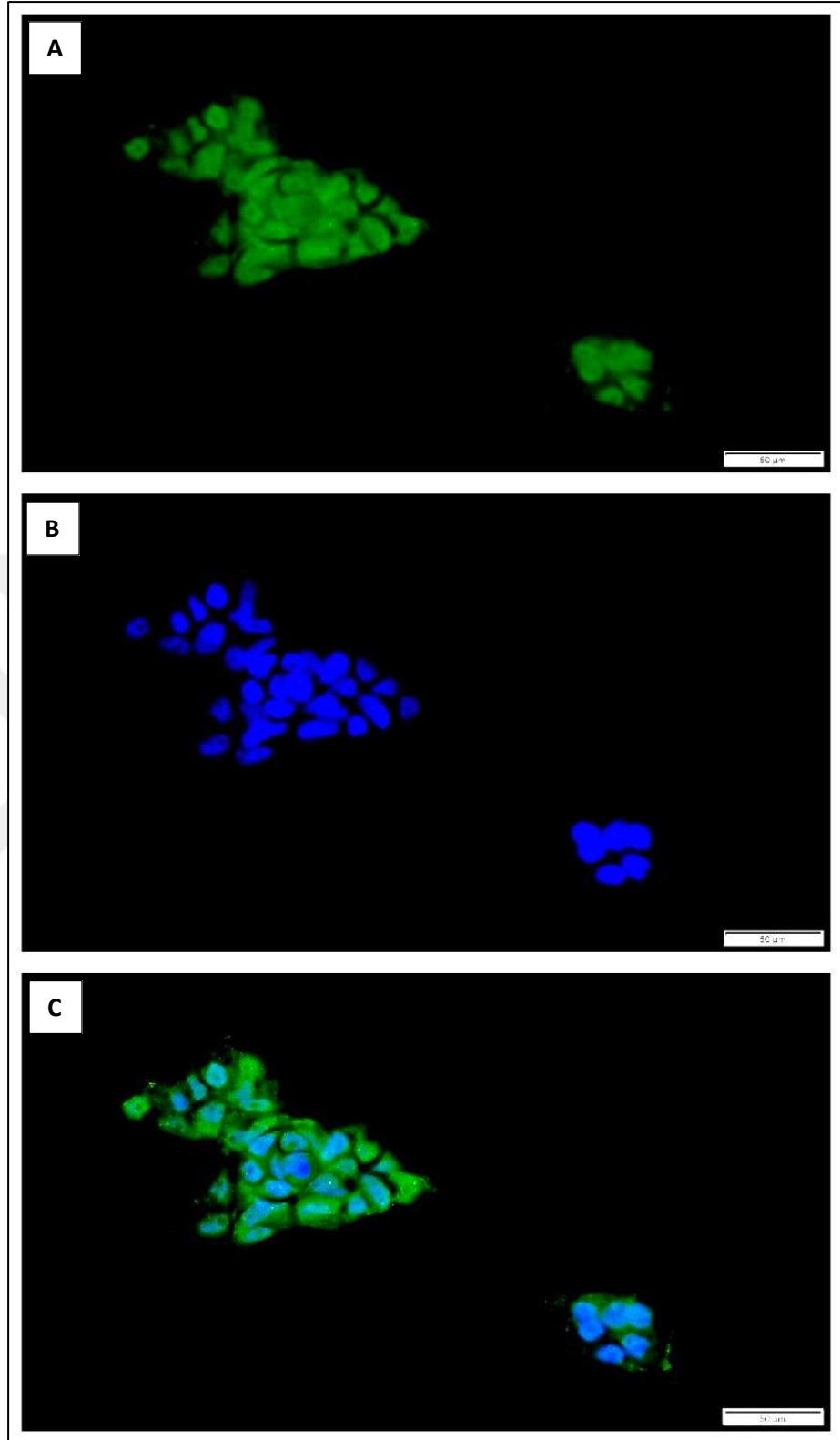
Literatürde yer alan bilgilere göre Leydig ve Sertoli hücrelerinde SVIP, Ubikutin, USP26 ve UXT protein ekspresyonlarının olduğu farklı çalışmalar vardır (Akcan vd., 2020; Alimoğulları vd., 2022; Lin vd., 2011). AR'lerin testis dokusunda Leydig, Sertoli ve peritübüler hücrelerde olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte AR'nin germ hücrelerindeki ekspresyonu tartışmalıdır (Johnston vd., 2001). Bu çalışmada germ hücrelerinde AR ekspresyonunun olup olmadığına da bakıldı. Pozitif kontrol olarak seçilen Leydig ve Sertoli hücrelerinde SVIP ekspresyonu çekirdek ve sitoplazma da gösterilmiştir (Akcan vd., 2020; Alimoğulları vd., 2022). İnsan testis embriyonal karsinom hücrelerinde daha önce SVIP ve etkileşimde olduğu proteinlerin ekspresyonu üzerine araştırma yapılmamıştır. Çalışmamızda insan testis embriyonal karsinom (Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8 ve Şekil 4.9), insan Leydig (Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12, Şekil 4.13 ve Şekil 4.14) ve fare Sertoli (Şekil 4.15, Şekil 4.16, Şekil 4.17, Şekil 4.18 ve Şekil 4.19) hücrelerinde bu proteinlerin ekspresyonlarının olup olmadığını test etmek için immünofloresan yöntemi uyguladındı ve proteinlerin varlığını gösterildi.



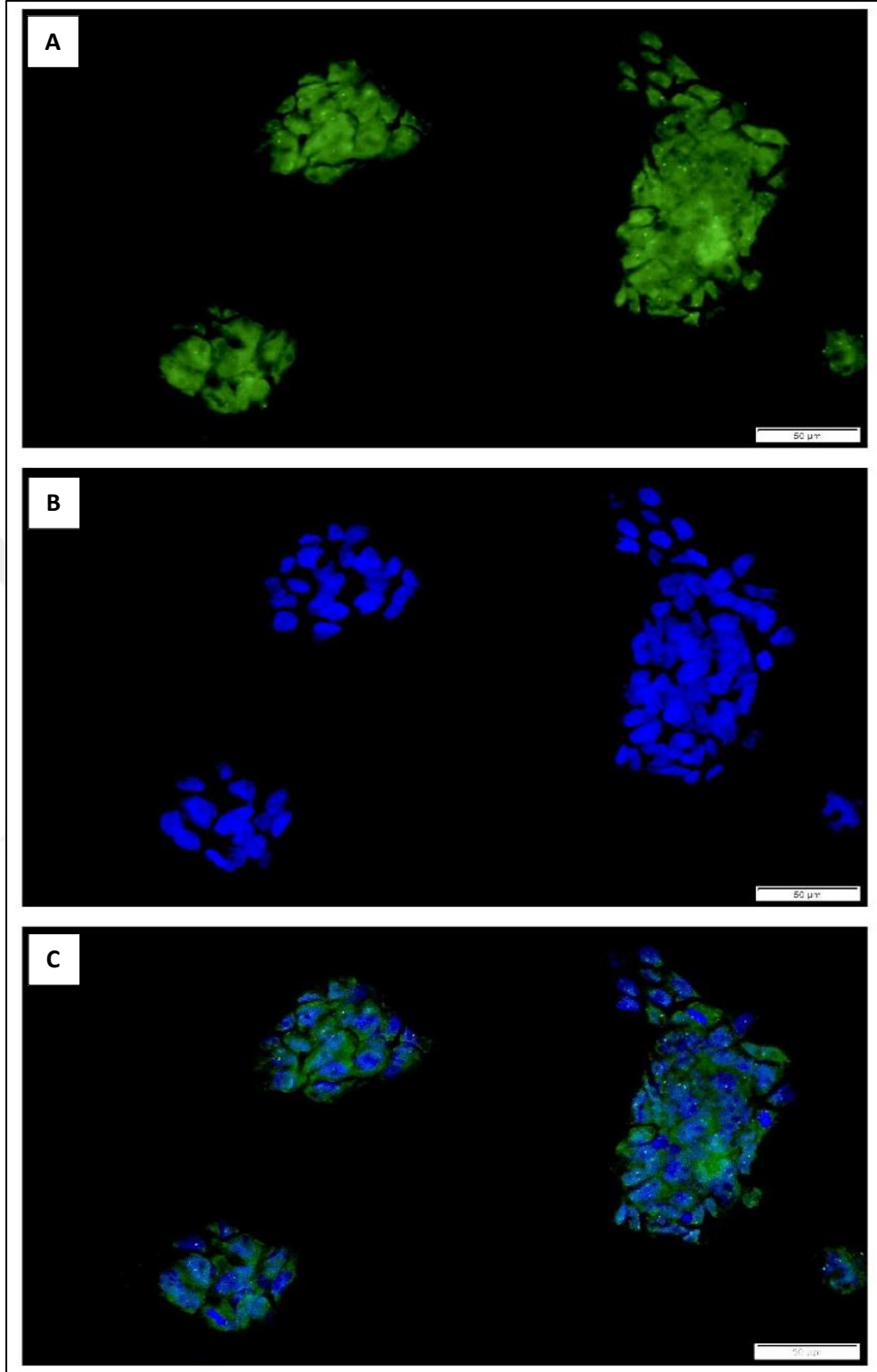
**Şekil 4.5.** İnsan testis embriyonal karsinom hücrelerinde (CRL-2073) SVIP ekspresyonunun immüno Floresan görüntüsü. A: FITC B: DAPI C: FITC + DAPI (Bar: 50 µm).



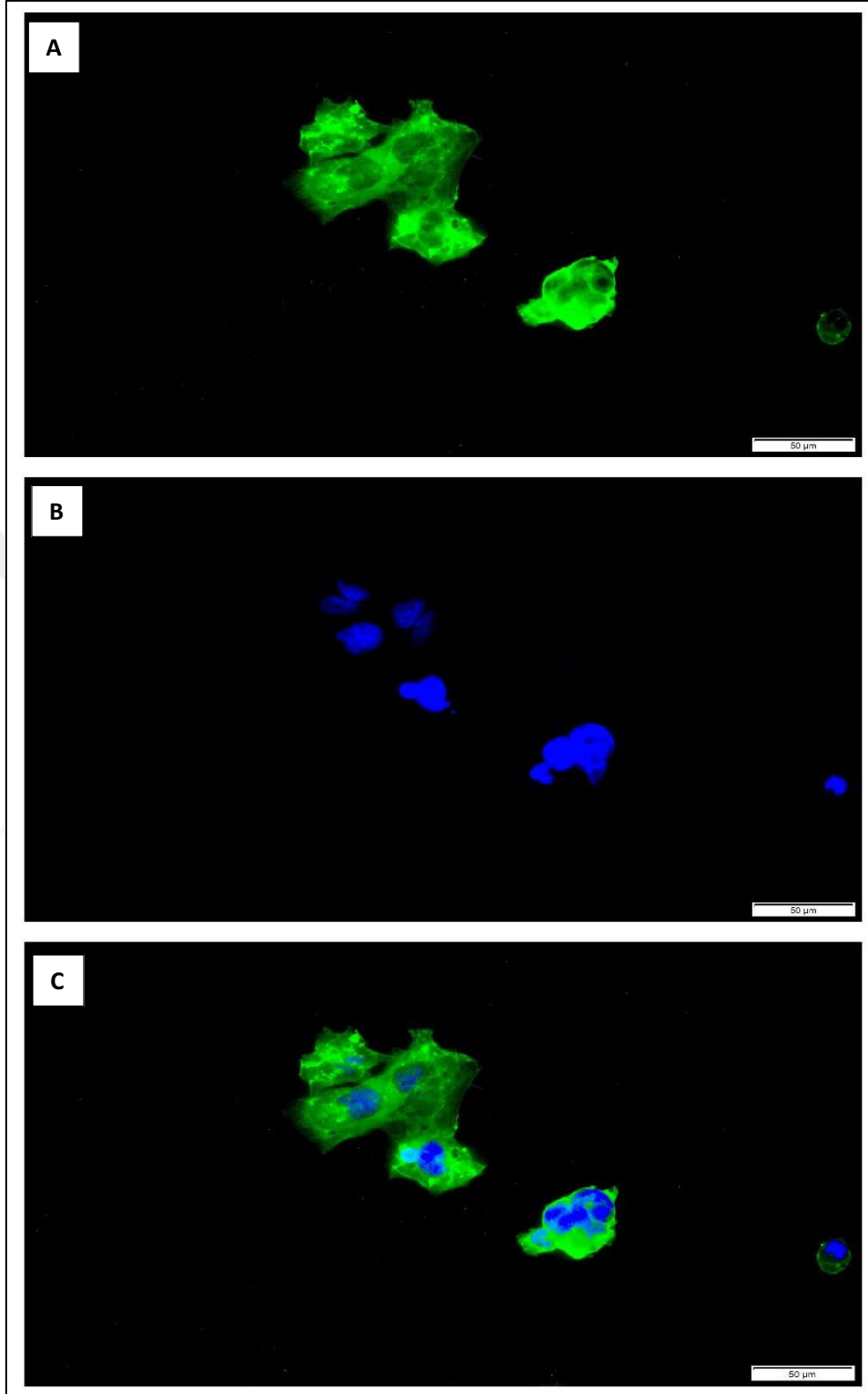
**Şekil 4.6.** İnsan testis embriyonal karsinom hücrelerinde (CRL-2073) Ubikutin ekspresyonunun immunofloresan görüntüsü. A: Texas Red B: DAPI C: Texas Red + DAPI (Bar: 50 µm).



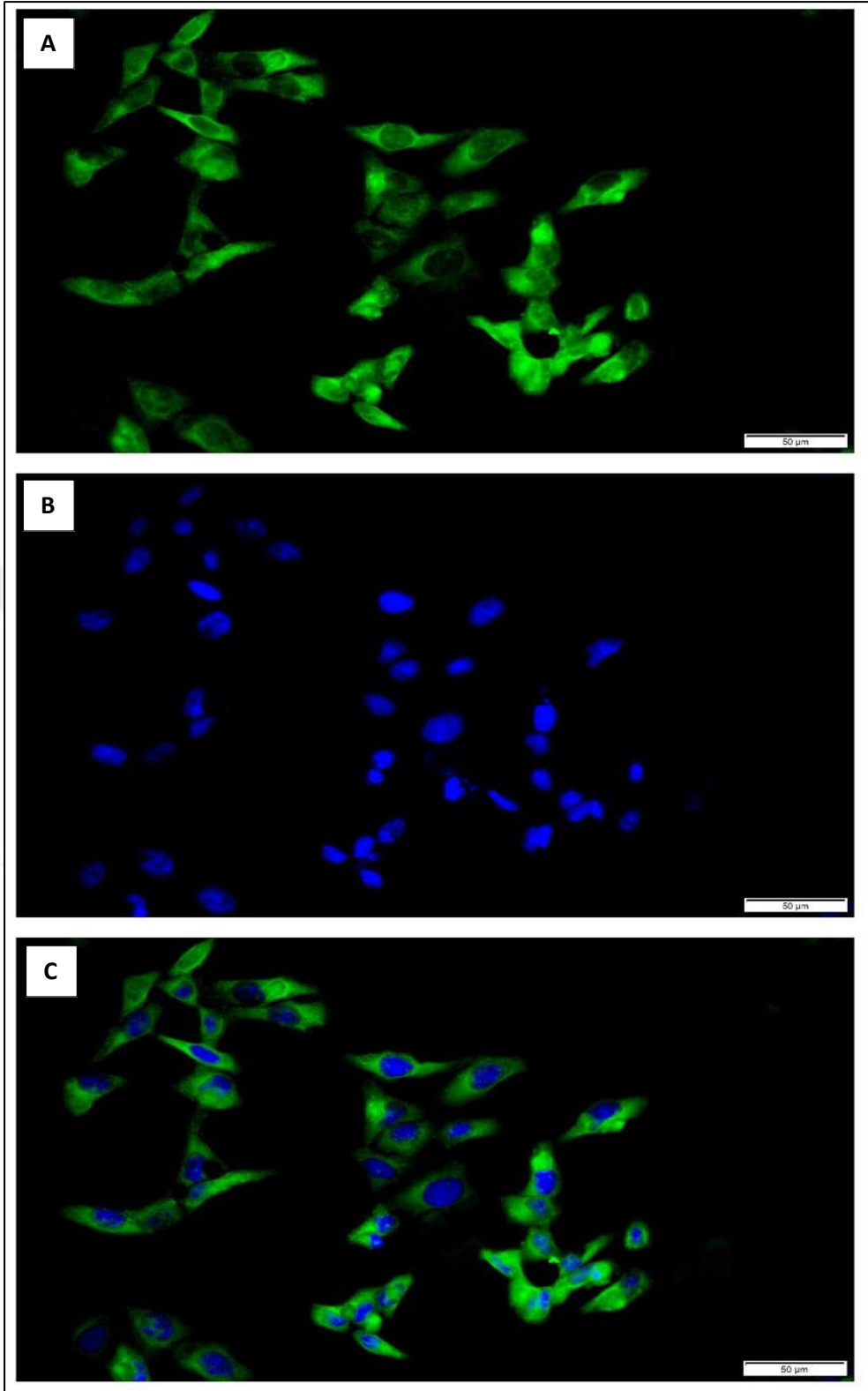
**Şekil 4.7.** İnsan testis embriyonal karsinom hücrelerinde (CRL-2073)AR ekspresyonunun immunofloresan görüntüsü. A: FITC B: DAPI C: FITC + DAPI (Bar: 50 µm).



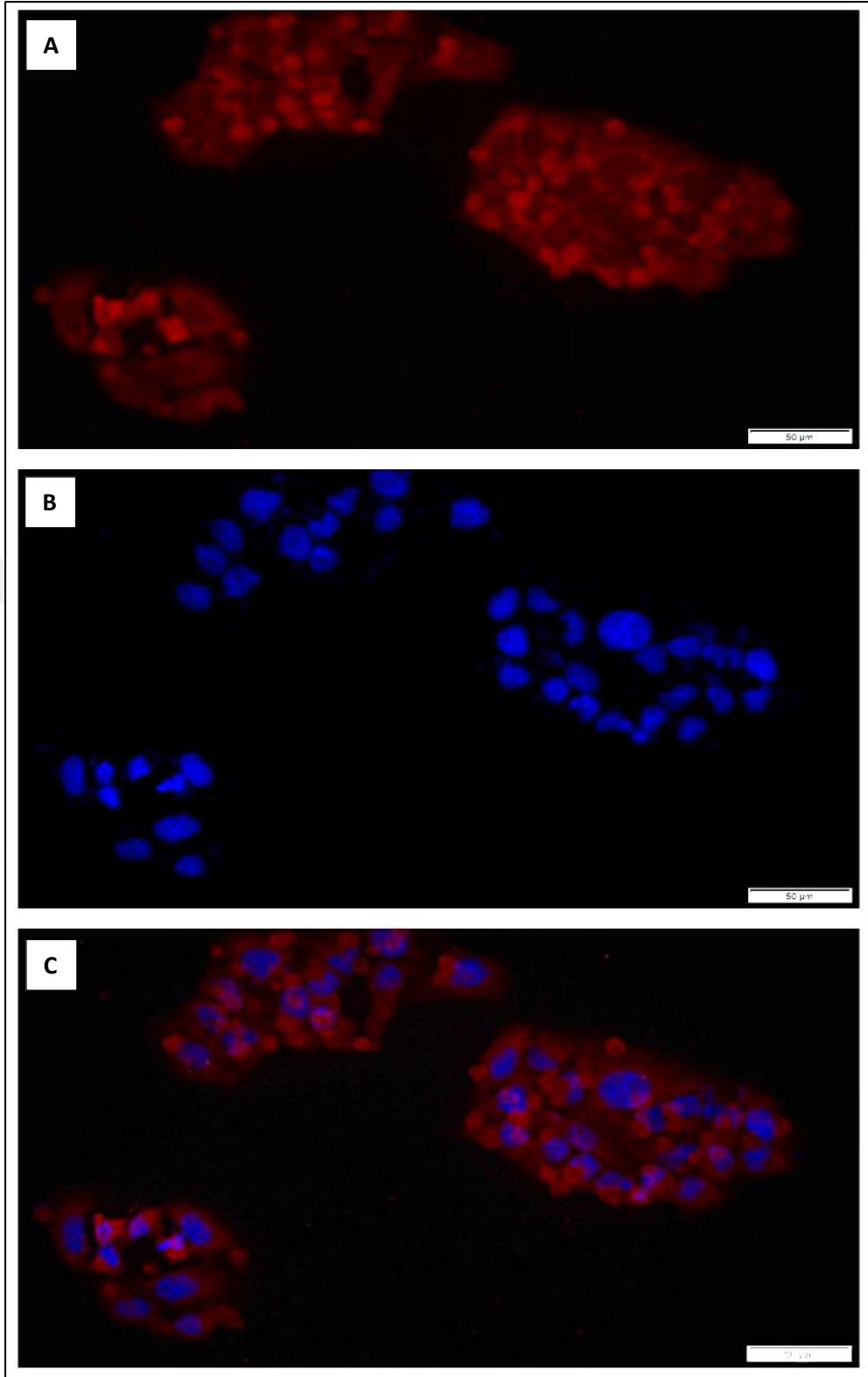
**Şekil 4.8.** İnsan testis embriyonal karsinom hücrelerinde (CRL-2073) USP26 ekspresyonunun immunofloresan görüntüsü. A: FITC B: DAPI C: FITC + DAPI (Bar: 50 µm).



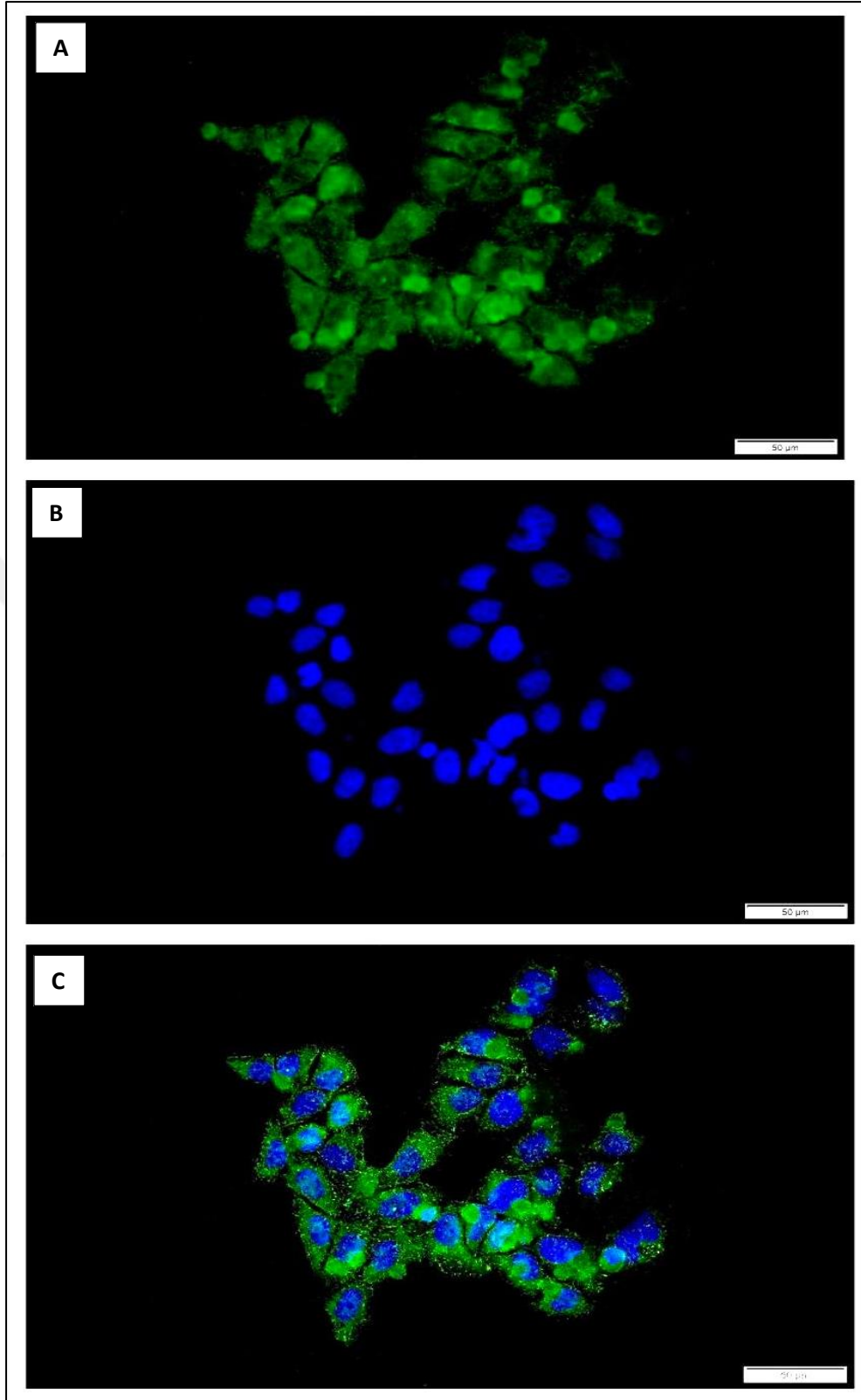
**Şekil 4.9.** İnsan testis embriyonal karsinom hücrelerinde (CRL-2073) UXT ekspresyonunun immünofloresan görüntüsü. A: FITC B: DAPI C: FITC + DAPI (Bar: 50 µm).



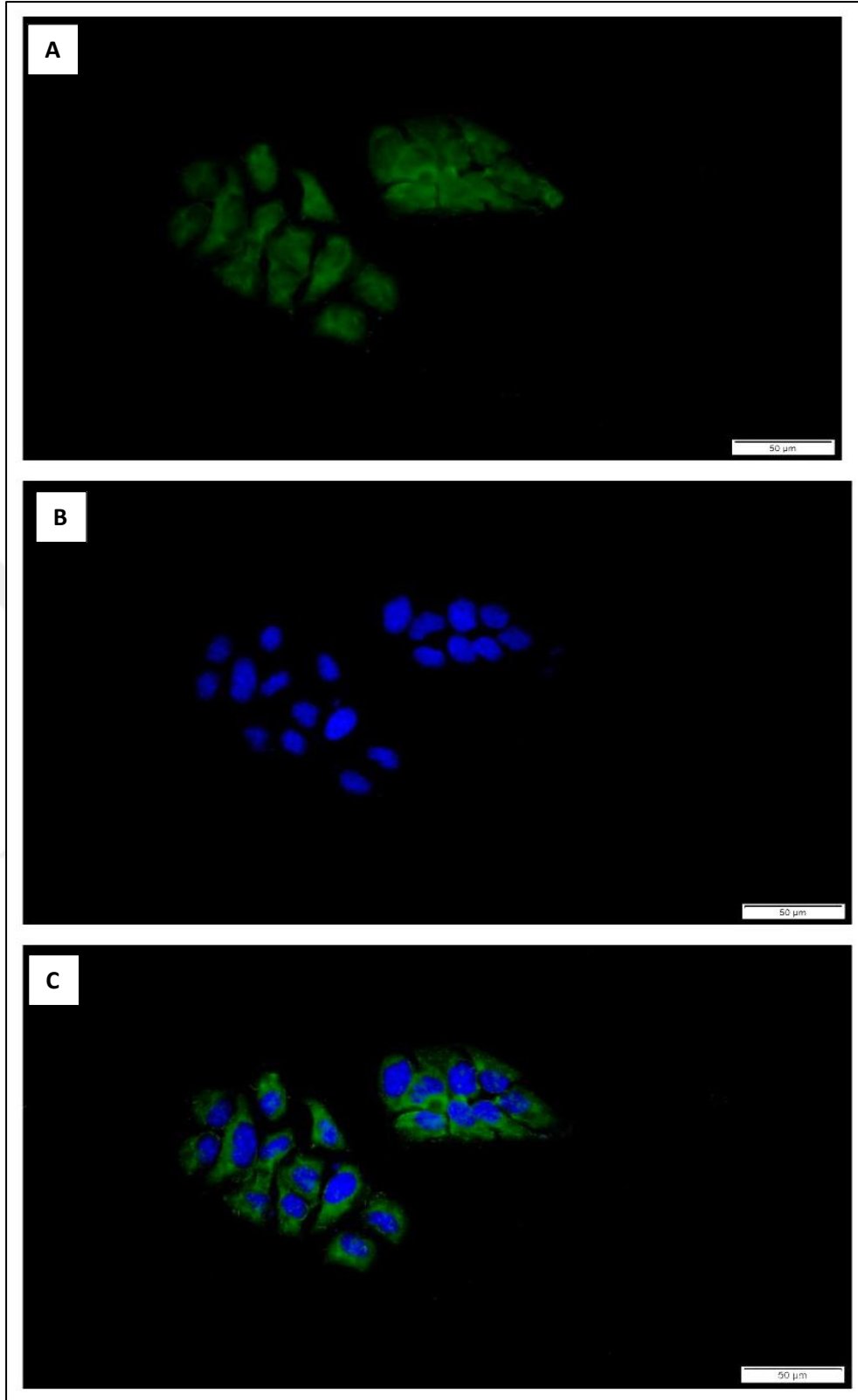
**Şekil 4.10.** İnsan Leydig hücrelerinde (10-HU103) SVIP ekspresyonunun immüno Floresan görüntüsü. A: FITC B: DAPI C: FITC + DAPI (Bar: 50 µm).



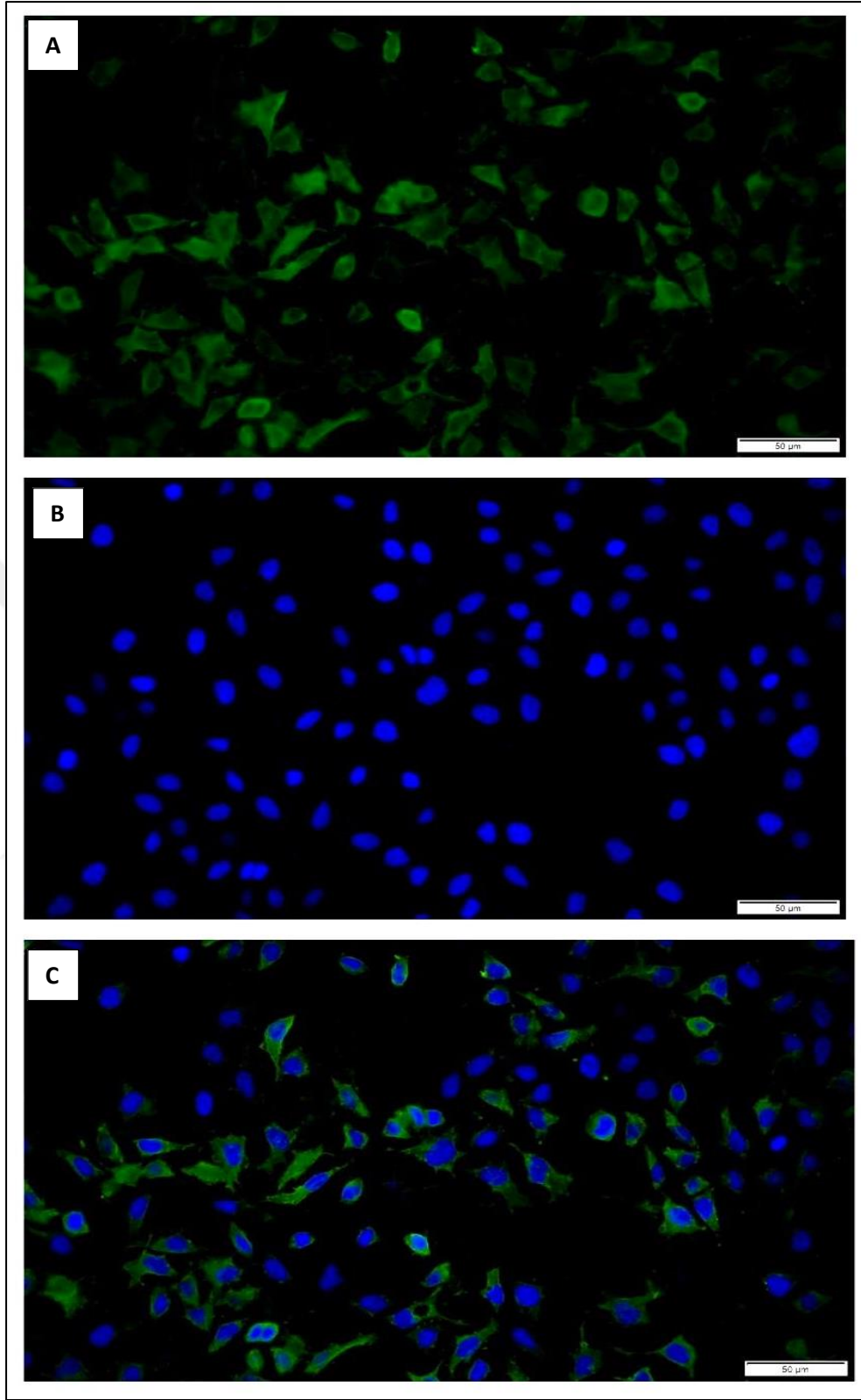
**Şekil 4.11.** İnsan Leydig hücrelerinde (10-HU103) Ubikutin ekspresyonunun immünofloresan görüntüsü. A: Texas Red B: DAPI C: Texas Red + DAPI (Bar: 50 µm).



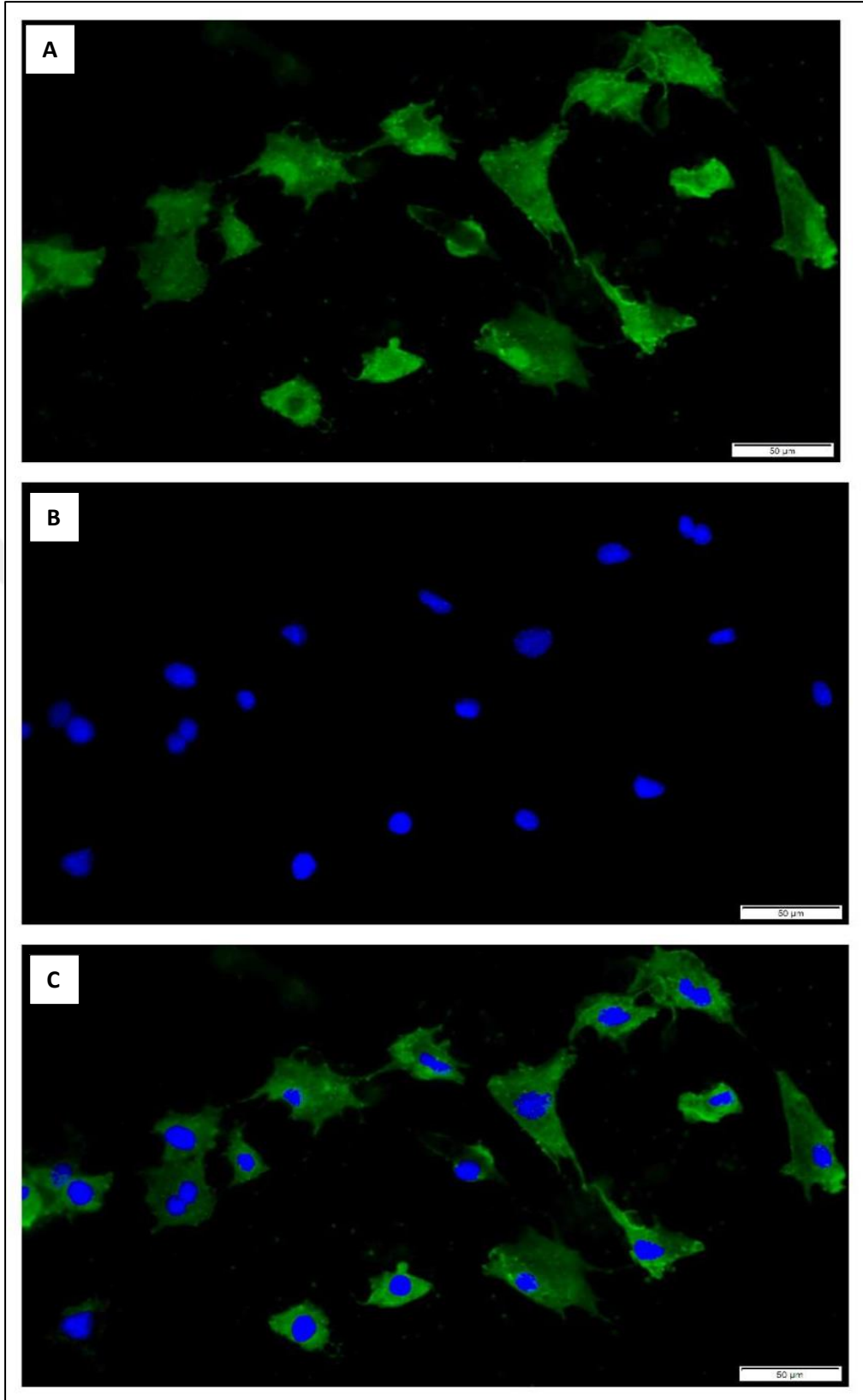
**Şekil 4.12.** İnsan Leydig hücrelerinde (10-HU103) AR ekspresyonunun immüno Floresan görüntüsü. A: FITC B: DAPI C: FITC + DAPI (Bar: 50 µm).



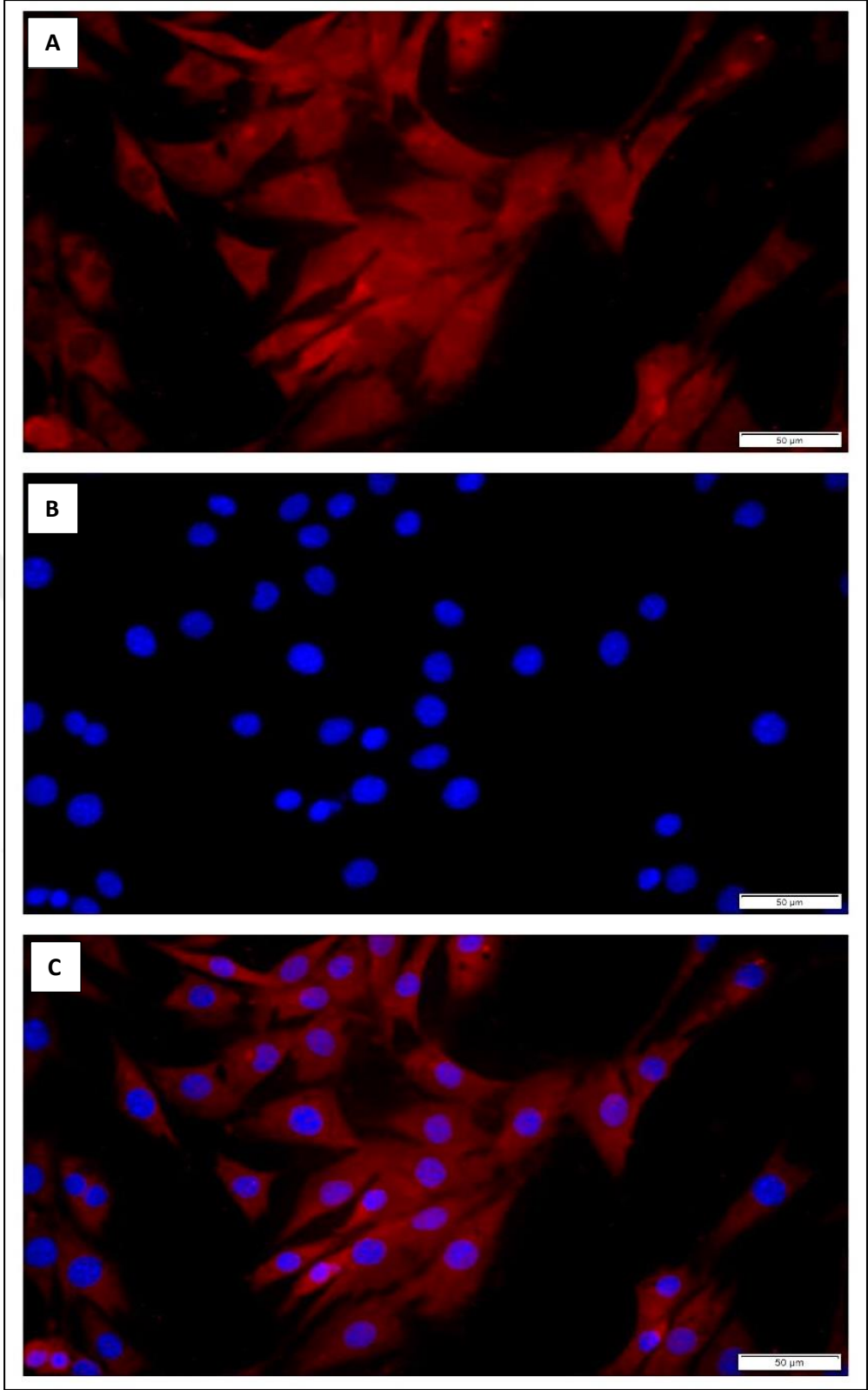
**Şekil 4.13.** İnsan Leydig hücrelerinde (10-HU103) USP26 ekspresyonunun immünofloresan görüntüsü. A: FITC B: DAPI C: FITC + DAPI (Bar: 50 µm).



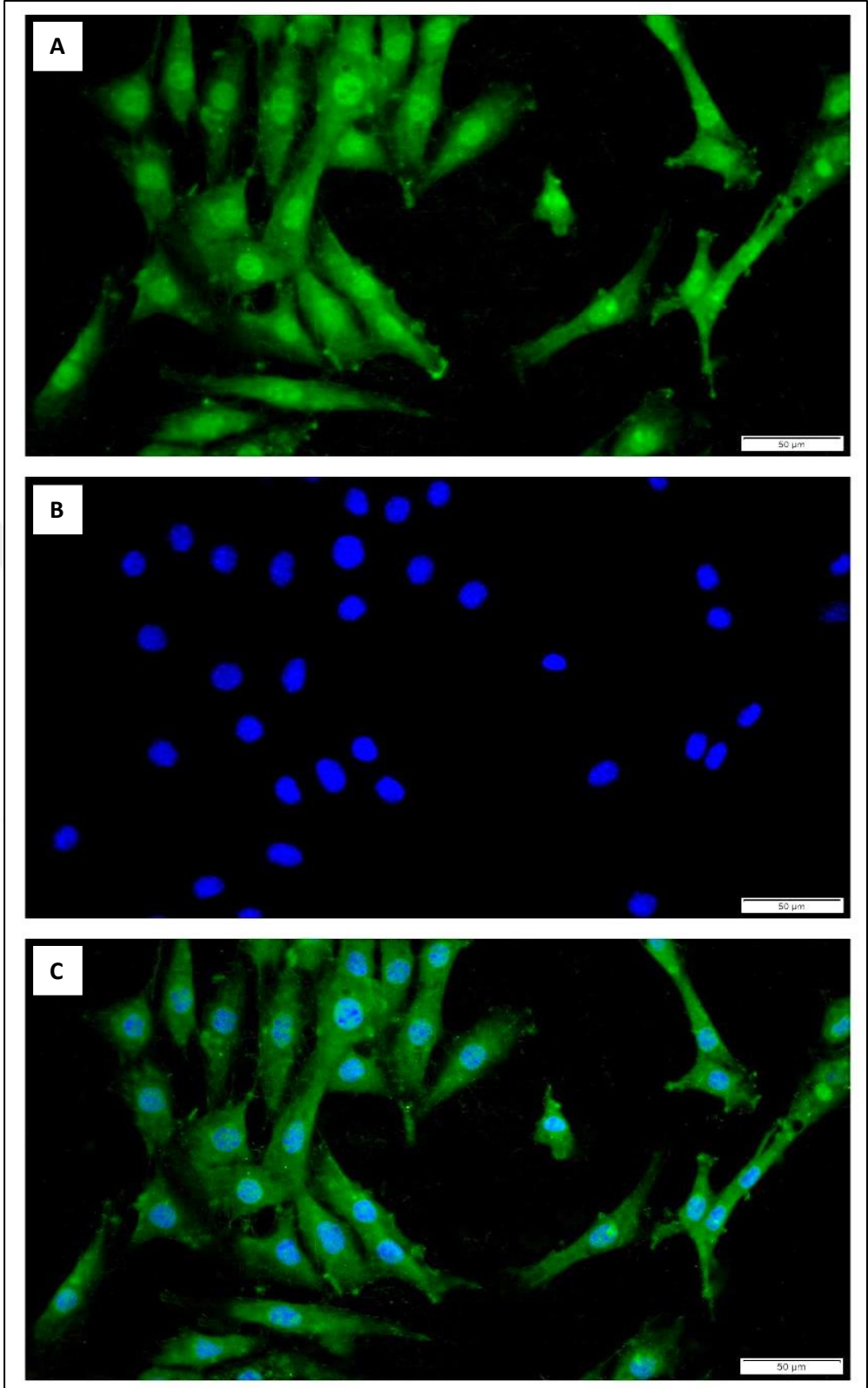
**Şekil 4.14.** İnsan Leydig hücrelerinde (10-HU103) UXT ekspresyonunun immüno Floresan görüntüsü. A: FITC B: DAPI C: FITC + DAPI (Bar: 50 µm).



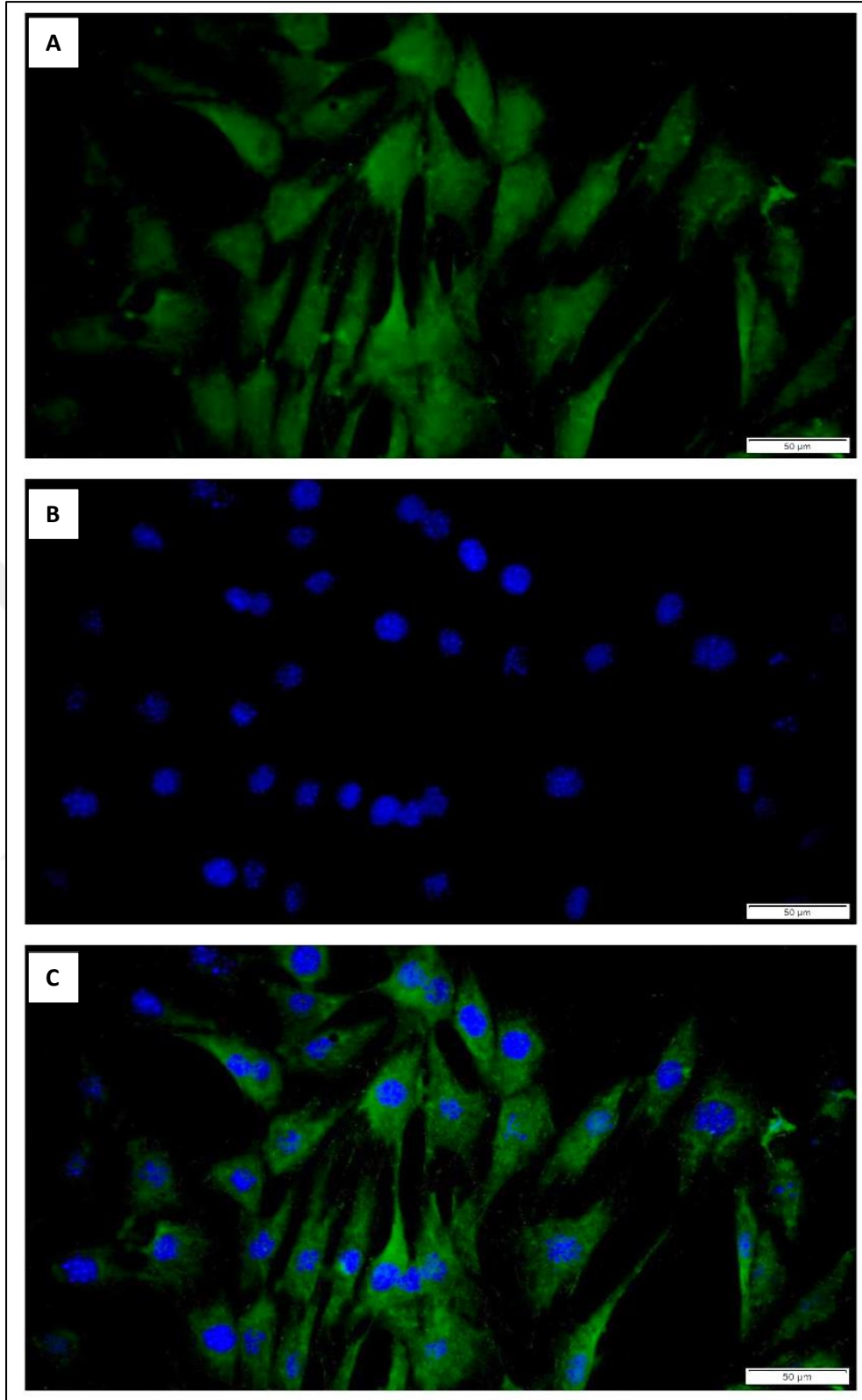
**Şekil 4.15.** *Fare Sertoli hücrelerinde (CRL-2618) SVIP ekspresyonunun immünofloresan görüntüsü. A: FITC B: DAPI C: FITC + DAPI (Bar: 50 µm).*



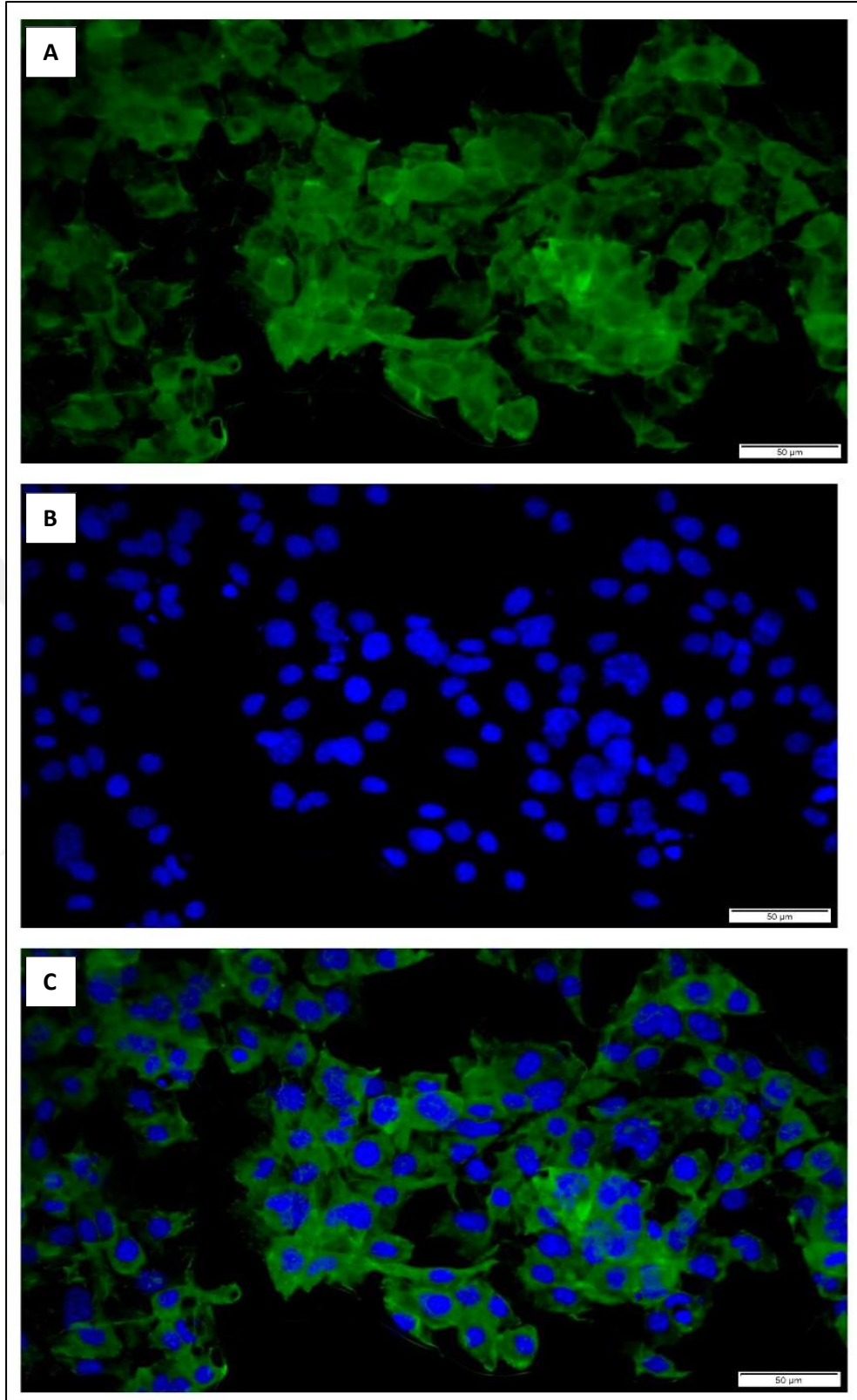
**Şekil 4.16.** Fare Sertoli hücrelerinde (CRL-2618) ubikutin ekspresyonunun immüno Floresan görüntüsü. A: Texas Red B: DAPI C: Texas Red + DAPI (Bar: 50 µm).



**Şekil 4.17.** *Fare Sertoli hücrelerinde (CRL-2618) AR ekspresyonunun immünofloresan görüntüsü. A: FITC B: DAPI C: FITC + DAPI (Bar: 50 µm).*



**Şekil 4.18.** Fare Sertoli hücrelerinde (CRL-2618) USP26 ekspresyonunun immüno Floresan görüntüsü. A: FITC B: DAPI C: FITC + DAPI (Bar: 50 µm).



**Şekil 4.19.** Fare Sertoli hücrelerinde (CRL-2618) UXT ekspresyonunun immünofloresan görüntüsü. A: FITC B: DAPI C: FITC + DAPI (Bar: 50 µm).

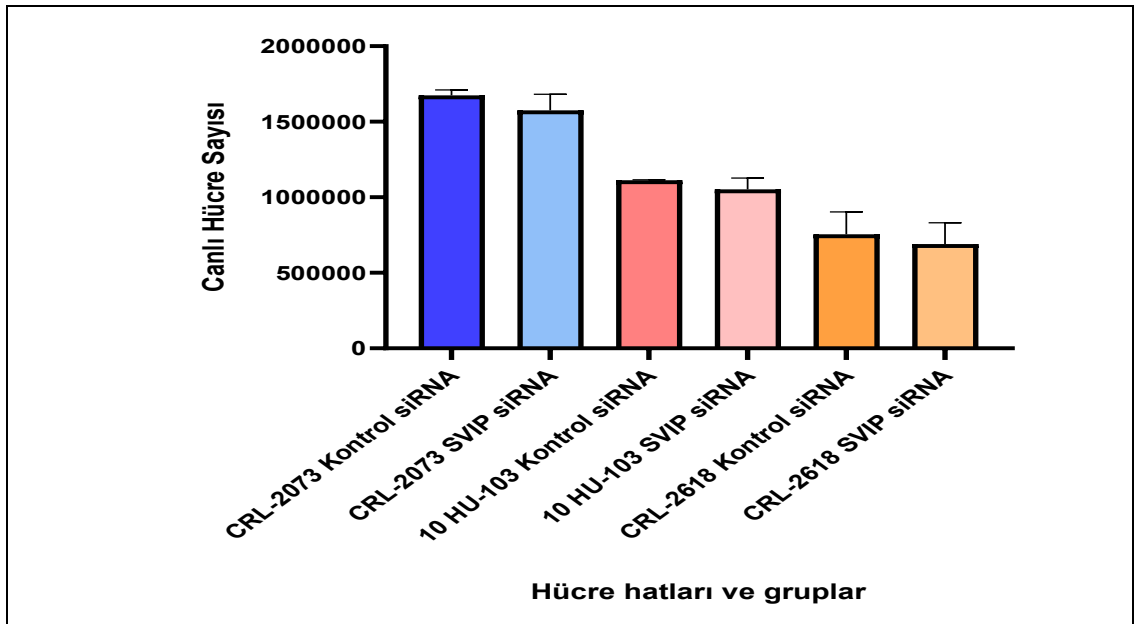
#### 4.4. Hücre Canlılık Analizi ile İlgili Bulgular

CRL-2073, 10-HU103 ve CRL-2618 hücre hatlarında SVIP gen ekspresyonunun baskılanması için uygulanan SVIP siRNA dozu literatüre göre belirlendi (Alimoğulları, 2020; Şahin, 2021). Transfeksiyon işlemi sonrası hücre canlılık analizi için tripan mavisi ile boyama yapıldı. Boyama sonunda yapılan hesaplama göre uygulanan SVIP siRNA dozu hücreler için uygun bulundu. Kontrol siRNA ve SVIP siRNA ile transfekte edilen gruplarda canlı hücre sayısı karşılaştırıldığında, uygulanan SVIP siRNA dozunun hücreler için toksik olmadığı görüldü (Tablo 4.1).

$$\text{Canlı hücre sayısı} = \frac{1. \text{tekrarda sayılan hücre sayısı} + 2. \text{tekrarda sayılan hücre sayısı}}{2} \times 2 \text{ (diltüsyon faktörü)} \times 10^4 \text{ (1 ml'de hücre sayısı)}$$

**Tablo 4.1.** Hücre hatlarına kontrol siRNA ve SVIP siRNA uygulaması sonrası canlı hücre sayıları.

Hücre Hattı	Kontrol siRNA	SVIP siRNA
<b>CRL-2073</b> (2 sayım)	1.650.000 1.700.000	1.500.000 1.650.000
<b>10-HU103</b> (2 sayım)	1.000.000 1.115.000	1.112.000 1.105.000
<b>CRL-2618</b> (2 sayım)	650.000 860.000	590.000 790.000



**Şekil 4.20.** Canlılık analizi sonuç grafiği (CRL-2073 için p değeri 0.167; 10 HU-103 için p değeri 0.183; CRL-2618 için p değeri 0.349. Bütün p değerleri  $p > 0.05$ ).

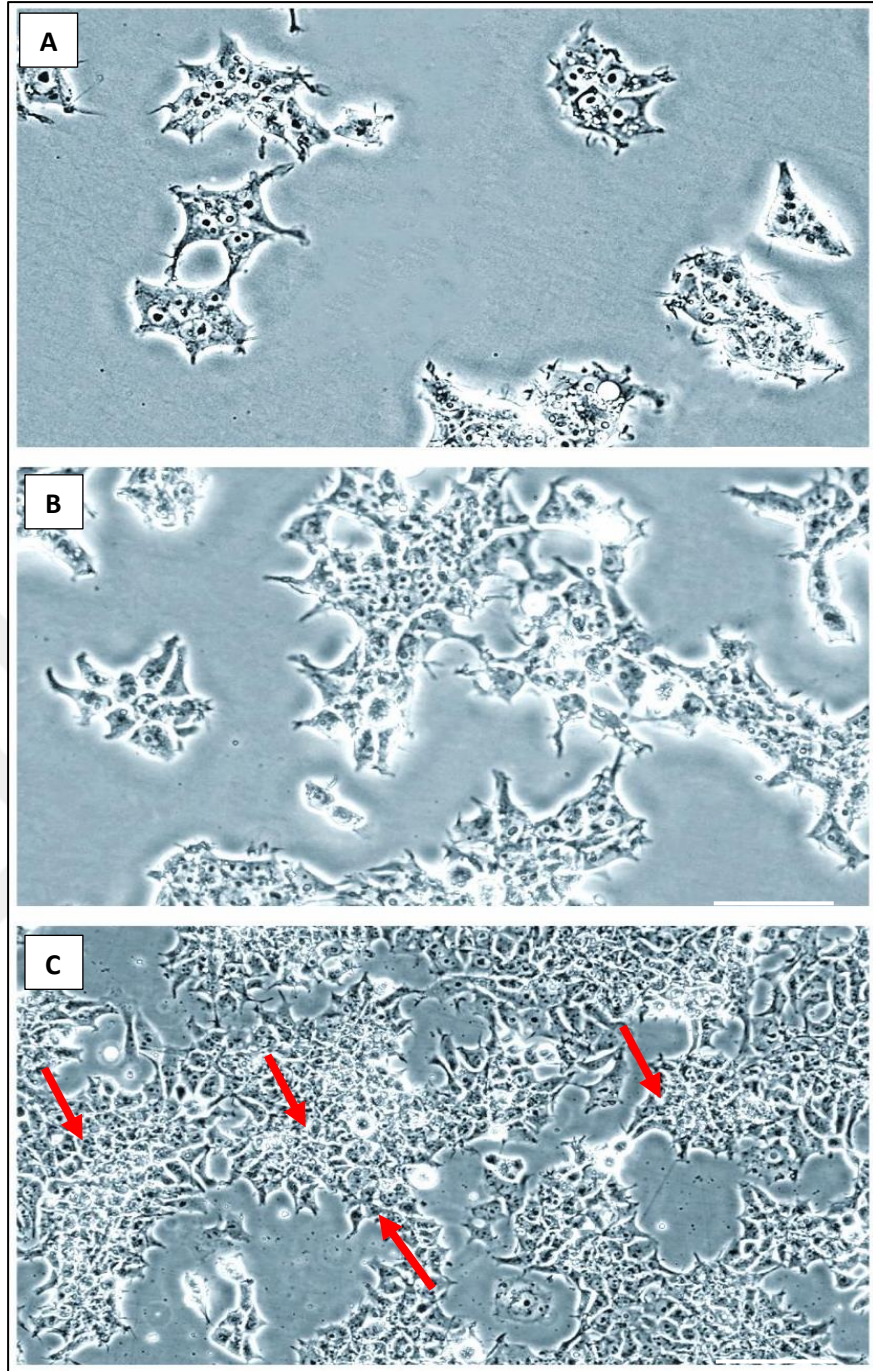
Hücre hatları özelinde kontrol siRNA ve SVIP siRNA grupları arasında anlamlı fark bulunmaması ile SVIP siRNA için uygulanan konsantrasyonun CRL-2073, 10-HU108 ve CRL-2618 hücrelerinde hücre canlılığını olumsuz yönde etkilemediği gösterildi (Bkz. Şekil 4.20). Bu yüzden bundan sonraki deneylere belirlenen konsantrasyon ile devam edildi.

#### **4.5. İnsan Testis Embriyonal Karsinom, İnsan Leydig ve Fare Sertoli Hücrelerinde SVIP siRNA'lar ile SVIP Ekspresyonunun Baskılanması Sonrası Morfolojik Değerlendirme Bulguları**

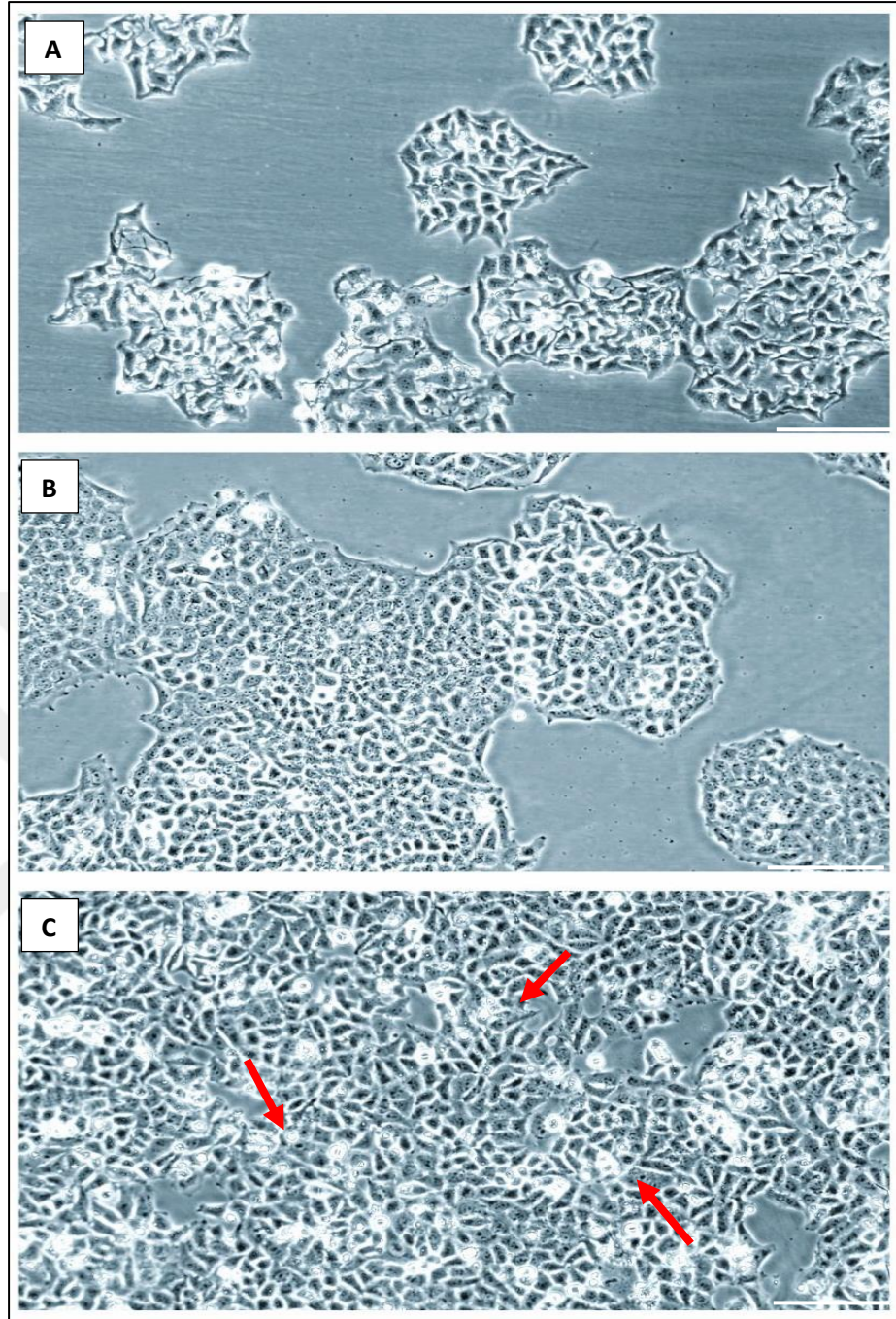
CRL-2073, 10-HU103 ve CRL-2618 hücre hatlarında SVIP ekspresyonunu baskılamak için 4 farklı SVIP siRNA bir arada kullanılarak transfeksiyon yapıldı.

Kontrol siRNA ve SVIP siRNA grupları arasında SVIP, Ubikutin, AR, USP26 ve UXT protein ve gen düzeyindeki ekspresyon farklılıklarına bakmadan önce SVIP siRNA kullanılarak transfekte edilen hücrelerin morfolojilerindeki farklılıklar invert mikroskop ile değerlendirildi (Şekil 4.21, Şekil 4.22 ve Şekil 4.23).

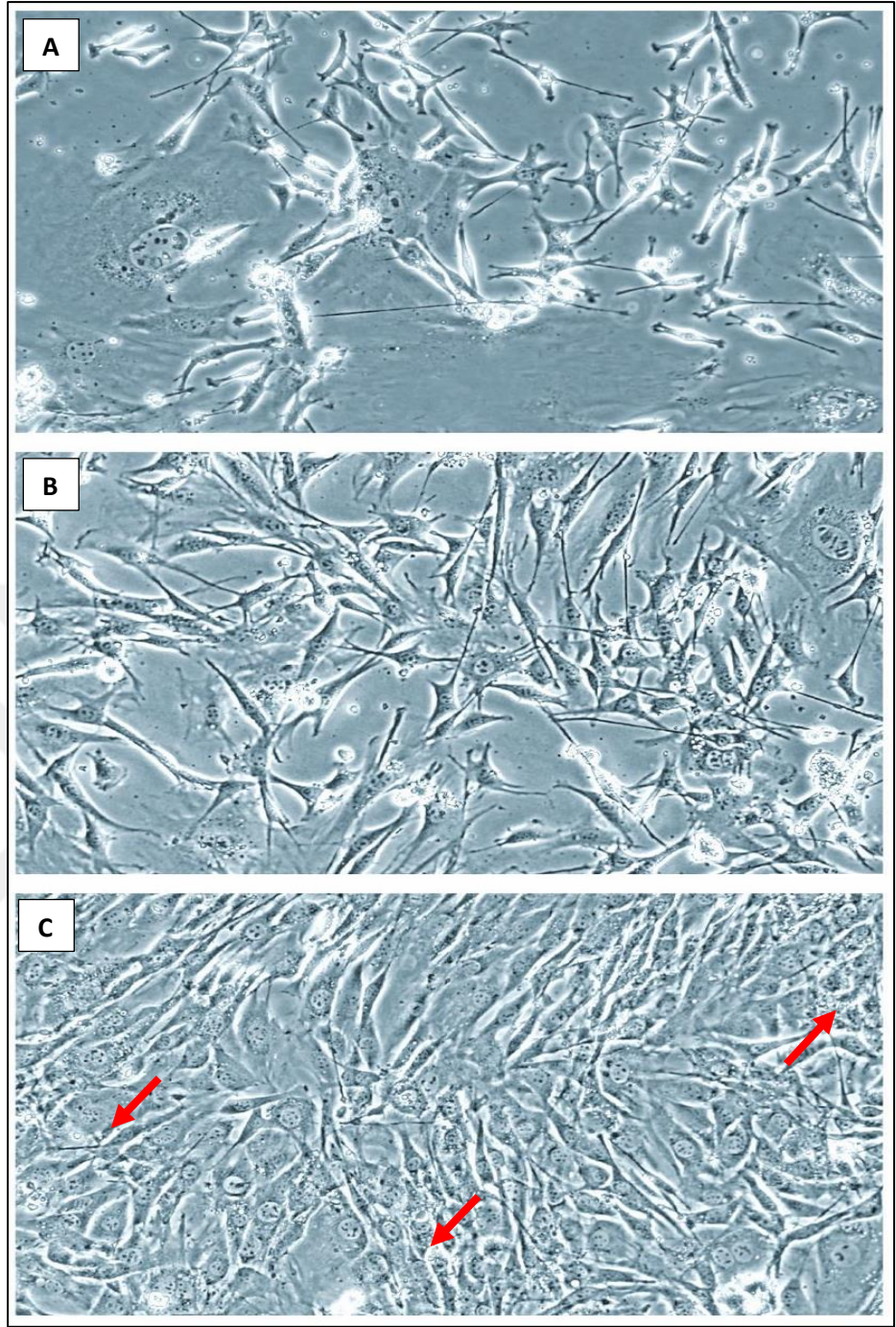
Şekil 4.21, Şekil 4.22 ve Şekil 4.23 de görüldüğü gibi, kontrol grubu ve kontrol siRNA ile transfekte edilen hücre grubu morfolojileri incelendiğinde farklılık gözlenmemiştir. Fakat SVIP siRNA ile transfeksiyonun sonrasında hücrelerin sitoplazmasında vakuol oluşumları gözlenmiştir.



**Şekil 4.21.** İnsan testis embriyonal karsinom hücrelerinin (CRL-2073) SVIP transfeksiyonu öncesi ve sonrası morfolojilerinin ışık mikroskopik görüntüsü (A, B, C). A: Kültüre edilmiş CRL-2073 hücreleri. B: CRL-2073 hücrelerinin kontrol siRNA ile transfeksiyonunun 48 saat sonrasındaki görünümü. C: CRL-2073 hücrelerinin SVIP siRNA ile transfeksiyonunun 48 saat sonrasındaki görünümü. Kırmızı ok: SVIP siRNA ile transfeksiyon sonrasında hücrelerin sitoplazmasındaki vakuol oluşumları (Bar: 50 µm).



**Şekil 4.22.** İnsan Leydig hücrelerinin (10HU-103) SVIP transfeksiyonu öncesi ve sonrası morfolojilerinin ışık mikroskopik görüntüsü (A, B, C). A: Kültüre edilmiş 10-HU103 hücreleri. B: 10-HU103 hücrelerinin kontrol siRNA ile transfeksiyonunun 48 saat sonrasındaki görünümü. C: 10-HU103 hücrelerinin SVIP siRNA ile transfeksiyonunun 48 saat sonrasındaki görünümü. Kırmızı ok: SVIP siRNA ile transfeksiyon sonrasında hücrelerin sitoplazmasındaki vakuol oluşumları (Bar: 50  $\mu$ m).



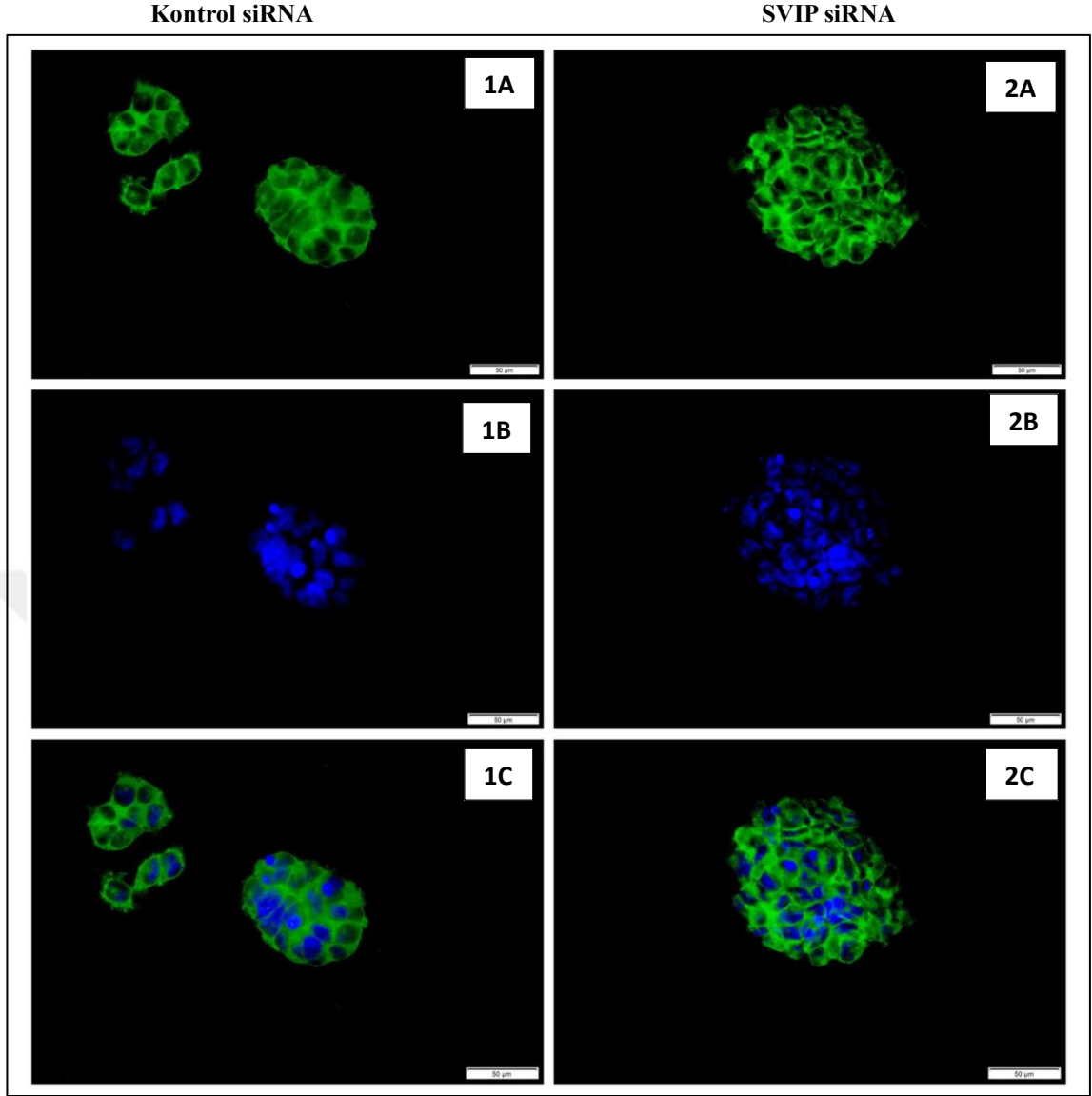
**Şekil 4.23.** Fare Sertoli hücrelerinin (CRL-2618) SVIP transfeksiyonu öncesi ve sonrası morfolojilerinin ışık mikroskopik görüntüsü (A, B, C). A: Kültüre edilmiş CRL-2618 hücresi. B: CRL-2618 hücrelerinin kontrol siRNA ile transfeksiyonunun 48 saat sonrasındaki görünümü. C: CRL-2618 hücrelerinin SVIP siRNA ile transfeksiyonunun 48 saat sonrasındaki görünümü. Kırmızı ok: SVIP siRNA ile transfeksiyon sonrasında hücrelerin sitoplazmasındaki vakuol oluşumları (Bar: 50  $\mu$ m).

#### **4.6. İnsan Testis Embriyonal Karsinom, İnsan Leydig ve Fare Sertoli Hücre Hatlarında SVIP siRNA Transfeksiyonu Sonrası SVIP, Ubikütin, AR, USP26 ve UXT Proteinlerinin İmmunofloresan Boyama Bulguları**

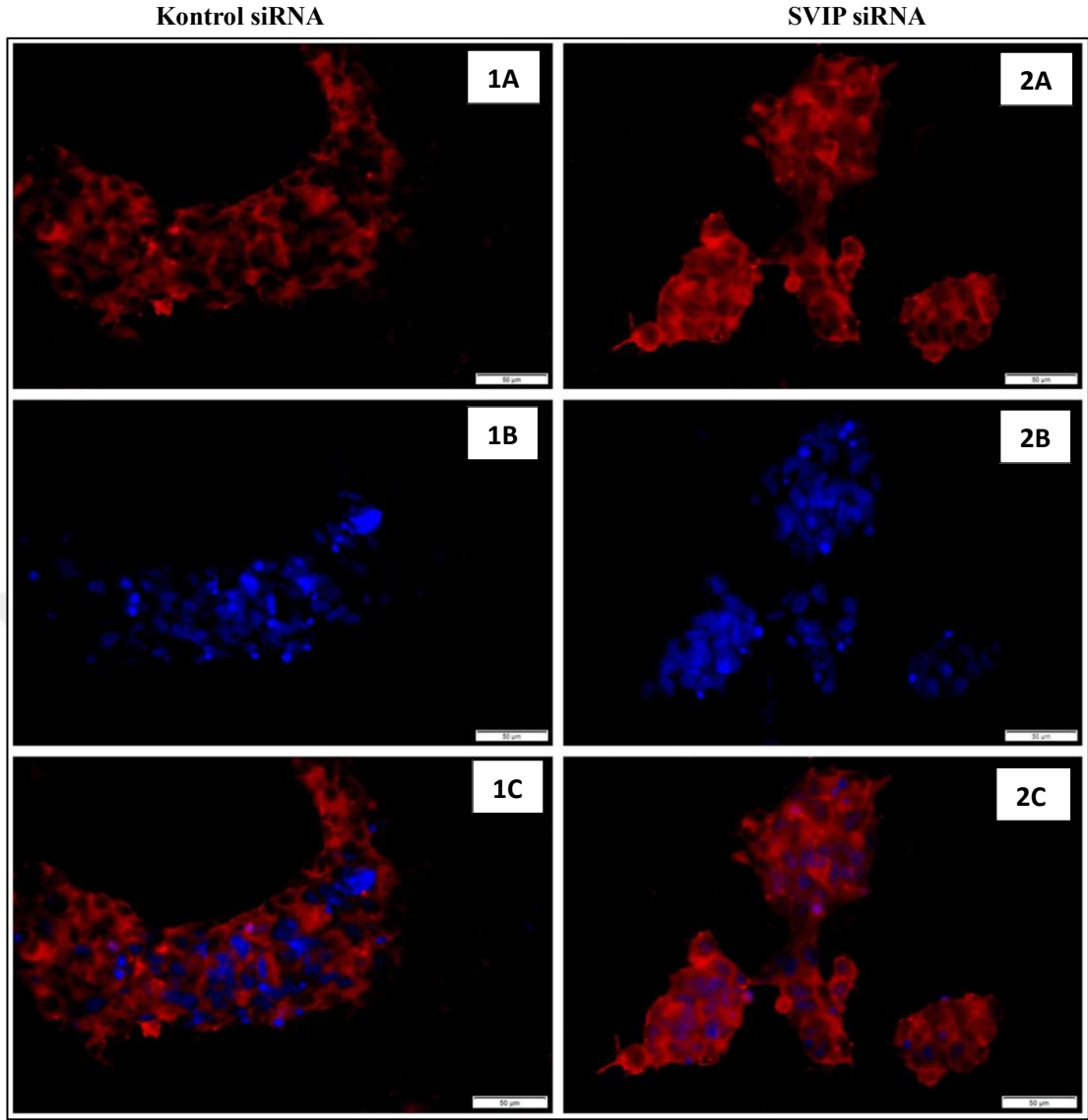
##### **4.6.1. İnsan Testis Embriyonal Karsinom Hücrelerinde İmmunofloresan Boyama Bulguları**

CRL-2073 hücrelerinde belirlenen dozda verilen SVIP siRNA transfeksiyonu sonrası SVIP, Ubikütin, AR, USP26 ve UXT proteinlerinin ekspresyonlarında herhangi bir değişiklik olup olmadığını göstermek amacıyla immünofloresan boyama yapıldı. CRL-2073 hücrelerinde SVIP, Ubikütin, AR, USP26 ve UXT protein ekspresyonlarının kontrol siRNA ve SVIP siRNA verilen hücrelerdeki değişim katsayısını görebilmek için Image J programında analiz yapıldı. Daha sonra GraphPad Prism 10 programında istatistiksel analiz yapıldı (Şekil 4.29). Kontrol siRNA verilen ve SVIP siRNA verilen gruplar karşılaştırıldı.

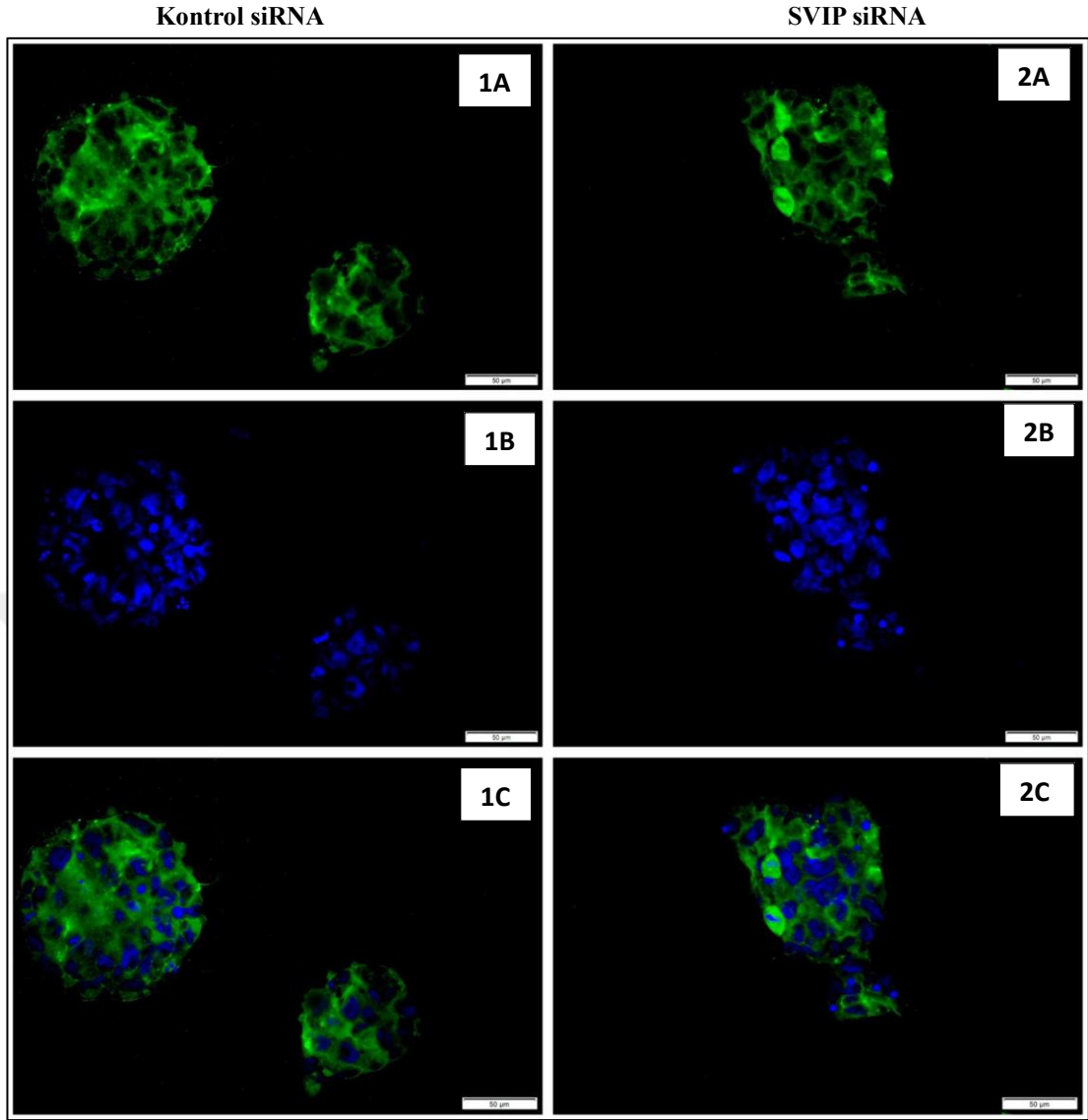
SVIP siRNA transfeksiyonu sonrası hücrelerde SVIP ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalış görüldü (Şekil 4.24, Şekil 4.29;  $p=0.020$ ). Ubikütin proteininin ekspresyonunun transfeksiyon sonrası azaldığı gözlemlendi ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 4.25, Şekil 4.29;  $p=0.126$ ). AR ekspresyonunda transfeksiyon sonrası istatistiksel olarak anlamlı bir azalış görüldü (Şekil 4.26, Şekil 4.29;  $p=0.021$ ). USP26 proteininin ekspresyonu transfeksiyon sonrası istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldı (Şekil 4.27, Şekil 4.29;  $p=0.044$ ). UXT proteininin ekspresyonunun transfeksiyon sonrası arttığı görüldü ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 4.28, Şekil 4.29  $p= 0.148$ ).



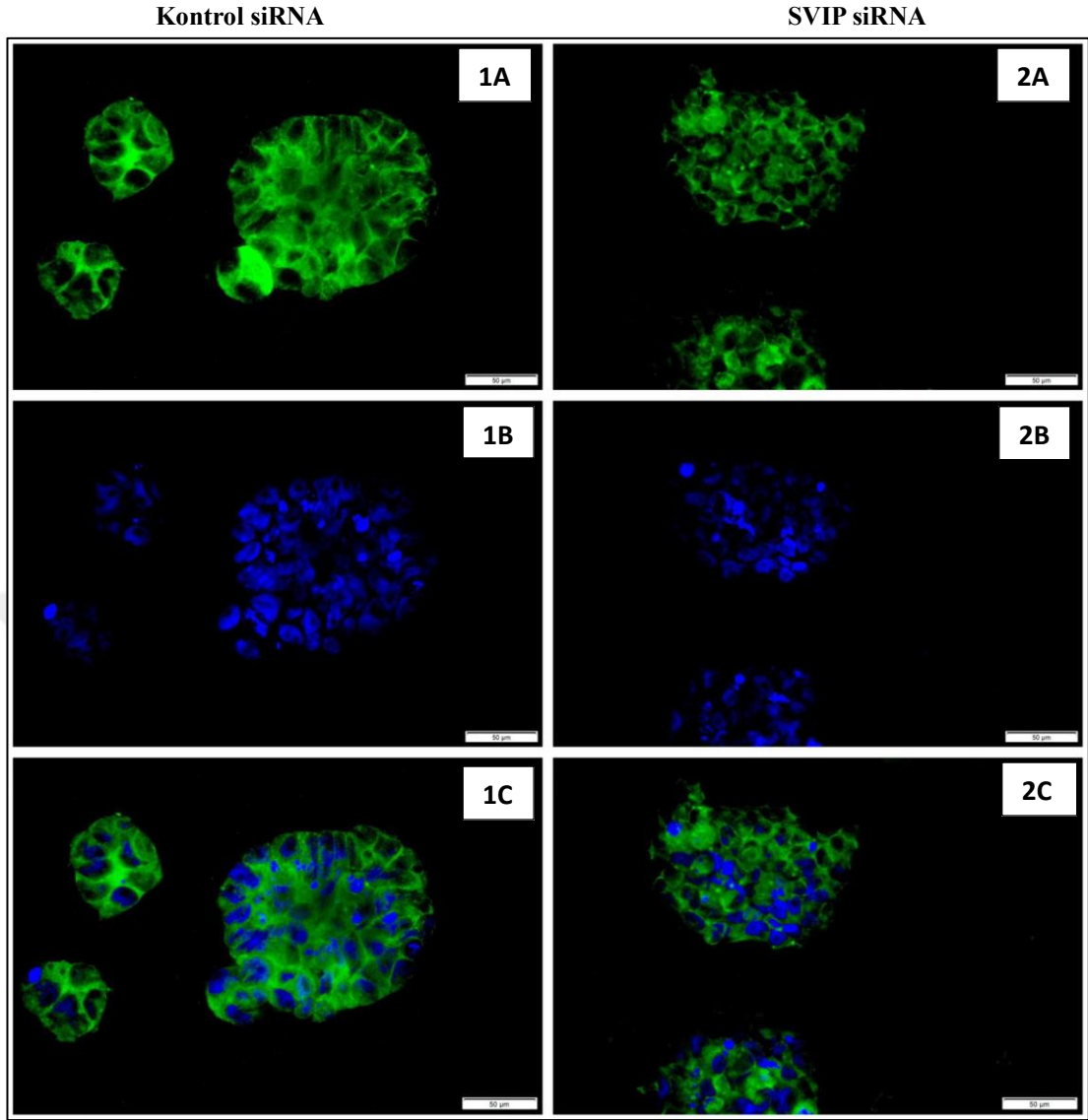
**Şekil 4.24.** *CRL-2073* hücre hattında SVIP proteinin Kontrol siRNA ve SVIP siRNA uygulamaları sonrası immüno Floresan mikroskopik görüntüleri (1A,1B,1C: Kontrol siRNA uygulanan gruplar. 2A,2B,2C: SVIP siRNA uygulanan gruplar). 1A ve 2A: FITC; 1B ve 2B: DAPI; 1C ve 2C: FITC + DAPI (Bar: 50 µm,).



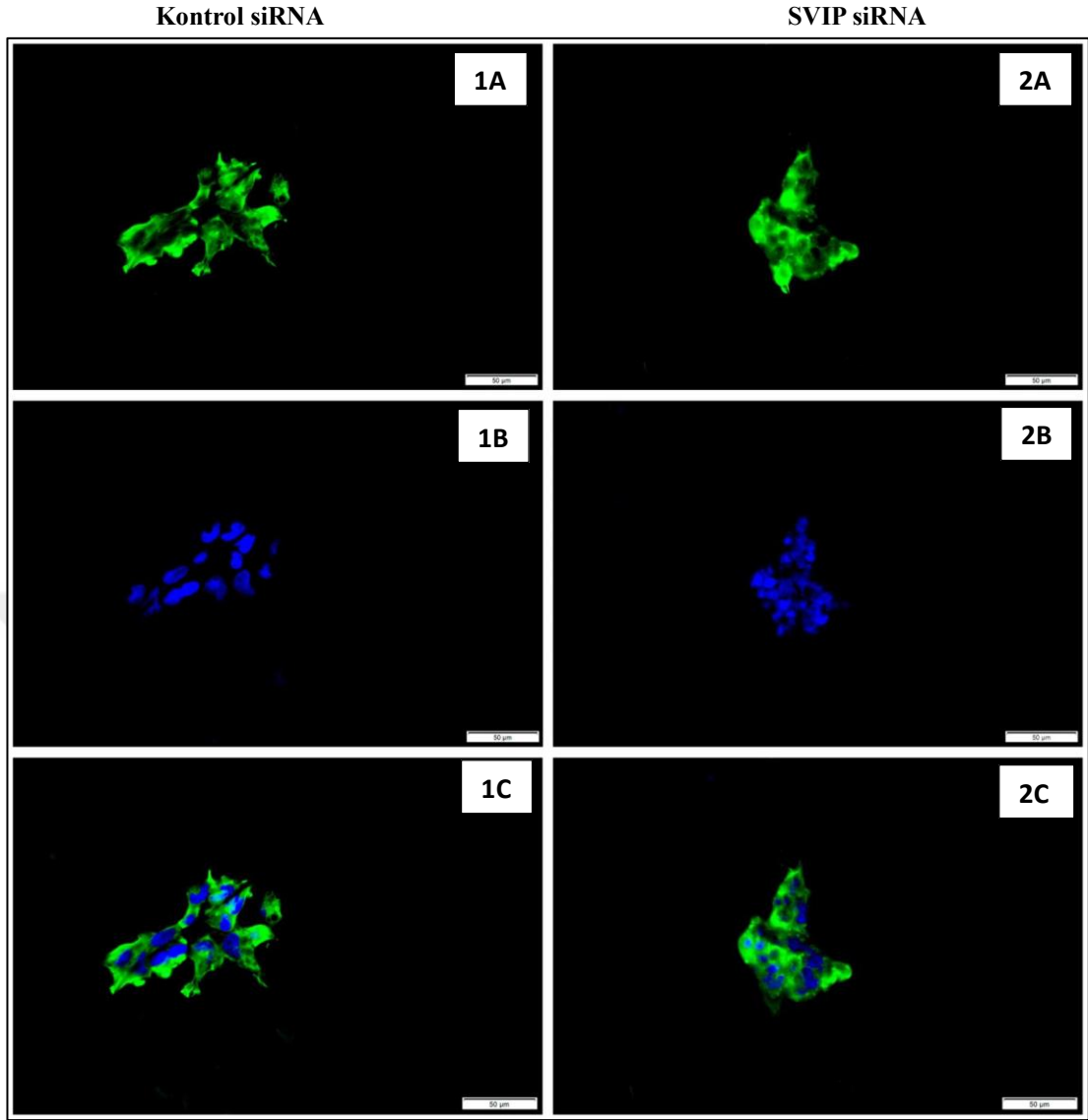
**Şekil 4.25.** *CRL-2073 hücre hattında Ubikutin proteininin Kontrol siRNA ve SVIP siRNA uygulamaları sonrası immünofloresan mikroskopik görüntüleri (1A,1B,1C: Kontrol siRNA uygulanan gruplar; 2A,2B,2C: SVIP siRNA uygulanan gruplar). 1A ve 2A: Texas Red; 1B ve 2B: DAPI; 1C ve 2C: Texas Red + DAPI (Bar: 50 µm).*



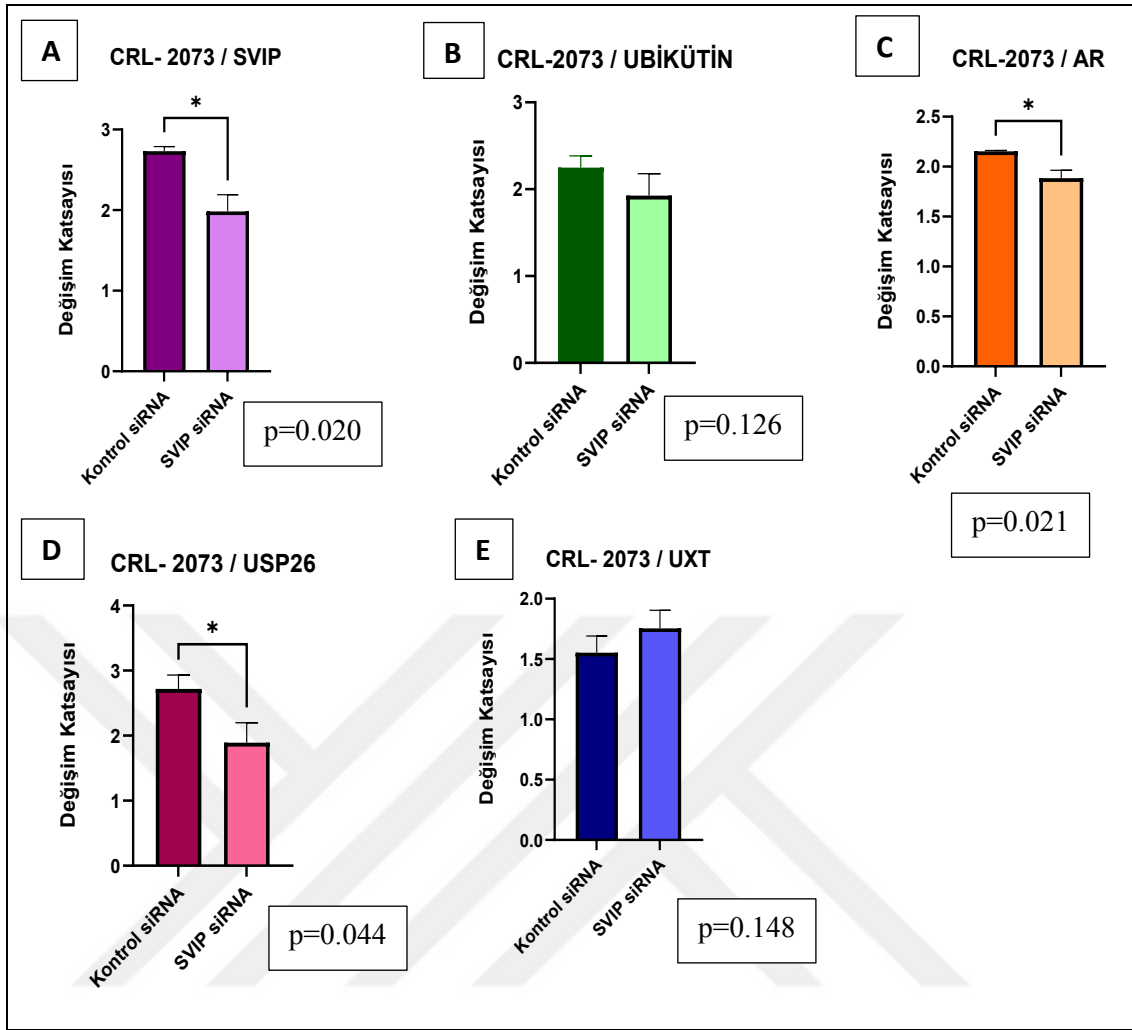
**Şekil 4.26.** CRL-2073 hücre hattında AR proteininin kontrol siRNA ve SVIP siRNA uygulamaları sonrası immüno Floresan mikroskopik görüntüleri (1A,1B,1C: Kontrol siRNA uygulanan gruplar; 2A,2B,2C: SVIP siRNA uygulanan gruplar). 1A ve 2A: FITC; 1B ve 2B: DAPI; 1C ve 2C: FITC + DAPI (Bar: 50 µm,).



**Şekil 4.27.** CRL-2073 hücre hattında USP26 proteininin kontrol siRNA ve SVIP siRNA uygulamaları sonrası immüno Floresan mikroskopik görüntüleri (1A,1B,1C: Kontrol siRNA uygulanan gruplar; 2A,2B,2C: SVIP siRNA uygulanan gruplar). 1A ve 2A: FITC; 1B ve 2B: DAPI; 1C ve 2C: FITC + DAPI (Bar: 50 µm,).



**Şekil 4.28.** *CRL-2073 hücre hattında UXT proteinin kontrol siRNA ve SVIP siRNA uygulamaları sonrası immüno Floresan mikroskopik görüntüleri (1A,1B,1C: Kontrol siRNA uygulanan gruplar; 2A,2B,2C: SVIP siRNA uygulanan gruplar). 1A ve 2A: FITC; 1B ve 2B: DAPI; 1C ve 2C: FITC + DAPI (Bar: 50 µm).*

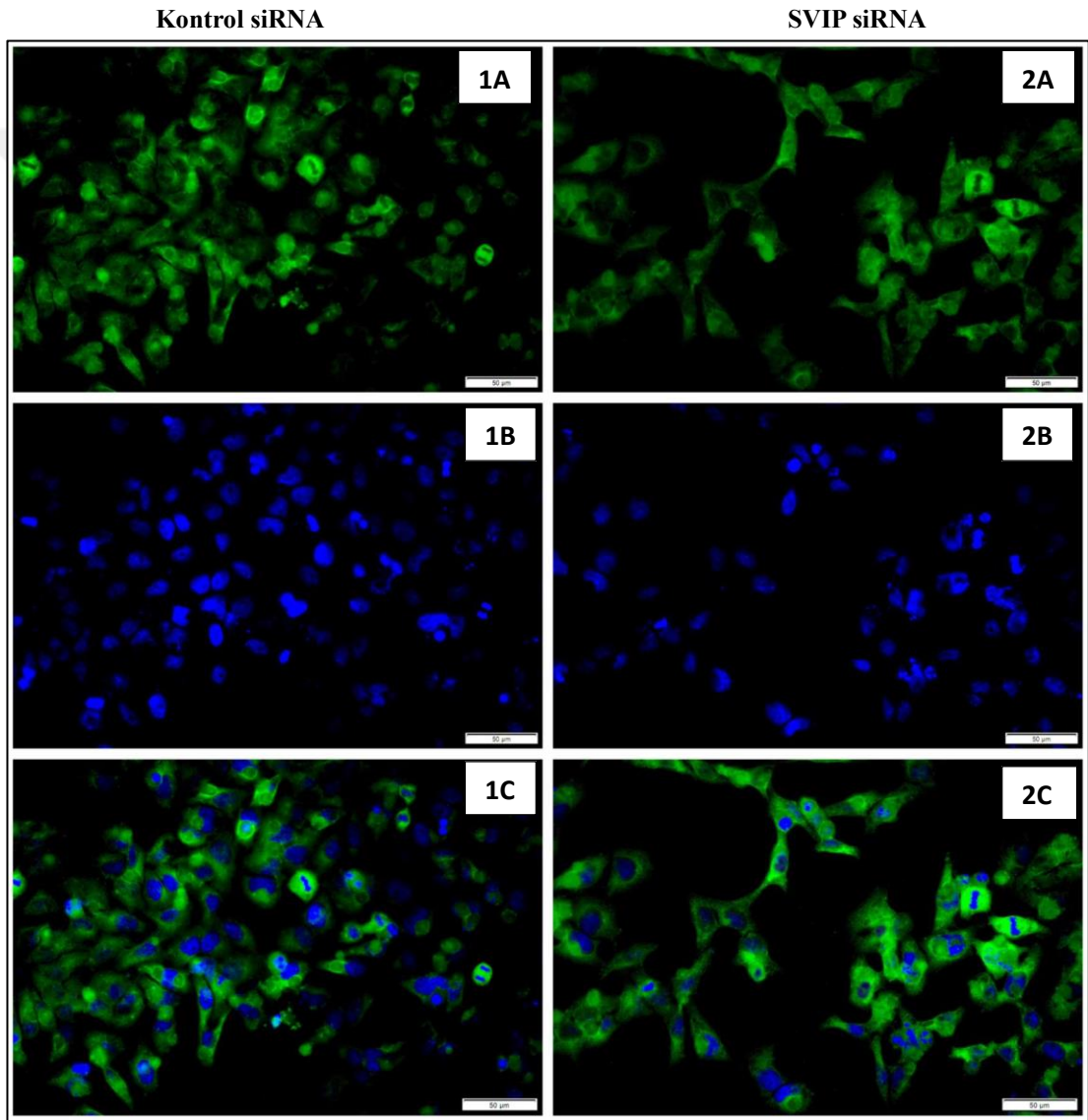


**Şekil 4.29.** SVIP, Ubikütin, AR, USP26 ve UXT proteinlerinin transfeksiyon sonrası ekspresyonlarının immünofloresan boyama sonucuna göre istatistiksel karşılaştırma grafikleri. A; SVIP B; Ubikütin C; AR D; USP26 E; UXT.

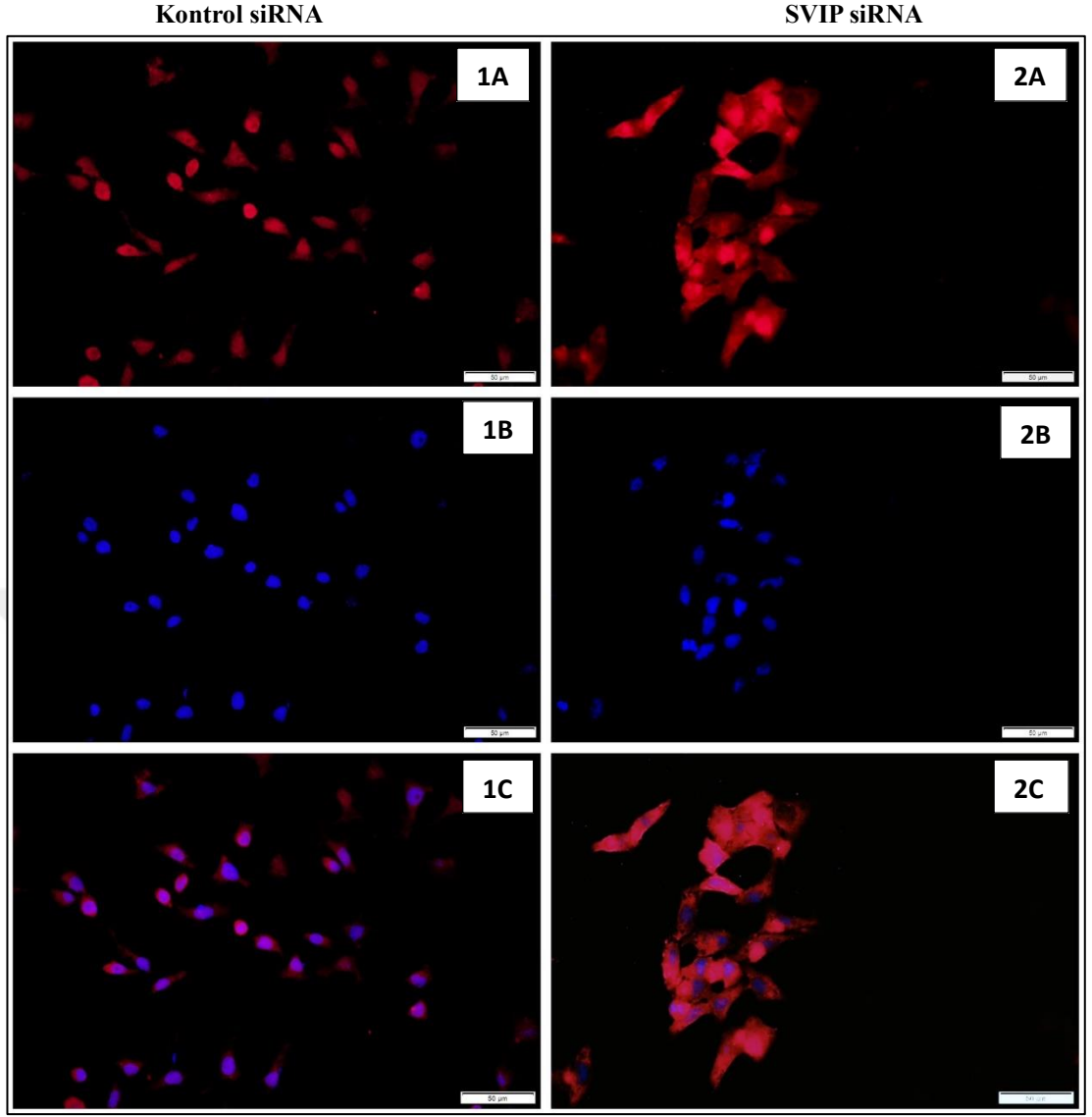
#### 4.6.2. İnsan Leydig Hücrelerinde İmmünofloresan Boyama Bulguları

10-HU103 hücrelerinde belirlenen dozda verilen SVIP siRNA transfeksiyonu sonrası SVIP, Ubikütin, AR, USP26 ve UXT proteinlerinin ekspresyonlarında herhangi bir değişiklik olup olmadığını göstermek amacıyla immünofloresan boyama yapıldı. 10- HU103 hücrelerinde SVIP, Ubikütin, AR, USP26 ve UXT protein ekspresyonlarının kontrol siRNA ve SVIP siRNA verilen hücrelerdeki değişim katsayısını görebilmek için Image J programında analiz yapıldı. Daha sonra GraphPad Prism 10 programında istatistiksel analiz yapıldı (Şekil 4.35). Kontrol siRNA verilen ve SVIP siRNA verilen gruplar karşılaştırıldı.

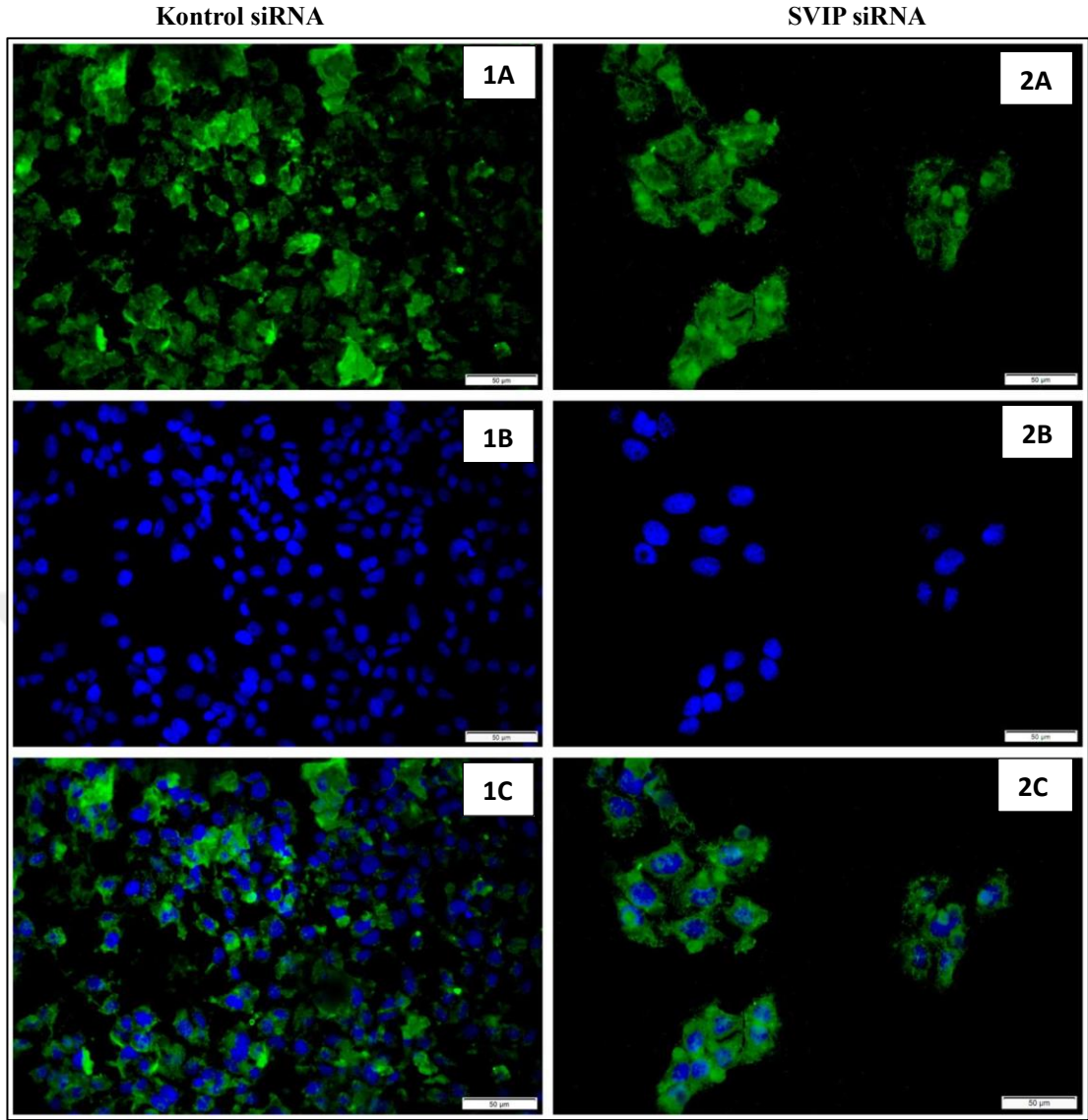
SVIP siRNA transfeksiyonu sonrası hücrelerde SVIP ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalış görüldü (Şekil 4.30, Şekil 4.35;  $p=0.008$ ). Ubikütin proteininin ekspresyonunun transfeksiyon sonrası azaldığı gözlemlense de bu azalış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 4.31, Şekil 4.35,  $p=0.122$ ). AR ekspresyonunda transfeksiyon sonrası istatistiksel olarak anlamlı bir azalış görüldü (Şekil 4.32, Şekil 4.35;  $p=0.015$ ). USP26 proteininin ekspresyonu transfeksiyon sonrası istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldı (Şekil 4.33, Şekil 4.35;  $p=0.032$ ). UXT proteininin ekspresyonunda transfeksiyon sonrası istatistiksel olarak anlamlı bir artış görüldü (Şekil 4.34, Şekil 4.35;  $p=0.018$ ).



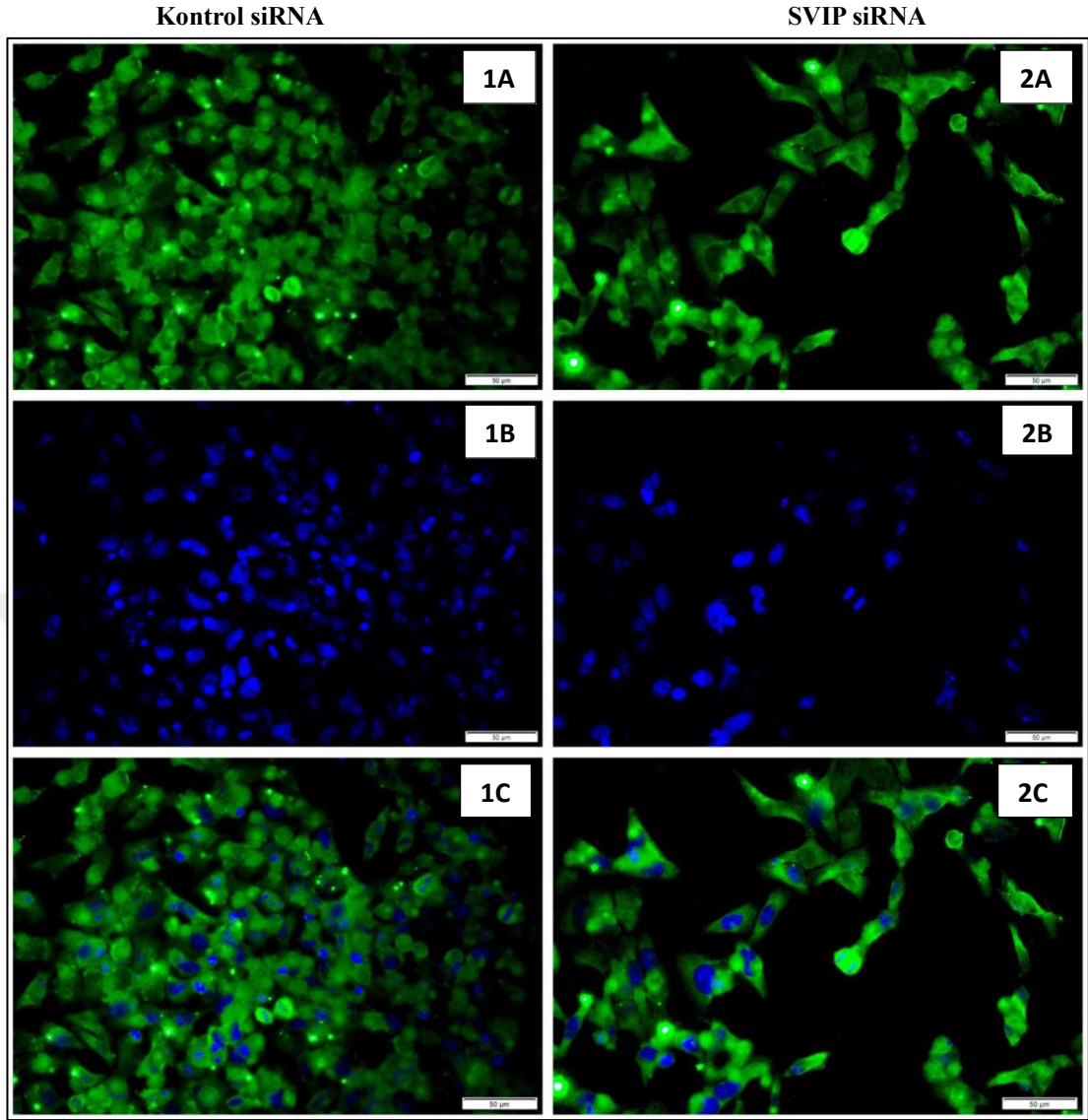
**Şekil 4.30.** 10-HUI03 hücre hattında SVIP proteininin kontrol siRNA ve SVIP siRNA uygulamaları sonrası immüno Floresan mikroskopik görüntüleri (1A,1B,1C: Kontrol siRNA uygulanan gruplar; 2A,2B,2C: SVIP siRNA uygulanan gruplar). 1A ve 2A: FITC; 1B ve 2B; DAPI 1C ve 2C: FITC + DAPI (Bar: 50 µm,).



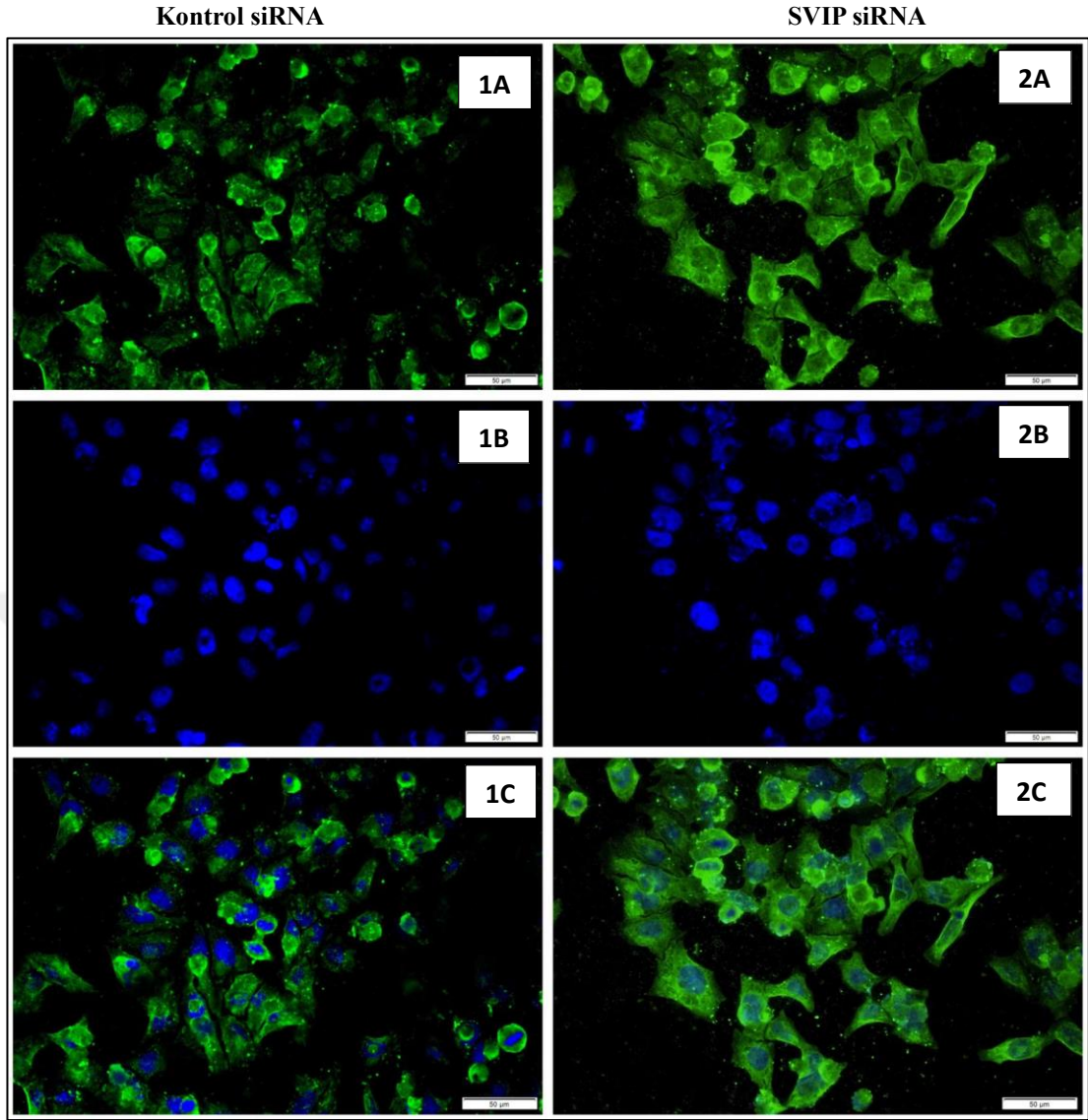
**Şekil 4.31.** 10- HU103 hücre hattında Ubikutin proteininin kontrol siRNA ve SVIP siRNA uygulamaları sonrası immüno Floresan mikroskopik görüntüleri (1A,1B,1C: Kontrol siRNA uygulanan gruplar; 2A,2B,2C: SVIP siRNA uygulanan gruplar). 1A ve 2A: Texas Red; 1B ve 2B: DAPI; 1C ve 2C: Texas Red + DAPI (Bar: 50 µm).



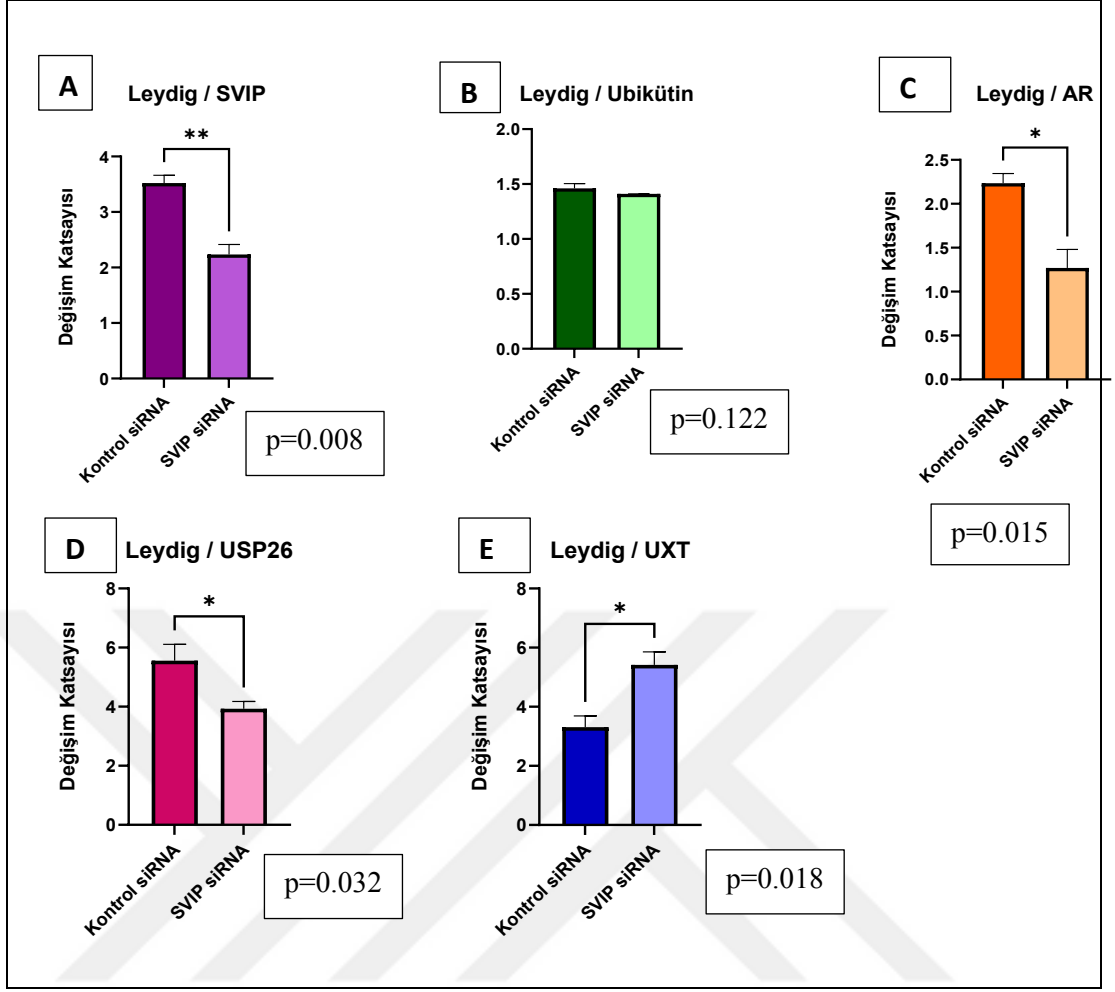
**Şekil 4.32.** *10-HU103 hücre hattında AR proteininin kontrol siRNA ve SVIP siRNA uygulamaları sonrası immüno Floresan mikroskopik görüntüleri (1A,1B,1C: Kontrol siRNA uygulanan gruplar; 2A,2B,2C: SVIP siRNA uygulanan gruplar). 1A ve 2A: FITC; 1B ve 2B: DAPI; 1C ve 2C: FITC + DAPI (Kontrol siRNA Bar: 20 µm, SVIP siRNA Bar: 50 µm).*



**Şekil 4.33.** *10-HUI03 hücre hattında USP26 proteinin kontrol siRNA ve SVIP siRNA uygulamaları sonrası immüno Floresan mikroskopik görüntüleri (1A,1B,1C: Kontrol siRNA uygulanan gruplar; 2A,2B,2C: SVIP siRNA uygulanan gruplar). 1A ve 2A: FITC; 1B ve 2B: DAPI; 1C ve 2C: FITC + DAPI (Bar: 50 µm).*



**Şekil 4.34.** *10-HUI03 hücre hattında UXT proteinin kontrol siRNA ve SVIP siRNA uygulamaları sonrası immüno Floresan mikroskopik görüntüleri (1A,1B,1C: Kontrol siRNA uygulanan gruplar; 2A,2B,2C: SVIP siRNA uygulanan gruplar). 1A ve 2A: FITC; 1B ve 2B: DAPI; 1C ve 2C: FITC + DAPI (Bar: 50 µm).*

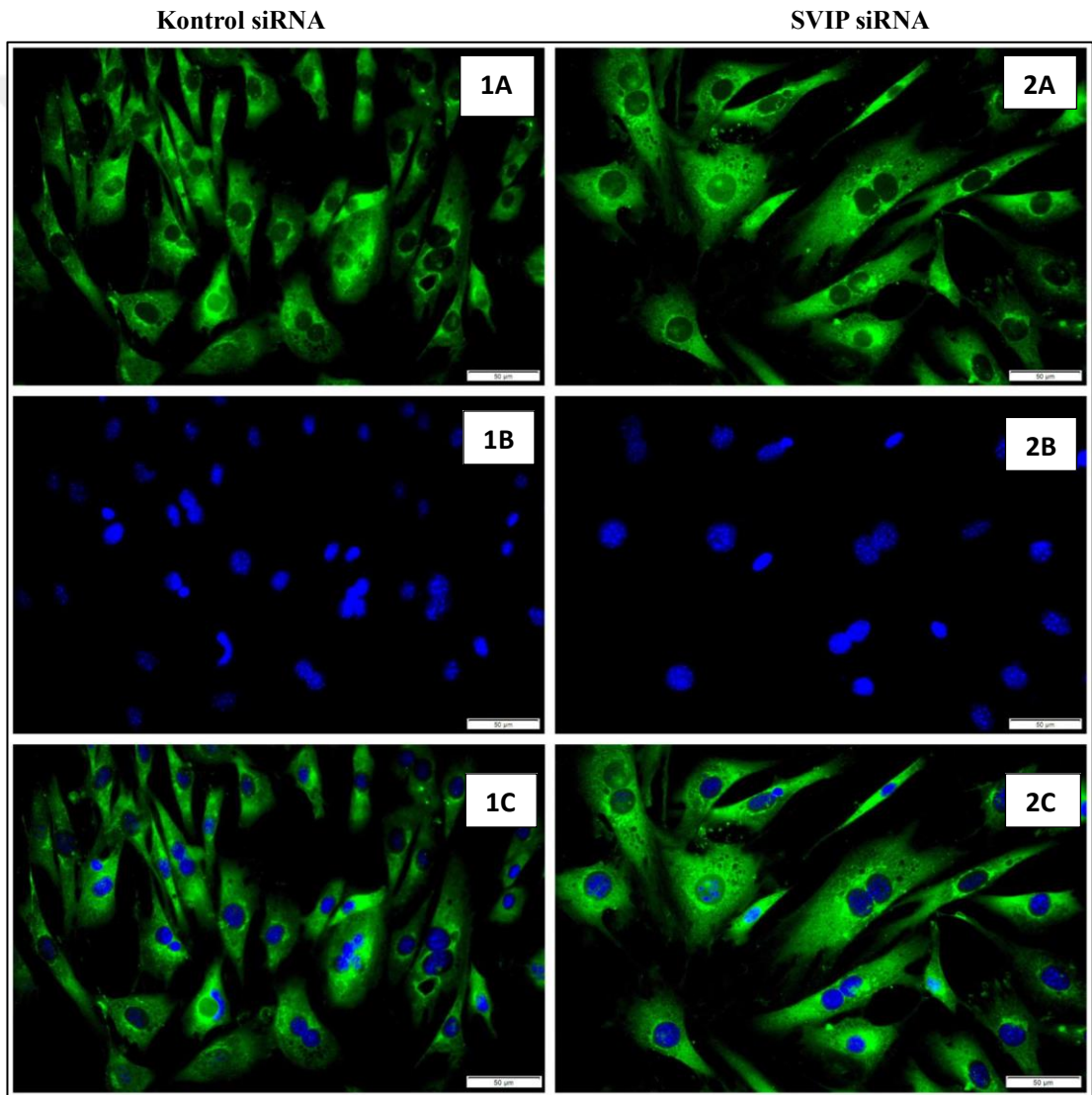


**Şekil 4.35.** SVIP, Ubikütin, AR, USP26 ve UXT proteinlerinin transfeksiyon sonrası ekspresyonlarının immunofloresan boyama sonucuna göre istatistiksel karşılaştırma grafikleri. A; SVIP, B; Ubikütin, C; AR, D; USP26, E; UXT.

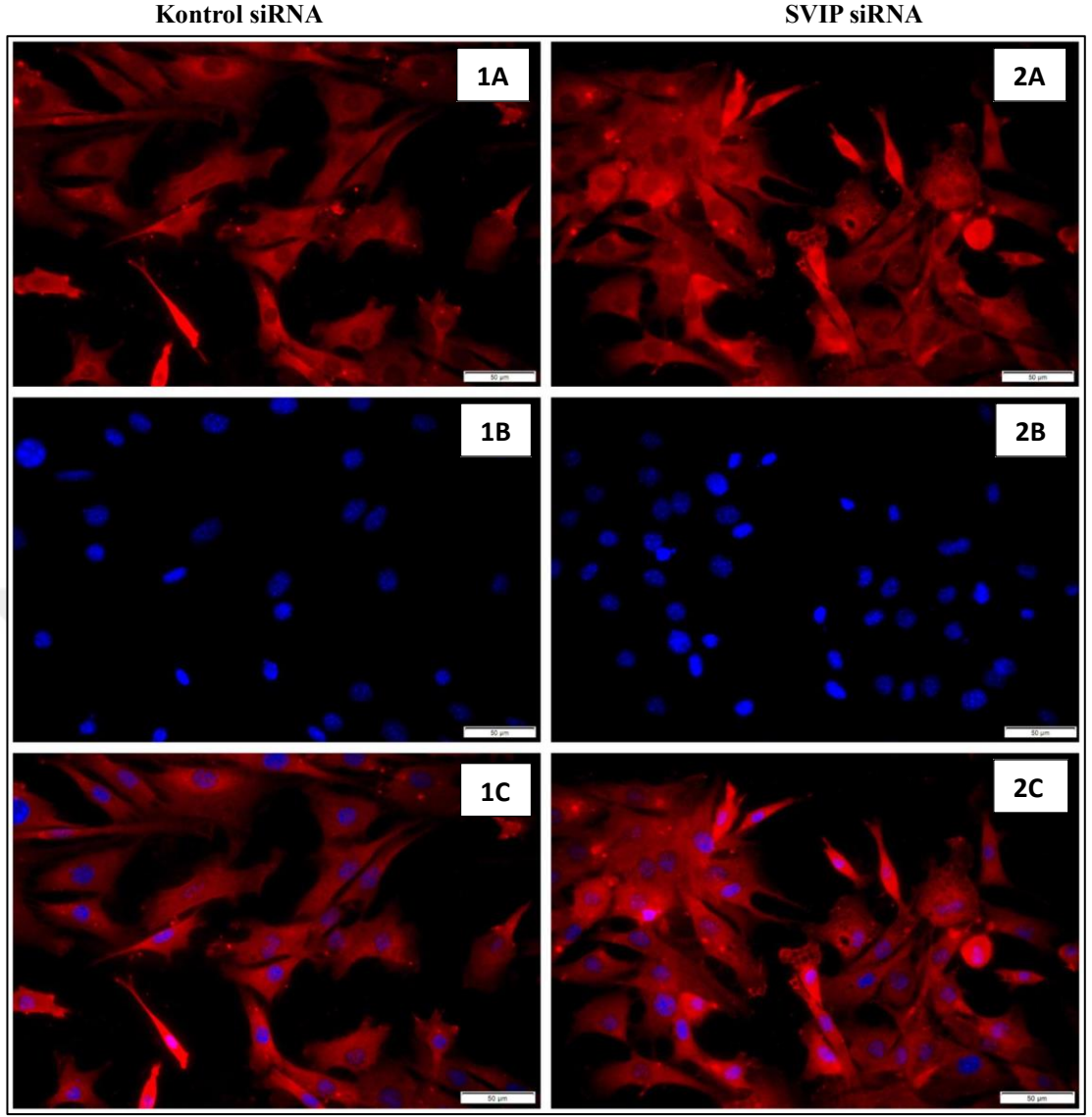
#### 4.6.3. Fare Sertoli Hücrelerinde İmmünoFloresan Boyama Bulguları

CRL-2618 hücrelerinde belirlenen dozda verilen SVIP siRNA transfeksiyonu sonrası SVIP, Ubikütin, AR, USP26 ve UXT proteinlerinin ekspresyonlarında herhangi bir değişiklik olup olmadığını göstermek amacıyla immunofloresan boyama yapıldı. CRL-2618 hücrelerinde SVIP, Ubikütin, AR, USP26 ve UXT protein ekspresyonlarının kontrol siRNA ve SVIP siRNA verilen hücrelerdeki değişim katsayısını görebilmek için Image J programında analiz yapıldı. Daha sonra GraphPad Prism 10 programında istatistiksel analiz yapıldı (Şekil 4.41). Kontrol siRNA verilen ve SVIP siRNA verilen gruplar karşılaştırıldı.

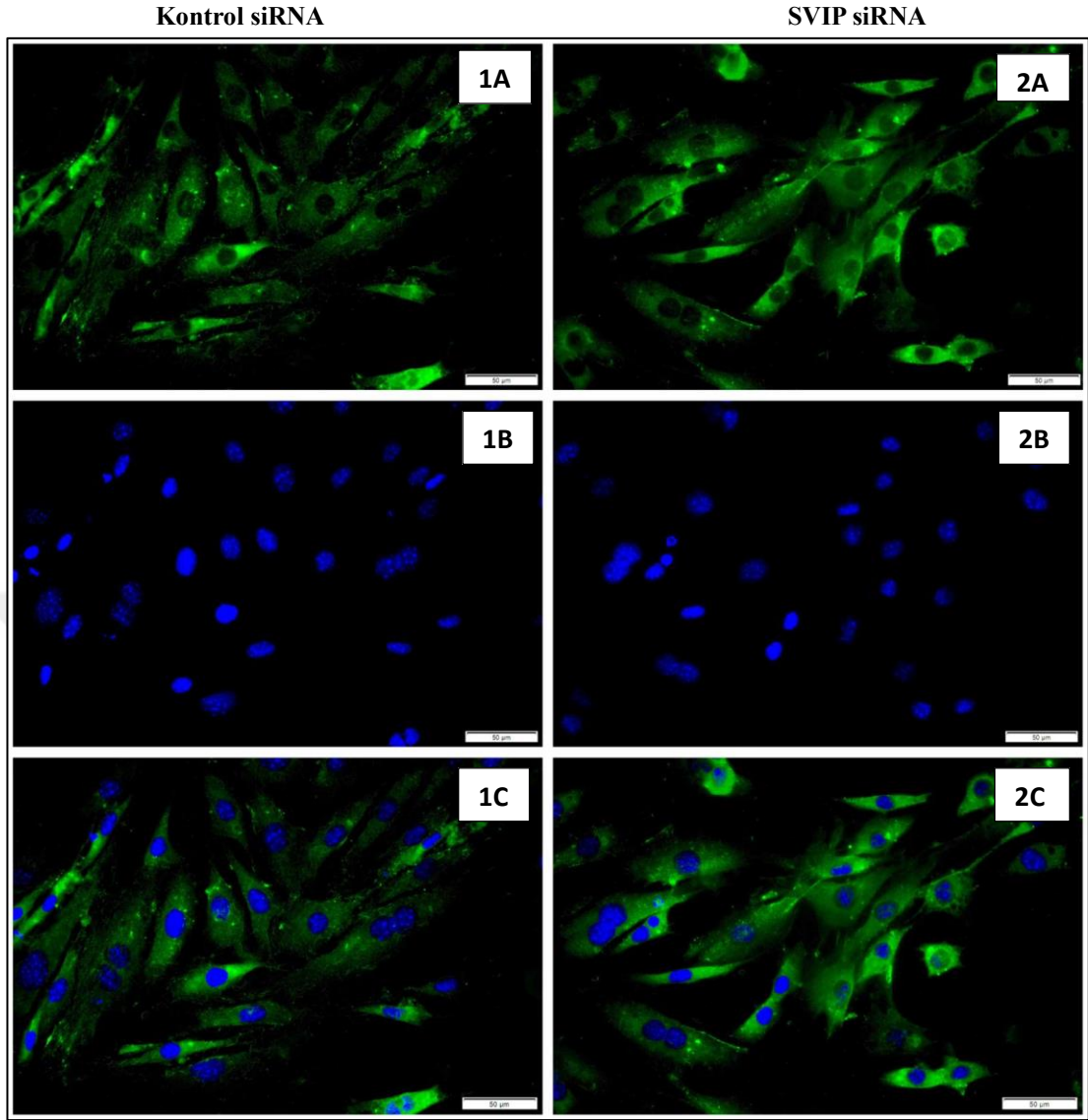
SVIP siRNA transfeksiyonu sonrası hücrelerde SVIP ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalış görüldü (Şekil 4.36, Şekil 4.41;  $p=0.039$ ). Ubikütin proteininin ekspresyonunun transfeksiyon sonrası azaldığı görülmekle beraber bu azalış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 4.37, Şekil 4.41;  $p=0.210$ ). AR ekspresyonunda transfeksiyon sonrasında istatistiksel olarak anlamlı bir azalış görüldü (Şekil 4.38, Şekil 4.41;  $p=0.025$ ). USP26 proteininin ekspresyonu transfeksiyon sonrası azaldı ama bu azalış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 4.39, Şekil 4.41;  $p=0.097$ ). UXT proteininin ekspresyonunun ise transfeksiyon sonrası arttığı gözlemlendi ama bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 4.40, Şekil 4.41;  $p=0.322$ ).



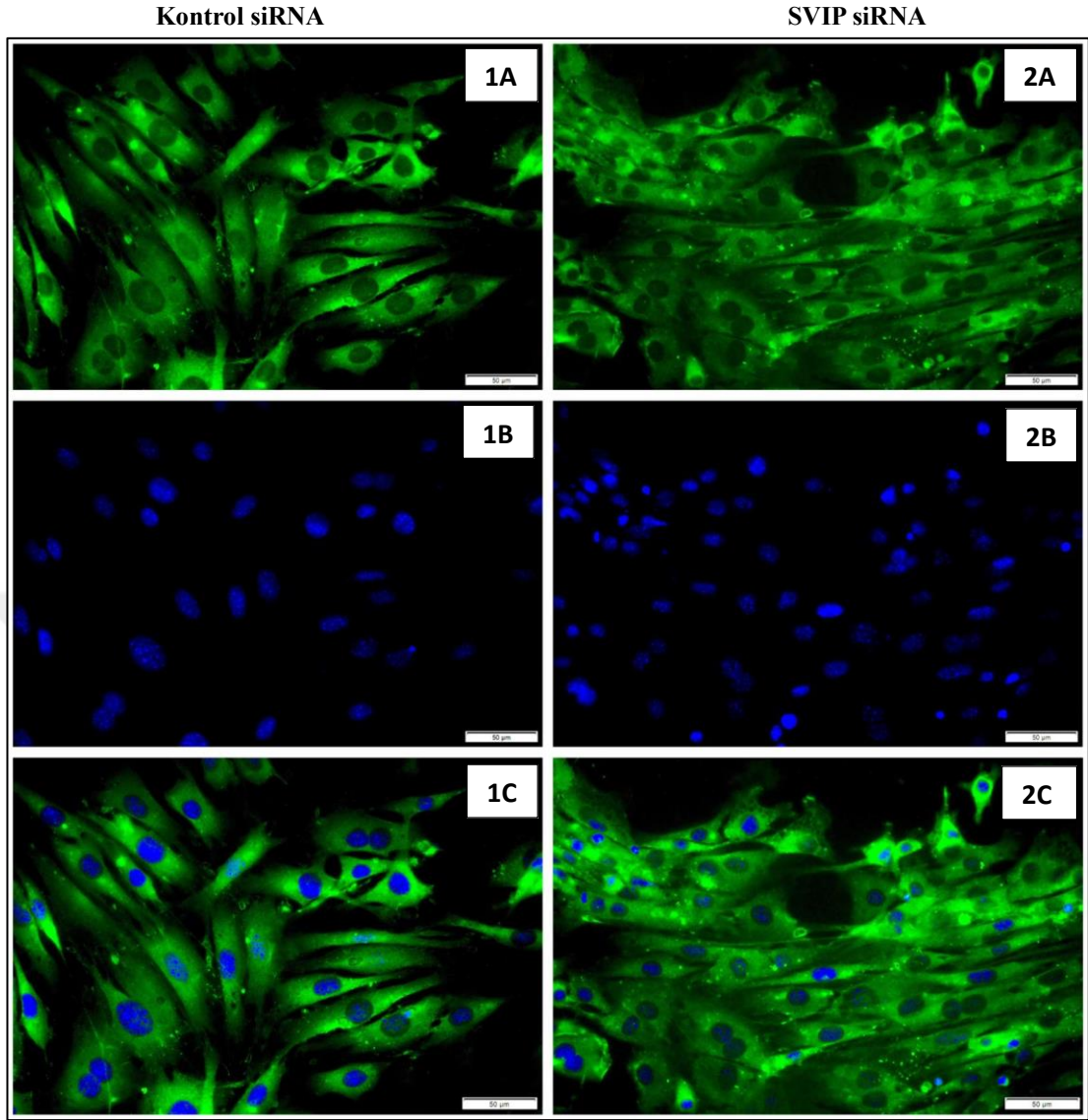
**Şekil 4.36.** CRL-2618 hücre hattında SVIP proteininin kontrol siRNA ve SVIP siRNA uygulamaları sonrası immüno Floresan mikroskopik görüntüleri (1A,1B,1C: Kontrol siRNA uygulanan gruplar; 2A,2B,2C: SVIP siRNA uygulanan gruplar). 1A ve 2A: FITC; 1B ve 2B: DAPI; 1C ve 2C: FITC + DAPI (Bar: 50 µm.).



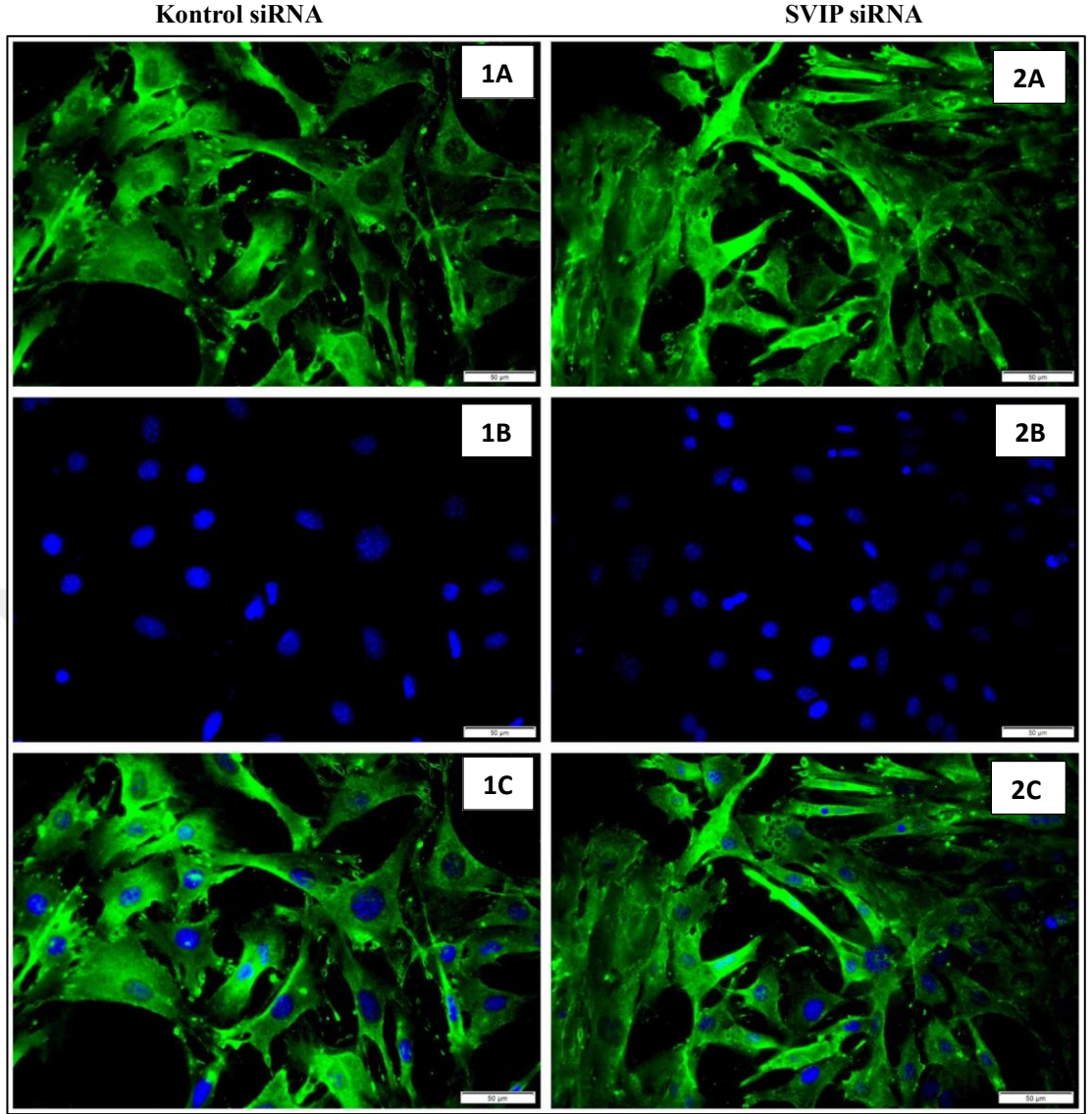
**Şekil 4.37.** CRL-2618 hücre hattında Ubikutin proteininin kontrol siRNA ve SVIP siRNA uygulamaları sonrası immüno Floresan mikroskopik görüntüleri (1A,1B,1C: Kontrol siRNA uygulanan gruplar; 2A,2B,2C: SVIP siRNA uygulanan gruplar). 1A ve 2A: Texas Red; 1B ve 2B: DAPI; 1C ve 2C: Texas Red + DAPI (Bar: 50 µm).



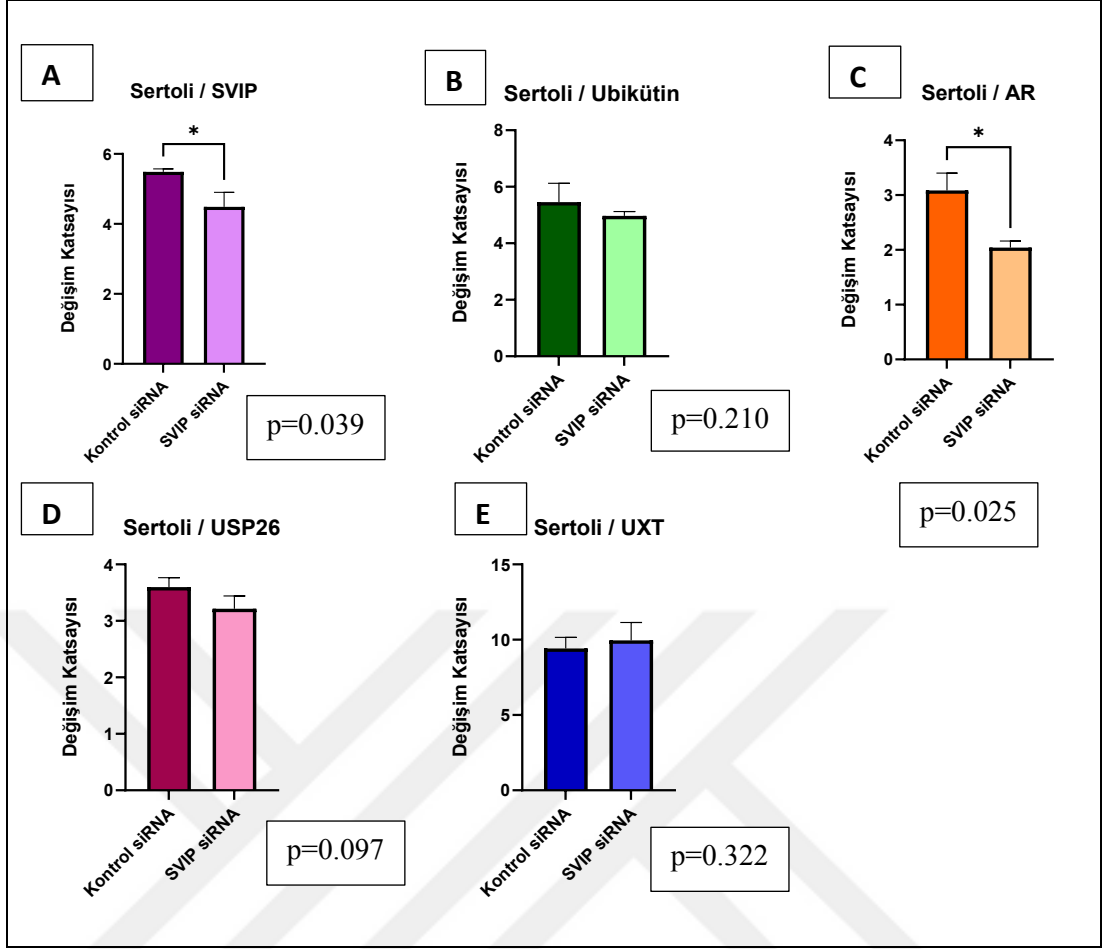
**Şekil 4.38.** CRL-2618 hücre hattında AR proteininin kontrol siRNA ve SVIP siRNA uygulamaları sonrası immüno Floresan mikroskopik görüntüleri (1A,1B,1C: Kontrol siRNA uygulanan gruplar; 2A,2B,2C: SVIP siRNA uygulanan gruplar). 1A ve 2A: FITC; 1B ve 2B: DAPI; 1C ve 2C: FITC + DAPI (Bar: 50 µm).



**Şekil 4.39.** *CRL-2618 hücre hattında USP26 proteininin kontrol siRNA ve SVIP siRNA uygulamaları sonrası immüno Floresan mikroskopik görüntüleri (1A,1B,1C: Kontrol siRNA uygulanan gruplar; 2A,2B,2C: SVIP siRNA uygulanan gruplar). 1A ve 2A: FITC; 1B ve 2B: DAPI; 1C ve 2C: FITC + DAPI (Bar: 50 µm,).*



**Şekil 4.40.** *CRL-2618 hücre hattında UXT proteinin kontrol siRNA ve SVIP siRNA uygulamaları sonrası immüno Floresan mikroskopik görüntüleri (1A,1B,1C: Kontrol siRNA uygulanan gruplar; 2A,2B,2C: SVIP siRNA uygulanan gruplar). 1A ve 2A: FITC; 1B ve 2B: DAPI; 1C ve 2C: FITC + DAPI (Bar: 50 µm).*



**Şekil 4.41.** SVIP, Ubikütin, AR, USP26 ve UXT proteinlerinin transfeksiyon sonrası ekspresyonlarının immünofloresan boyama sonucuna göre istatistiksel karşılaştırma grafikleri. A; SVIP, B; Ubikütin, C; AR, D; USP26, E; UXT.

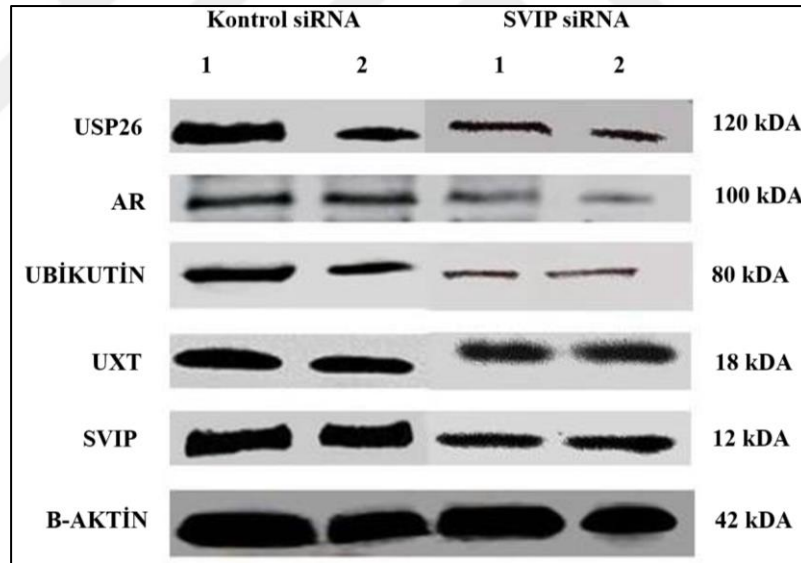
#### 4.7. İnsan Testis Embriyonal Karsinom, İnsan Leydig ve Fare Sertoli Hücre Hatlarında SVIP siRNA Transfeksiyon Sonrası SVIP, Ubikütin, AR, USP26 ve UXT Proteinlerinin Ekspresyonlarının Western Blot Analiz Bulguları

##### 4.7.1. İnsan Testis Embriyonal Karsinom Hücrelerinde Western Blot Analiz Bulguları

CRL-2073 hücre hattında SVIP ekspresyonunu baskılamak için SVIP siRNA kullanılarak transfeksiyon yapıldı. Hücrelerdeki SVIP genini susturmak amacıyla aynı anda 4 farklı SVIP siRNA kullanıldı. Bu transfeksiyon işlemi 48 saat süre sonunda sonlandırıldı.

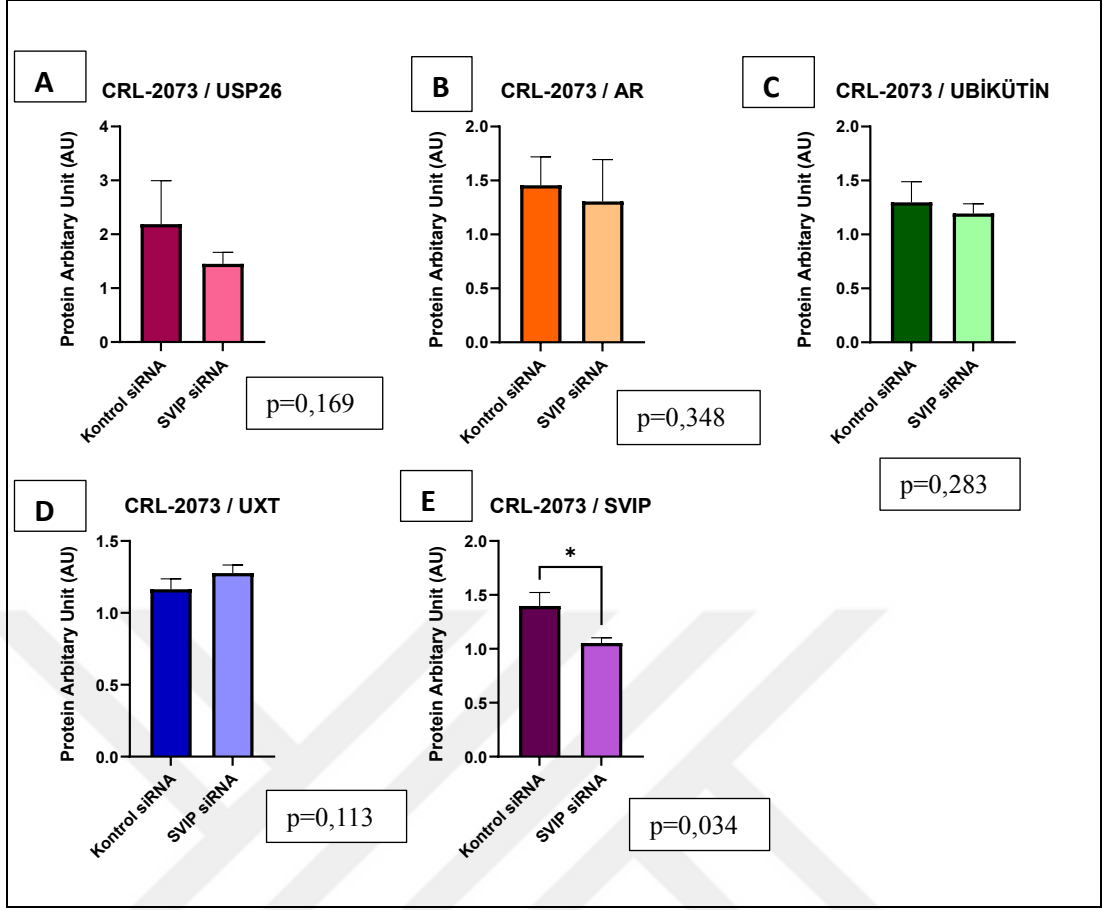
Kontrol siRNA ve SVIP siRNA gruplarındaki USP26, AR, Ubikütin, UXT ve SVIP protein düzeylerini belirlemek için Western blot analizi yapıldı (Şekil 4.42). Hücrelerde USP26, AR, Ubikütin, UXT ve SVIP protein ekspresyonlarının kontrol siRNA ve SVIP siRNA verilen hücrelerdeki değişim katsayısını görebilmek için Image J programında analiz yapıldı. Daha sonra GraphPad Prism 10 programında istatistiksel analiz yapıldı (Şekil 4.43).

Kontrol siRNA verilen ve SVIP siRNA verilen gruplar arasında protein ekspresyonları karşılaştırıldı. SVIP siRNA transfeksiyonu sonrası hücrelerde USP26 ekspresyonu azaldı ama bu azalış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $p=0,169$ ). AR ekspresyonu azaldı ama bu azalış istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p=0.348$ ). Ubikütin protein ekspresyonu azaldı ama bu azalış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $p= 0.283$ ). UXT proteinin ekspresyonu arttı ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p=0.113$ ). SVIP ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalış görüldü ( $p=0.034$ ).



**Şekil 4.42.** CRL-2073 hücre hattında kontrol siRNA ve SVIP siRNA ile transfeksiyon sonrası Western Blot analizi bant görüntüleri.

Hücrelerin kontrol siRNA ve SVIP siRNA ile transfeksiyonları sonrası Western blot analizlerinden elde edilen bantlar, proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre incelendi. Oluşan bant görüntüleri Image J programında okunup beta-aktin proteinine oranlanarak değerlendirildi. Daha sonra veriler GraphPad Prism 10 programında istatistiksel olarak incelendi. Analizlerde  $p<0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi (Şekil 4.43).



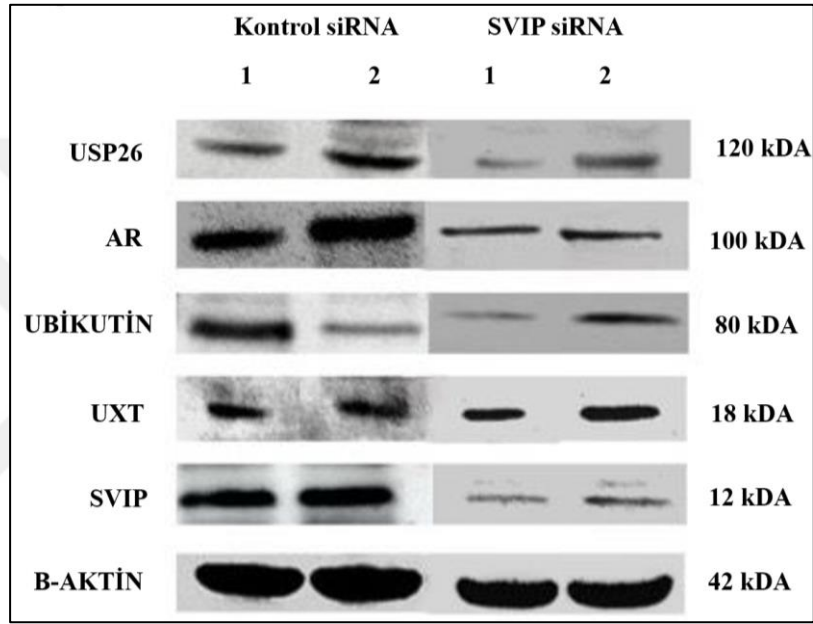
**Şekil 4.43.** *USP26, AR, Ubikütin, UXT ve SVIP, proteinlerinin transfeksiyon sonrası ekspresyonlarının western blot analizi sonrası istatistiksel karşılaştırma grafikleri. A; USP26, B; AR, C; Ubikütin, D; UXT, E; SVIP.*

#### 4.7.2. İnsan Leydig Hücrelerinde Western Blot Analiz Bulguları

10-HU103 hücre hattında SVIP ekspresyonunu baskılamak için SVIP siRNA kullanılarak transfeksiyon yapıldı. Hücrelerdeki SVIP genini susturmak amacıyla aynı anda 4 farklı SVIP siRNA kullanıldı. Bu transfeksiyon işlemi 48 saat süre sonunda sonlandırıldı.

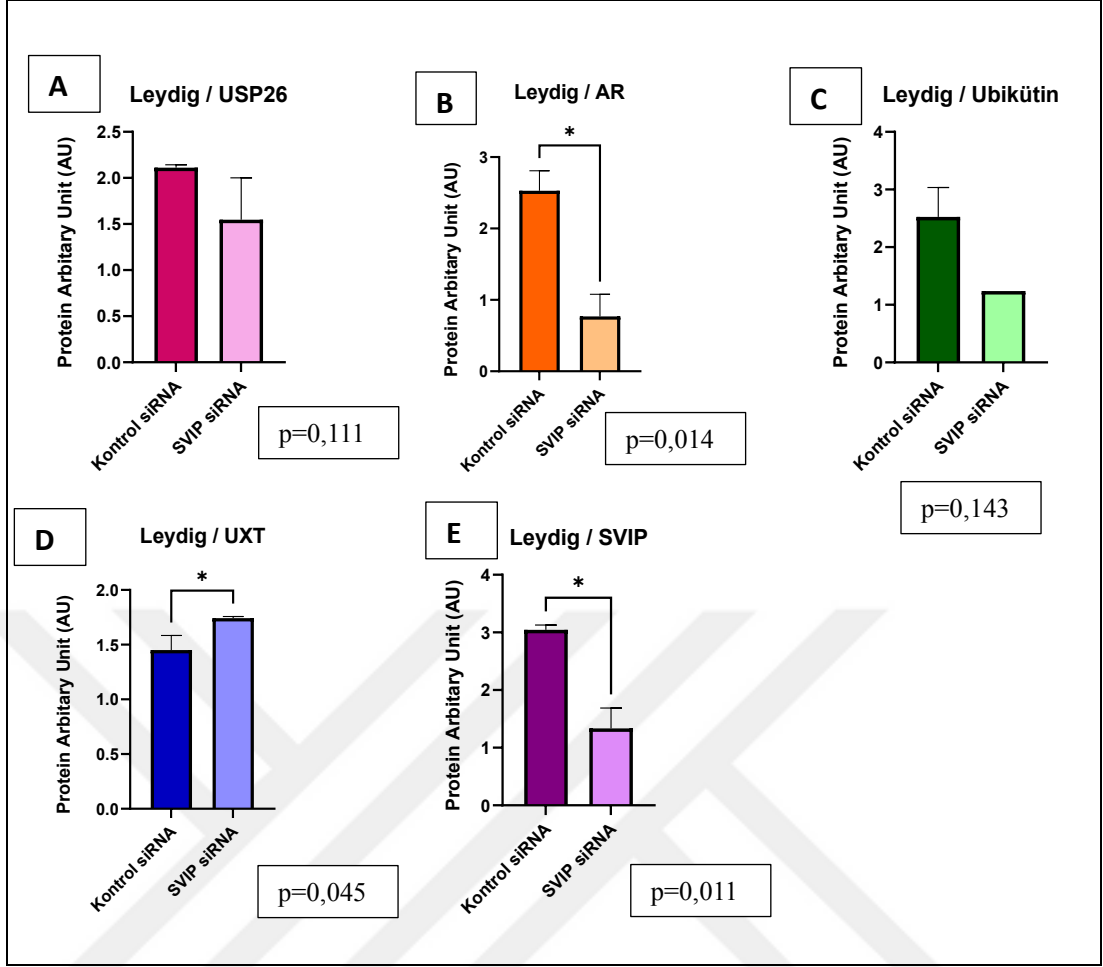
Kontrol siRNA ve SVIP siRNA gruplarındaki USP26, AR, Ubikütin, UXT ve SVIP protein düzeylerini belirlemek için western blot analizi yapıldı (Şekil 4.44). Hücrelerde USP26, AR, Ubikütin, UXT ve SVIP protein ekspresyonlarının kontrol siRNA ve SVIP siRNA verilen hücrelerdeki değişim katsayısını görebilmek için Image J programında analiz yapıldı. Daha sonra GraphPad Prism 10 programında istatistiksel analiz yapıldı (Şekil 4.45).

Kontrol siRNA verilen ve SVIP siRNA verilen gruplar arasında protein ekspresyonları karşılaştırıldı. SVIP siRNA transfeksiyonu sonrası hücrelerde USP26 ekspresyonu azaldı ama bu azalış istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p=0,111$ ). AR ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görüldü ( $p=0.014$ ). Ubikütin protein ekspresyonu azaldı ancak bu azalış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $p=0.143$ ). UXT proteininin ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış görüldü ( $p=0.045$ ). SVIP ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalış görüldü ( $p=0.011$ ).



**Şekil 4.44.** 10-HUI03 hücre hattında kontrol siRNA ve SVIP siRNA ile transfeksiyon sonrası Western Blot analizi bant görüntüleri.

Hücrelerin kontrol siRNA ve SVIP siRNA ile transfeksiyonları sonrası western blot analizlerinden elde edilen bantlar, proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre incelendi. Oluşan bant görüntüleri Image J programında okunup beta-aktin proteinine oranlanarak değerlendirildi. Daha sonra veriler GraphPad Prism 10 programında istatistiksel olarak incelendi. Analizlerde  $p<0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi (Şekil 4.45).



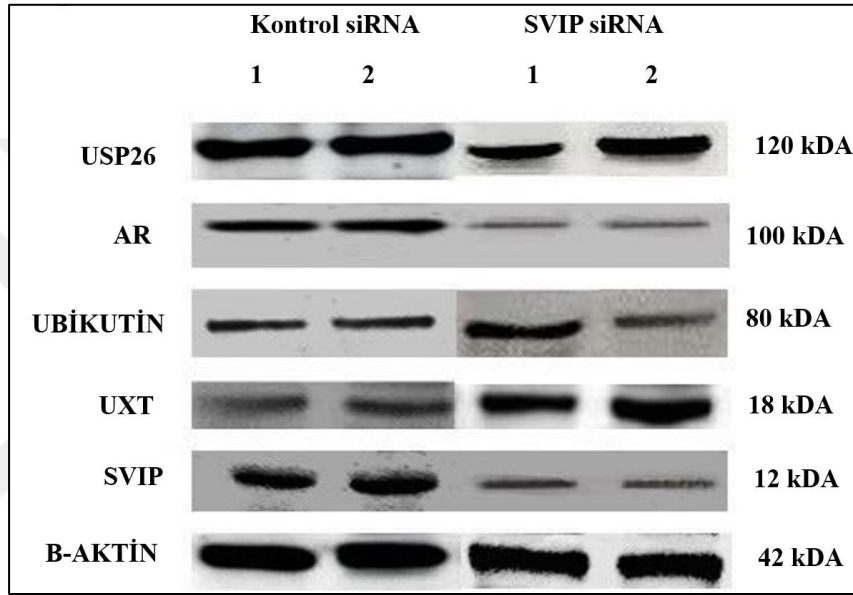
**Şekil 4.45.** USP26, AR, Ubikütin, UXT ve SVIP SVIP, proteinlerinin transfeksiyon sonrası ekspresyonlarının western blot analizi sonrası istatistiksel karşılaştırma grafikleri. A; USP26, B; AR, C; Ubikütin, D; UXT, E; SVIP.

#### 4.7.3. Fare Sertoli Hücrelerinde Western Blot Analiz Bulguları

CRL-2618 hücre hattında SVIP ekspresyonunu baskılamak için SVIP siRNA kullanılarak transfeksiyon yapıldı. Hücrelerdeki SVIP genini susturmak amacıyla aynı anda 4 farklı SVIP siRNA kullanıldı. Bu transfeksiyon işlemi 48 saat süre sonunda sonlandırıldı.

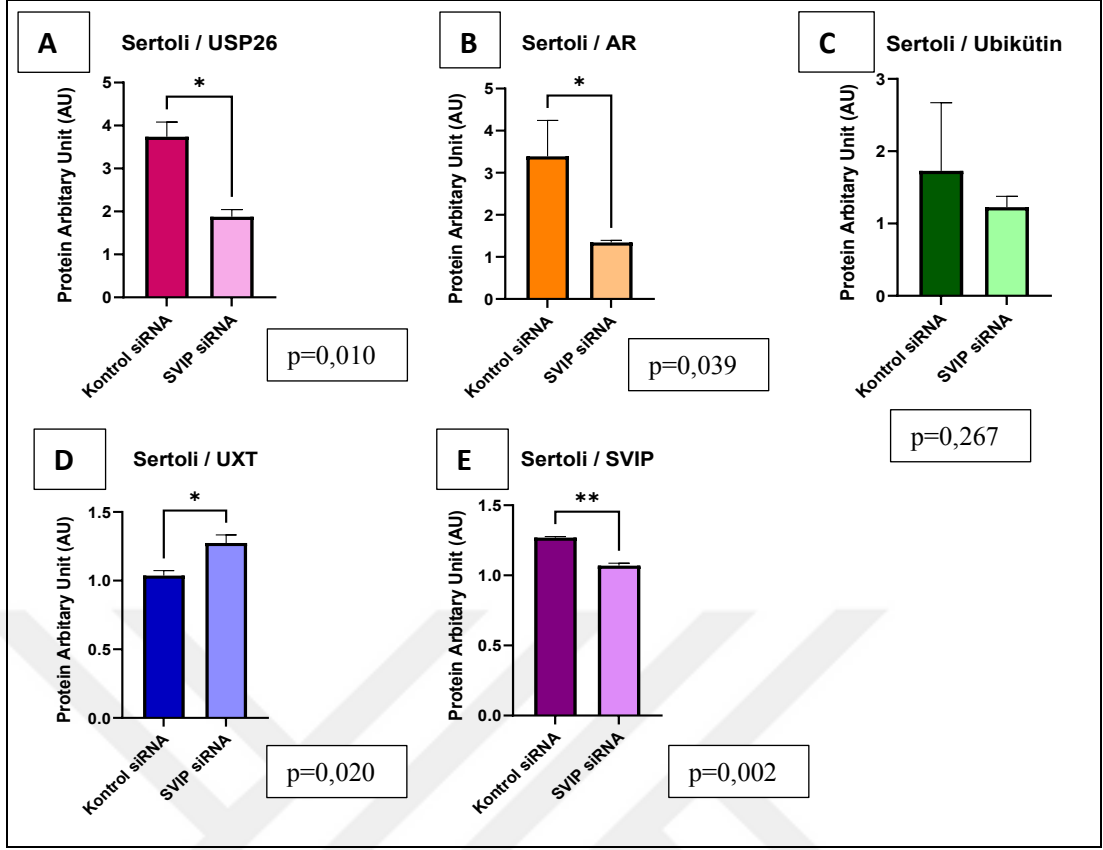
Kontrol siRNA ve SVIP siRNA gruplarındaki USP26, AR, Ubikütin, UXT ve SVIP protein düzeylerini belirlemek için western blot analizi yapıldı (Şekil 4.46). Hücrelerde USP26, AR, Ubikütin, UXT ve SVIP protein ekspresyonlarının kontrol siRNA ve SVIP siRNA verilen hücrelerdeki değişim katsayısını görebilmek için Image J programında analiz yapıldı. Daha sonra GraphPad Prism 10 programında istatistiksel analiz yapıldı (Şekil 4.47).

Kontrol siRNA verilen ve SVIP siRNA verilen gruplar arasında protein ekspresyonları karşılaştırıldı. SVIP siRNA transfeksiyonu sonrası hücrelerde USP26 ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalış görüldü ( $p=0,010$ ). AR ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görüldü ( $p=0.039$ ). Ubikütin protein ekspresyonu azaldı ama istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görülmedi ( $p=0.267$ ). UXT proteinin ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış görüldü ( $p=0.020$ ). SVIP ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalış görüldü ( $p=0.002$ ).



**Şekil 4.46.** CRL-2618 hücre hattında kontrol siRNA ve SVIP siRNA ile transfeksiyon sonrası Western Blot analizi bant görüntüleri.

Hücrelerin kontrol siRNA ve SVIP siRNA ile transfeksiyonları sonrası western blot analizlerinden elde edilen bantlar, proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre incelendi. Oluşan bant görüntüleri Image J programında okunup beta-aktin proteinine oranlanarak değerlendirildi. Daha sonra veriler GraphPad Prism 10 programında istatistiksel olarak incelendi. Analizlerde  $p<0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi (Şekil 4.47).



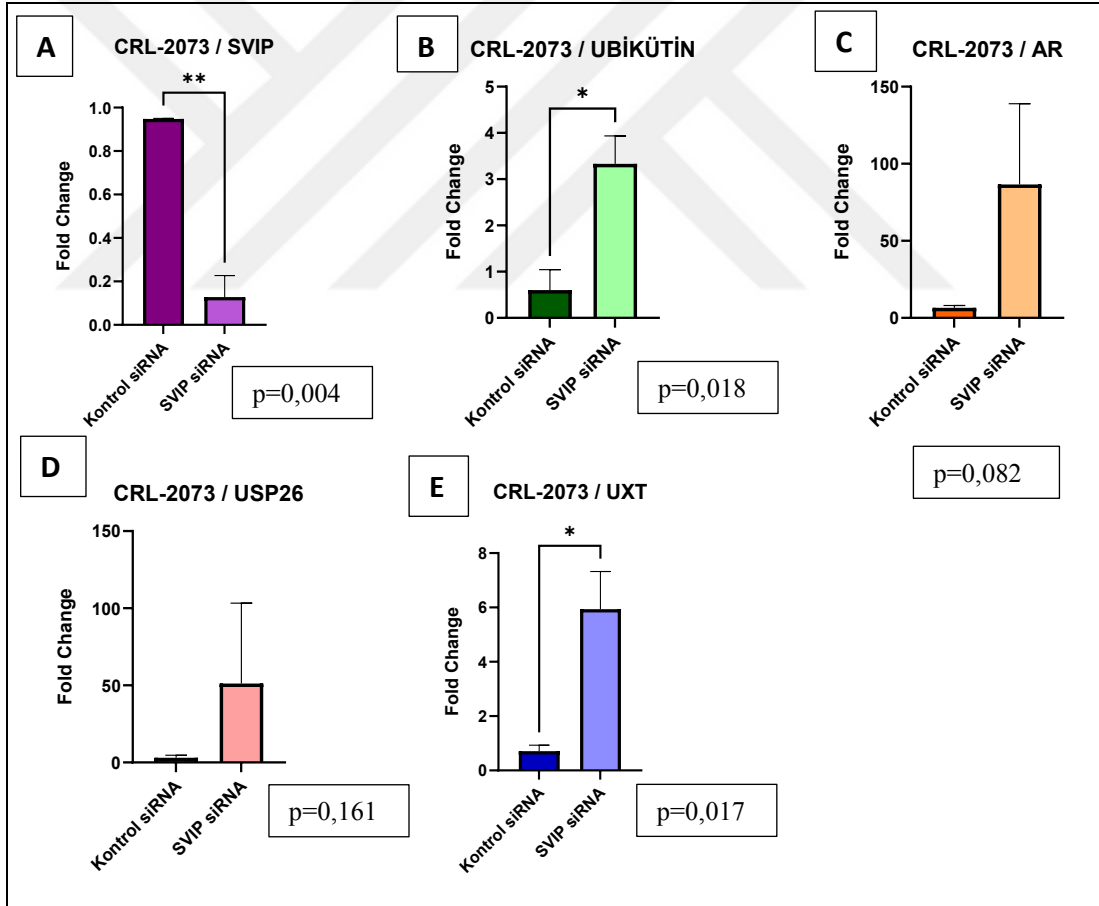
**Şekil 4.47.** *USP26, AR, Ubikütin, UXT ve SVIP SVIP, proteinlerinin transfeksiyon sonrası ekspresyonlarının western blot analizi sonrası istatistiksel karşılaştırma grafikleri. A; USP26, B; AR, C; Ubikütin, D; UXT, E; SVIP.*

#### 4.8. İnsan Testis Embriyonal Karsinom, İnsan Leydig ve Fare Sertoli Hücre Hatlarında SVIP siRNA Transfeksiyon Sonrası qRT-PCR Analiz Bulguları

##### 4.8.1. İnsan Testis Embriyonal Karsinom Hücrelerinde qRT-PCR Analiz Bulguları

CRL-2073 hücrelerinde qRT-PCR yöntemi ile SVIP, Ubikütin, AR, USP26 ve UXT gen ekspresyonları belirlendi. Daha sonra kontrol siRNA ve SVIP siRNA'ler ile 48 saat süre transfeksiyon işlemleri sonrası tekrarlı qRT-PCR analizleri yapıldı ve SVIP, Ubikütin, AR, USP26 ve UXT gen ekspresyonları belirlendi. qRT-PCR deneyi için öncelikle tüm genlerin ekspresyonları belirlenirken cDNA'lar kalıp olarak kullandı. Analizler değerlendirilirken YWHAZ geni referans olarak kullanıldı.

CRL-2073 hücrelerinde SVIP, Ubikütin, AR, USP26 ve UXT genlerinin YWHAZ'a göre göreceli ekspresyonları belirlenirken  $\Delta\Delta Ct$  yöntemi kullanıldı. Genlerin ekspresyon seviyeleri her bir örnek için YWHAZ ile standardize edilerek  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  matematiksel modeline göre hesaplandı. Kontrol siRNA ve SVIP siRNA ile transfekte edilen hücrelerde SVIP gen ekspresyonunda anlamlı bir azalma görüldü ( $p=0,004$ ). Ubikütin gen ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış görüldü ( $p=0,018$ ). AR gen ekspresyonunda artış görüldü ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p=0,082$ ). USP26 gen ekspresyonunda artış görüldü ama bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $p=0,161$ ). UXT gen ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış görüldü ( $p=0,017$ ). Genlerin ekspresyonları değişim katsayılarına göre grafikler üzerinde gösterildi (Şekil 4.48). Analizlerde  $p<0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

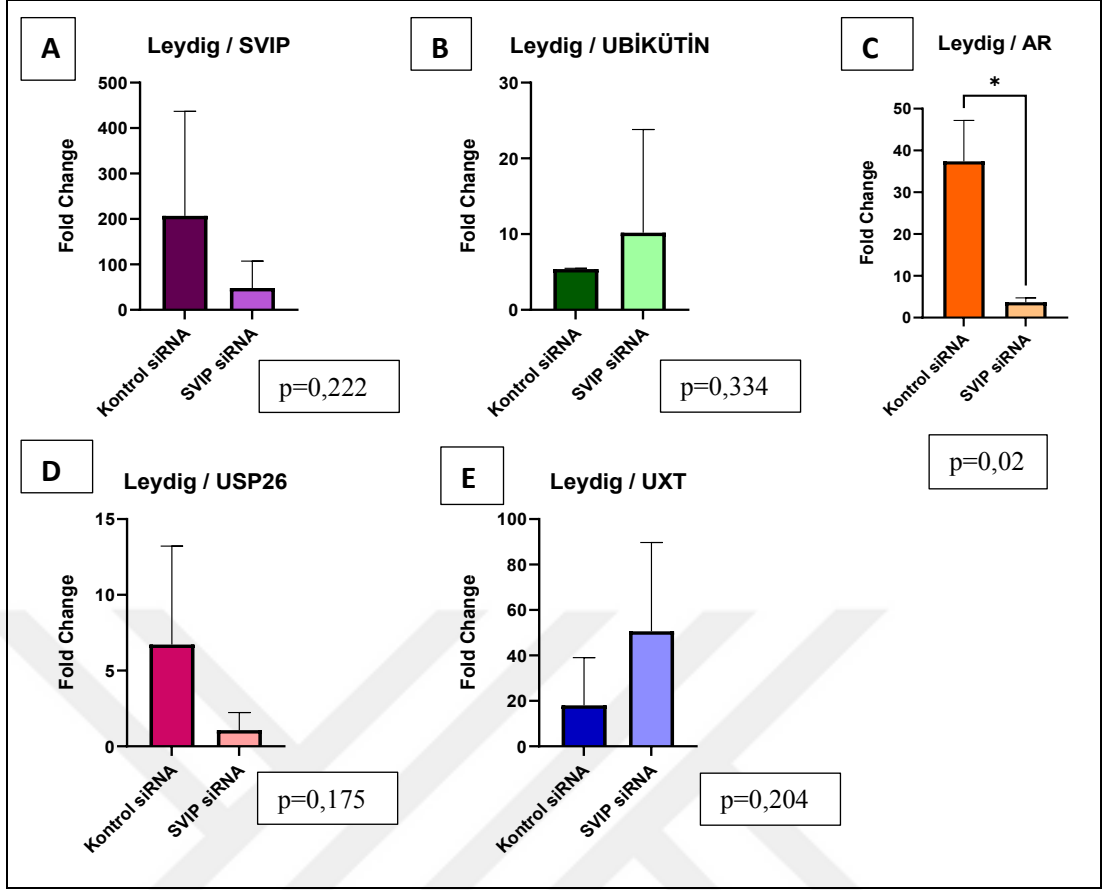


**Şekil 4.48.** CRL-2073 hücre hattında SVIP siRNA transfeksiyonu sonrası qRT-PCR analizi sonrası istatistiksel karşılaştırma grafikleri. A; SVIP, B; UBİKÜTİN, C; AR, D; USP26, E; UXT.

#### 4.8.2. İnsan Leydig Hücrelerinde qRT-PCR Analiz Bulguları

10-HU103 hücrelerinde qRT-PCR yöntemi ile SVIP, UbikÜtin, AR, USP26 ve UXT gen ekspresyonları belirlendi. Daha sonra kontrol siRNA ve SVIP siRNA'ler ile 48 saat süre transfeksiyon işlemleri sonrası tekrarlı qRT-PCR analizleri yapıldı ve SVIP, UbikÜtin, AR, USP26 ve UXT gen ekspresyonları belirlendi. qRT-PCR deneyi için öncelikle tüm genlerin ekspresyonları belirlenirken cDNA'lar kalıp olarak kullandı. Analizler değerlendirilirken YWHAZ geni referans olarak kullanıldı.

10-HU103 hücrelerinde SVIP, UbikÜtin, AR, USP26 ve UXT genlerinin YWHAZ'a göre göreceli ekspresyonları belirlenirken  $\Delta\Delta CT$  yöntemi kullanıldı. Genlerin ekspresyon seviyeleri her bir örnek için YWHAZ ile standardize edilerek  $2^{-\Delta\Delta CT}$  matematiksel modeline göre hesaplandı. Kontrol siRNA ve SVIP siRNA ile transfekte edilen hücrelerde SVIP gen ekspresyonunda azalma görüldü ancak bu azalış istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p=0,222$ ). UbikÜtin geninde artış görüldü ama bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $p=0,334$ ). AR gen ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görüldü ( $p=0,020$ ). USP26 gen ekspresyonunda azalma görüldü ancak bu azalış istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p=0,175$ ). UXT gen ekspresyonunda artış görüldü ama bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $p=0,204$ ). Genlerin ekspresyonları değişim katsayılarına göre grafikler üzerinde gösterildi (Şekil 4.49). Analizlerde  $p<0.05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



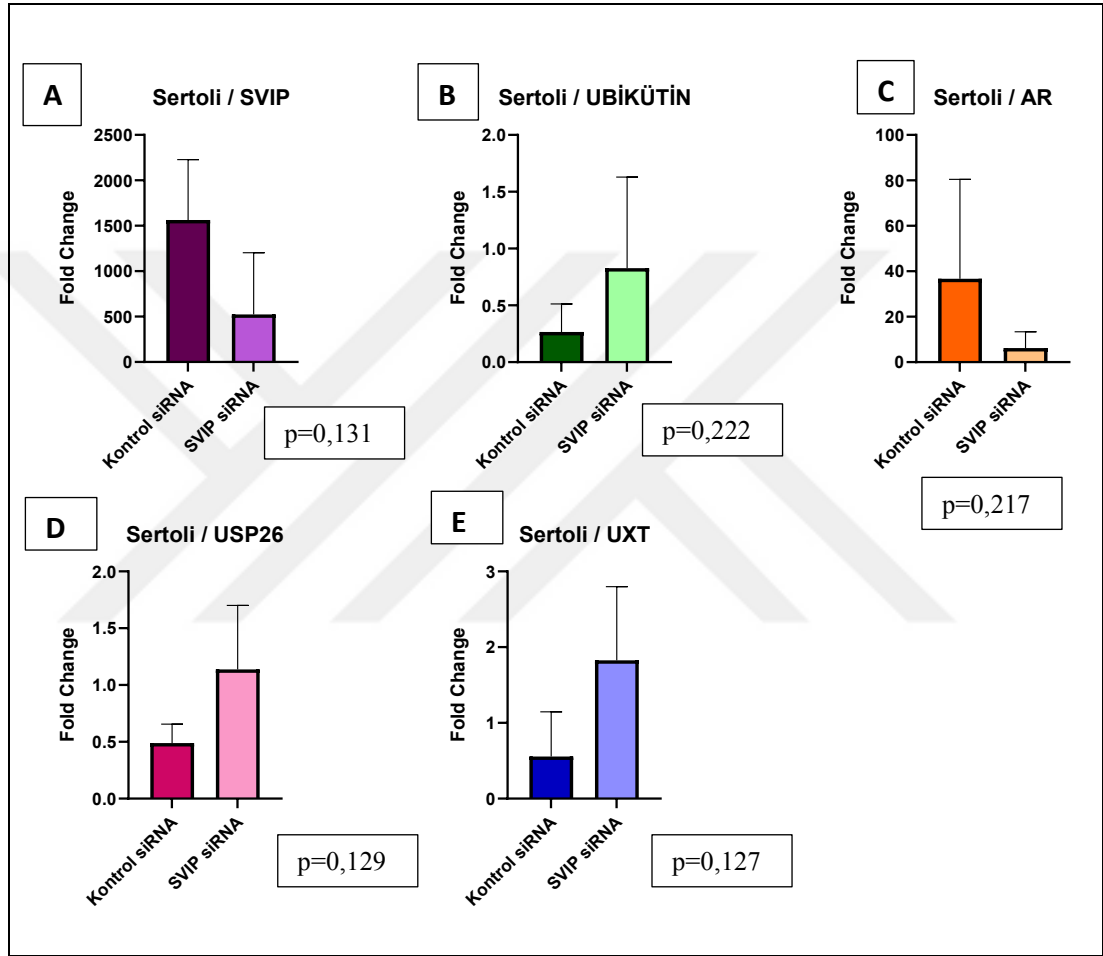
**Şekil 4.49.** 10-HU103 hücre hattında SVIP siRNA transfeksiyonu sonrası qRT-PCR analizi sonrası istatistiksel karşılaştırma grafikleri. A; SVIP, B; UBİKÜTİN, C; AR, D; USP26, E; UXT.

#### 4.8.3. Fare Sertoli Hücrelerinde qRT-PCR Analizlerinin Değerlendirilmesi

CRL-2618 hücrelerinde qRT-PCR yöntemi ile SVIP, Ubikütin, AR, USP26 ve UXT gen ekspresyonları belirlendi. Daha sonra kontrol siRNA ve SVIP siRNA'ler ile 48 saat süre transfeksiyon işlemleri sonrası tekrarlı qRT-PCR analizleri yapıldı ve SVIP, Ubikütin, AR, USP26 ve UXT gen ekspresyonları belirlendi. qRT-PCR deneyi için öncelikle tüm genlerin ekspresyonları belirlenirken cDNA'lar kalıp olarak kullandı. Analizler değerlendirilirken YWHAZ geni referans olarak kullanıldı.

CRL-2618 hücrelerinde SVIP, Ubikütin, AR, USP26 ve UXT genlerinin YWHAZ'a göre göreceli ekspresyonları belirlenirken  $\Delta\Delta CT$  yöntemi kullanıldı. Genlerin ekspresyon seviyeleri her bir örnek için YWHAZ ile standardize edilerek  $2^{-\Delta\Delta CT}$  matematiksel modeline göre hesaplandı. Kontrol siRNA ve SVIP siRNA ile transfekte edilen hücrelerde SVIP gen ekspresyonunda azalma görüldü ( $p=0,131$ ).

Ubikütin gen ekspresyonunda artış görüldü ( $p=0,222$ ). AR gen ekspresyonunda azalma görüldü ( $p=0,217$ ). USP26 gen ekspresyonunda artış görüldü ( $p=0,129$ ). UXT gen ekspresyonunda artış görüldü ( $p=0,127$ ). Gen ifade düzeylerinin hiçbirindeki değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Genlerin ekspresyonları değişim katsayılarına göre grafikler üzerinde gösterildi (Şekil 4.50). Analizlerde  $p<0.05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



**Şekil 4.50.** CRL-2618 hücre hattında SVIP siRNA transfeskiyonu sonrası qRT-PCR analizi sonrası istatistiksel karşılaştırma grafikleri. A; SVIP, B; UBİKÜTİN, C; AR, D; USP26, E; UXT.

## 5. TARTIŞMA

Testisin ana fonksiyonları androjen üretimi ve spermatogenezdir. Androjenler, testosteron ve dihidrotestosteron içeren bir steroid hormon sınıfıdır. Bu hormonlar androjen reseptörleriyle (AR) birlikte erkek cinsel farklılaşmasının düzenlenmesinde, ergenlik gelişiminde, ikincil cinsiyet özelliklerinin farklılaşmasında ve cinsel olgunlaşmada önemli rol oynarlar. Spermatogenez, testisin belirli bölgelerinde ardışık hücresel olayların sırayla meydana geldiği karmaşık bir süreçtir. Spermatogonyanın mitozunu, spermatositlerin iki mayotik bölünmesini ve spermiyogenezi içerir (Kitaoka ve Yamashita, 2024).

Testisteki ana steroidojenik hücreler Leydig hücreleridir. Steroidogenez süreci ile Leydig hücrelerinden testosteron üretimi sağlanır. Bu üretim luteinize edici hormon (LH) tarafından kontrol edilir ve bu hormon hipofizden salgılanır. Sertoli hücreleri testis dokusunun önemli fonksiyonları olan hücreleridir. Spermatogenezin kontrolünü sağlarlar, germ hücrelerine desteklik sağlarlar, kalan işlevsiz parçaların fagosite edilmesini sağlarlar ve kan testis bariyerini oluştururlar (Ross ve Pawlina, 2006).

Testis kanseri 20-40 yaş arası erkeklerde en sık görülen kanserdir ve 15-19 yaş arası erkeklerde lösemi sonrası en sık görülen 2. kanser türüdür. Testis kanserinin nedenleri net olarak açıklanamamaktadır. Yapılan çalışmalarda inmemiş testis (kriptorşidizm), infertilite, aile öyküsü, perinatal risk faktörleri, beslenme, mesleki ve çevresel faktörler testis kanserinin nedenleri olarak gösterilmektedir. Testis tümörlerinin büyük çoğunluğu (%90-95) germ hücre kökenlidir (seminom ve non-seminom). Germ hücreli tümörler içerisinde en yaygın görülen türlerden birisi de embriyonal karsinomdur. Makroskobik olarak kötü sınırlı, soluk gri renklidir. Nekroz ve kanama mevcuttur. Mikroskobik olarak ise kanserli hücreler büyük ve düzensizdir (Yılmaz ve Yunanç, 2022).

Testis kanserinin genellikle etkilediği yaş aralığı fertil dönem olduğu için testis kanseri ve infertilite ilişkisi önemlidir. Testis tümörlerinin hastalarda en sık görülen yan etkisi fertilitate problemidir. Testis kanseri olan kişilerde orşiektomi sonrası %50 oranında spermatogenezde bozulma olabilir. Bunun üzerine hastanın kemoterapi tedavisi alması ile spermatogenez mekanizması daha çok etkilenir. Kemoterapinin spermatogenezini etkilemesi, kullanılan ilaçların doz ve birikim etkisine göre

değişmektedir. Sisplatin ve nitrojen mustard türevi ilaçlar germ hücrelerine en çok zarar veren ilaçlardır. Örneğin sisplatin tedavisi alan kişilerde 400 mg üzerinde alınan dozlar Tip A spermatogonyumlarda kalıcı hasar oluşturmaktadır. Bazı çalışmalarda Comet testi ile kemoterapi sonrası sperm DNA hasarı araştırılmış ve kemoterapi sonrası DNA hasarında artış olduğu tespit edilmiştir. Testis germ hücrelerinin mitotik aktivitesi çok yüksek olduğu için radyoterapiden de çok etkilenirler (Yılmaz ve Yunanç, 2022; Ushida vd.,2011).

Küçük p97/VCP etkileşimli proteinin (SVIP) tanımı ilk kez 2003 yılında Nagahama vd., tarafından yapılmıştır. SVIP, endoplazmik retikulumla ilişkili protein bozulması (ERAD) yolunda rol oynayan 76 amino asitten oluşan ve AAA+ATPaz ailesinden olan p97/valosin içeren proteini (VCP) düzenleyen bir kofaktördür. SVIP, ERAD yolunun endojen bir inhibitörü olarak çalışır. Bir ERAD inhibitörü olmasının yanı sıra SVIP, otofajik yolun düzenleyicisi olarak da tanımlanmıştır (Ballar vd., 2007; Wu vd., 2013).

SVIP ekspresyonu en yüksek merkezi sinir sisteminde serebrum ve serebellumda görülmektedir (Wang vd., 2011). Literatürde SVIP'in sinir sistemi haricindeki doku ve hücrelerdeki ekspresyonu hakkında sınırlı sayıda çalışma vardır. SVIP ile ilgili yapılan çalışmalara bakacak olursak, SVIP'in glioma hastalarında tedavi sırasındaki biyolojik rolü incelenmiştir. Glioma hücrelerinde SVIP ekspresyonu azalırken AR ekspresyonunun normal dokuya kıyasla arttığı görülmüştür (Bao vd., 2017). Daha yakın zamanlarda, SVIP'in bir tümör baskılayıcı rolü tarif edilmiş ve ekspresyonu, artan ER stresi ve kanser büyümesinin inhibisyonu ile ilişkilendirilmiştir. 2021 yılında HeLa hücrelerinde SVIP ile ilgili yapılan bir çalışmada, SVIP'in lizozomal dinamik için önemli bir protein olduğu gösterilmiştir. SVIP mutasyonlarının kas kaybına ve nöromüsküler dejenerasyona neden olduğu gösterilmiştir (Johnson vd., 2021).

Androjenler çok önemli steroid hormonlardır ve ikincil cinsiyet özelliklerinin gelişimi, spermatogenezin başlatılması ve sürdürülmesi gibi birçok üreme sistemi fonksiyonunun düzenlenmesinde rol oynarlar. Androjen fonksiyonu androjen reseptörü tarafından başlatılır. Bu reseptörler nükleer reseptör süper ailesinin üyeleridir ve androjene duyarlı genlerin ekspresyon seviyeleri AR tarafından düzenlenir. Androjenlerin ve androjen reseptörlerinin erkek spermatogenezini ve

üremesindeki rolleri kesin olarak belirlenmiştir (O'Hara ve Smith, 2015; Gent vd.,2004).

Son yıllarda yapılan çalışmalar SVIP'in androjene duyarlı bir protein olduğunu ve ekspresyonunun androjenler tarafından düzenlendiğini göstermiştir. Bu işlevle ilgili olarak yakın zamanda yayınlanan bir makalede, prostat kanserinde SVIP ekspresyonunun androjen tarafından düzenlendiği gösterilmiştir. Ana androjen üreten dokular olan erkek üreme organlarında SVIP'in ekspresyonu ve olası fonksiyonu hakkında literatürde çok az bilgi mevcuttur.

Yapılan bir çalışmada, androjenlerin yüksek oranda eksprese edildiği fare testisinde SVIP'in hücresel lokalizasyonu ve ekspresyonu ile ilgili önemli bulgular paylaşılmıştır. Yapılan bu çalışmada fetal ve postnatal fare testislerinde SVIP ekspresyonu gösterilmiştir. Ayrıca bu çalışmada fare testisinde SVIP ile Leydig hücre gelişimi arasında önemli bir bağlantı ortaya konmuştur (Akcan vd., 2020).

2023 yılında insan testis dokusunda SVIP ve p97/VCP ekspresyonu ve fonksiyonu üzerinde bir çalışma yapılmıştır. Bu çalışmanın amacı bu proteinlerin açıklanamayan infertilite vakalarında testis hücre belirteci olarak kullanılmasıdır. Bu çalışma farklı postnatal yaş dönemlerindeki normal insan testis dokularında SVIP ve VCP protein ekspresyonlarını immünohistokimyasal yöntemler ile tanımlamıştır. Testis dokusunda Sertoli, Leydig ve germ hücrelerinde ekspresyonlar değerlendirilmiştir. SVIP ve VCP ekspresyonları neonatal dönemde düşük iken prepubertal ve pubertal dönemde artmaktadır. Sertoli, Leydig ve peritübüler hücrelerdeki androjen yanıt, testis gelişim aşamaları ve normal testis fonksiyonu için gereklidir (Arıcı ve Erdemir, 2023).

Literatürde SVIP siRNA ile ilgili çok az çalışma bulunmaktadır. Hepatositler ile ilgili yapılan bir çalışmada SVIP fonksiyonunu durdurmak için SVIP siRNA kullanılmış ve hepatositlerde ki VLDL (Very Low Density Lipoprotein) salgısı azalmıştır (Tiwari vd., 2016). Glioma hücreleri ile ilgili yapılan bir çalışmada kullanılan SVIP siRNA sonrası kanserli hücrelerde SVIP ifadesi azalırken AR ifadesinin normal dokuya kıyasla arttığı tespit edilmiştir (Bao vd., 2017). 2022 yılında yapılan bir çalışmada SVIP siRNA transfeksiyonu yapılan Leydig hücrelerinde kontrol siRNA ve SVIP siRNA verilen gruplar arasında testosteron seviyesine bakıldığında

SVIP siRNA verilen grupta daha düşük bir testosteron seviyesi görülmüştür. SVIP siRNA verilmesi sonucunda steroidogenez mekanizmasındaki proteinlerin etkilendiği gösterilmiştir (Alimoğulları vd., 2022).

Literatürde SVIP'in tümör baskılayıcı rolü tanımlanmış ve SVIP ekspresyonunun artan ER stresi ve kanser büyümesinin inhibisyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Kanserli hücrelerde yapılan çalışmalarda SVIP ifadenmesinin normal hücelere göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Bunun nedeni malign olan hücrelerde daha fazla miktarda poliubikütinlenmiş proteinlerin birikmesidir. Daha önce yapmış olduğumuz insan testis tümörleri ile ilgili çalışmamızda tümörlü dokular ve normal dokularda ki p97/VCP ve Ubikütin protein ekspresyonları karşılaştırıldığında anlamlı derecede farklılıklar gözlenmiştir (Nakkaş vd., 2021). Çeşitli testis tümörlü dokular ile normal testis dokularını karşılaştırdığımız çn çalışmada, SVIP ve p97/VCP ekspresyonları değerlendirildiğinde tümörlü dokularda daha yüksek SVIP ekspresyonu görülmüştür. Yapmış olduğumuz çalışmada en yüksek SVIP ekspresyonu Leydig hücre tümörlerinde görülmüştür. Daha sonra sırası ile Sertoli ve embriyonal karsinom gelmektedir. Yapmış olduğumuz bu çalışmalardan yola çıkarak insan testis embriyonal karsinom hücrelerinde SVIP ve UPS proteinlerin ekspresyonları ile ilgili çalışmayı hedefledik. Bu çalışmamızda da testis tümörlerinden birisi olan embriyonal karsinom hücrelerinde SVIP'in infertilite ile ilişkilendirilen proteinler ve Ubikütin aracılı sinyal yolağı üzerinde etkisi olup olmadığını araştırdık. Literatürde insan embriyonal karsinom hücre hattında SVIP ekspresyonuna ilk kez bakılmış olması literatür açısından büyük önem teşkil etmektedir. Bu çalışmada embriyonal karsinom hücre hattında siRNA transfeksiyonu ile SVIP ekspresyonunun inhibisyonun yapılmış olması literatür için önemlidir.

Literatürde SVIP ile ilgili sınırlı olan çalışmalar tarandıktan sonra, literatürdeki bilgiler doğrultusunda tez çalışmamda insan testis embriyonal karsinom hücrelerinde ve kontrol grubu olarak kullanılan fare Sertoli ve insan Leydig hücre hatlarında SVIP, Ubikütin, AR, USP26 ve UXT proteinlerinin ekspresyonları değerlendirildi. Ayrıca SVIP ifadesinin siRNA ile baskılanmasının bu proteinlerin ekspresyonlarını nasıl etkilediği araştırıldı. Hücre hatlarında SVIP'in fonksiyonunu belirlemek amacı ile hücrelerdeki gen ekspresyonlarının baskılanması için siRNA ile transfeksiyon yöntemi uygulandı. Bu yöntemde siRNA öncelikle hedef gene karşı tasarlanır ve böylece transfeksiyon protokolü aracılığı ile genin etkili şekilde baskılanması veya

susturulması sağlanır. SVIP geninin baskılanması için siRNA ile transfeksiyon yönteminin seçilmesinin sebebi siRNA'nın hücre tiplerine kolay uygulanabilmesi, yüksek verimliliğe ve tekrarlanabilirliğe sahip olmasıdır (Han, 2018). Çalışmamızda SVIP geninin baskılanması için 4 farklı SVIP siRNA bir arada kullanıldı. Hücrelere verilen SVIP siRNA dozu literatürde yer alan çalışmalara göre belirlendi (Alimoğulları, 2020; Şahin, 2021). Uygulanan dozun hücreler için herhangi toksik bir etkisinin olup olmadığını göstermek için Tripan mavisi ile boyama yapıldı. Boyama sonucuna bakıldığında kontrol siRNA verilen ve SVIP siRNA verilen hücrelerin canlılığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (Şekil 4.20). Transfeksiyon sonrası hücre morfolojilerine bakıldığında hücrelerin sitoplazmalarında SVIP siRNA sonrası vakuol oluşumu gözlemlendi (Şekil 4.21, Şekil 4.22, Şekil 4.23). Belirlenen dozda uygulanan transfeksiyonun öncesi ve sonrasındaki protein ekspresyon değişikliklerine bakıldı. Bu çalışmalar sırasında immünfloresan, western blot ve qRT-PCR analizleri kullanıldı.

Ubiküitin proteazom sistemi (UPS), protein bozulmasında ve bazı durumlarda protein aktivitesinin düzenlenmesinde önemli roller oynar (Kwon ve Ciechanover, 2017). UPS'de meydana gelen düzensizlikler genellikle kanser gibi patolojik durumlara neden olmaktadır (Nijman vd., 2005). Bununla birlikte, bazı durumlarda ubiküitin zinciri hem fonksiyonel proteinleri hem de ubiküitini geri dönüştüren deubiküitinasyon enzimlerini de (DUB'ler) içerebilir. Deubiküitinazlar (DUB'ler), ubiküitini uzaklaştıran ve geri dönüştüren sistemin proteazlarıdır (Suresh vd., 2015). Şu ana kadar insanda 100'den fazla DUB enzimi tanımlanmıştır (Tian vd., 2019). DUB'ler apoptoz, hücre döngüsünün ilerlemesi ve proteinlerin bozulmadan korunması gibi çeşitli biyolojik süreçlere katılır. DUB'ler altı kategoride sınıflandırılır: USP (ubiküitine özgü) işleme proteazları), UCH (ubiküitin C-terminal hidrolazları), JAMM (Jab1/Pab1/MPN alanı içeren metaloenzimler), OUT (ovarian tumour proteases), MCP1P'ler (monosit kemotaktik protein kaynaklı proteazlar) ve Ataksin-3/Josephin. Özellikle USP ve UCH ailesine ait olan DUB'lerin spermatogenez mekanizmasında önemli oldukları gösterilmiştir. Ubiküitinasyon, hücre proteinlerinin stabilitesini ve bozulmasını kontrol eden önemli bir biyolojik süreçtir (Stouffs vd., 2004).

Erkek üreme sisteminde ubiküitin proteazom sisteminin (UPS) infertilite üzerinde etkisi olduğuna dair çalışmalar vardır. Bu nedenle UPS'nin bileşenleri olan proteinlerin ekspresyonunun araştırılması testis biyolojisi için önemlidir. Bu zamana

kadar, insan testis embriyonal karsinom hücrelerinde SVIP ve etkileşimde olduğu proteinlerin ekspresyonu üzerine literatürde araştırma yoktur. Bu nedenle bu tez çalışmasından elde edilen bulgular literatür için önemlidir.

USP26, büyümenin kontrolü, farklılaşma, onkogenез ve genom bütünlüğü dahil olmak üzere biyolojik olarak önemli birçok hücresel süreçte rol oynayan DUB ailesinin bir üyesidir (Wosnitzer vd., 2014). USP26'nın ilk olarak tanımı Wang vd. (2001) tarafından yapılmıştır. Polimerik ubiküitin zincirlerini substratlardan ayıran ve hücrelerde ubiküitin homeostazisinin korunmasından sorumlu olan sistein proteaz ailesinin üyesidir. USP26 tek bir ekzondan oluşur ve Xq26.2'de bulunur. Testiste bu genin özel ifadesi hem farelerde hem de insanlarda belirlenmiştir. DUB'lerin önemi, USP26'nın testise özgü ifadesi, spermatogenezin düzenlenmesindeki varsayılan rolü ve geni bir bireyde tek bir alel ile sınırlayan X kromozomu üzerindeki konumu göz önüne alındığında, USP26 erkek infertilitesinin araştırılması için önemli bir gen konumuna gelmiştir (Ferlin vd., 2007; Stouffs vd., 2009). Birçok çalışma USP26'daki polimorfizmlerin obstrüktif olmayan azospermi veya astenozoospermi ile ilişkili olduğunu bildirmiştir (Zhang vd., 2009).

USP26'nın in vitro çalışmalarda spermatogenez ve steroid üretiminde düzenleyici olarak görev yaptığı rapor edilmiştir. Jing ve arkadaşları yapmış oldukları bir çalışmada USP26'nın siRNA ile transfekte edildiğinde AR ekspresyonunun da USP26 ile birlikte azaldığını göstermişlerdir (Wang vd., 2020). Fare testislerinde USP26, sperm hücrelerinde ve kan-testis bariyerinde yüksek oranda eksprese edilir. İnsanlarda USP26, Leydig hücrelerinde ve Sertoli hücrelerinde yüksek oranda eksprese edilir (Wosnitzer vd., 2014).

UXT, 157 amino asit uzunluğunda çeşitli dokularda yaygın olarak eksprese edilen ve özellikle spermatogenez mekanizmasında yer alan önemli bir proteindir. Literatürde yapılan bir çalışmada Sertoli hücrelerinde UXT'nin silinmesinin spermatogenez mekanizmasını olumsuz etkilediği gösterilmiştir. Yine aynı çalışmada UXT proteini germ hücrelerinde silindiğinde testis büyüklüğü ve ağırlığının azaldığı gösterilmiştir (Thomas vd., 2020). Bir başka çalışmada UXT ekspresyonu durdurulmuş farelerin testisleri kontrol grubundaki hayvanlar ile kıyaslandığında testis boyutunun önemli ölçüde azaldığı ve sperm içermediği görülmüştür (Schafner vd., 2018).

Androjenler spermatogenez sürecini kontrol eden kritik seks hormonlarıdır. Eylemlerine nükleer reseptör süper ailesinin bir üyesi olan androjen reseptörü (AR) aracılık eder. Sertoli hücrelerinin genellikle spermatogenez üzerindeki androjen etkisinin önemli araçlarından biri olduğu kabul edilir. AR'lerin testis dokusunda Leydig, Sertoli ve peritübüler hücrelerde lokalize olduğu bilinmektedir. Sertoli hücreleri ve peritübüler miyoid hücrelerin AR'leri eksprese ettiği bulunmuştur (Linàs-Arias vd., 2019, Romanuik vd., 2010). Sertoli hücreleri spermatogenez sırasında germ hücreleriyle fiziksel temas halindedir ve seminifer tübüllerde androjene duyarlı tek somatik hücre tipidir (Erzurumlu ve Ballar, 2017). Sertoli hücrelerinin AR'leri spermatogenezi ve testis fonksiyonunu düzenler. Normal testis gelişimi ve fonksiyonunun ilerlemesi için Sertoli, Leydig ve peritübüler hücrelerde bir AR yanıtının oluşması gerekir (Wang vd., 2009). Leydig hücrelerinin sitoplazmik yapıları androjen üretim fonksiyonlarıyla ilişkilidir (Shen vd., 2016).

Androjenler, Sertoli hücreleri ve sperm olgunlaşması üzerinde doğrudan etkiye sahip olduğundan erkeklerde doğurganlığın sürdürülebilmesi için mutlaka ekspresyonlarının olması gerekir. Androjen etkisine, gen regülasyonunda yer alan bir transkripsiyon faktörü AR aracılığıyla moleküler düzeyde aracılık edilir. AR ekspresyonu durdurulursa bu genellikle infertilite ile sonuçlanır. Sertoli hücreleri, germ hücrelerinin beslenmesi ve gelişimi için önemlidir. Sertoli hücreleri androjen reseptörünü eksprese eder. Androjen reseptör genindeki mutasyonların neden olduğu androjen duyarsızlığı, erkek infertilitesinin önemli bir genetik nedenidir (Hiort ve Holterhus, 2003).

Literatürde yer alan bir çalışmada AR geninin silinmesi sonucunda fare epididimisinde sperm olmadığı ve dolayısıyla farelerin infertil olduğu gösterilmiştir (Smith ve Walker, 2014). Leydig hücrelerinde yapılan bir çalışmada da AR geni silindiğinde spermatidler yuvarlak şekilde oluşmuş ve bunun sonucunda fareler infertil olmuştur (Smith ve Walker, 2014). Fare germ hücrelerinde yapılan bir çalışmada AR geni durdurulduğu zaman farelerin spermatogenez mekanizmasının etkilenmediği gösterilmiştir (Zhang vd., 2011).

Bununla birlikte AR'nin germ hücrelerindeki ekspresyonu tartışmalıdır (Johnston vd, 2001). Testis dokusundaki germ hücrelerinde AR'nin varlığını da yokluğunu da destekleyen yayınlar vardır (Tsai vd, 2006). Bu konu literatürde tam

olarak açıklığa kavuşmamıştır. Germ hücreleri AR'ye direkt bağlanmak yerine Sertoli üzerinden bağlanmayı yapmaktadır. Germ hücrelerinde androjen için fonksiyonel reseptör yoktur (O'Hara ve Smith, 2015, Smith ve Walker, 2014). Bunun yerine Sertoli hücrelerine yayılan testosteron, spermatogenezi desteklemek için gereken fonksiyonel yanıtları başlatmak üzere sitoplazma ve çekirdekte bulunan AR'ye bağlanır. Literatürde yer alan bir çalışmada germ hücreleri AR'yi eksprese etmediğinden, androjenlerin spermatogenez üzerindeki etkilerini Sertoli hücresi AR sine bağlanmaları yoluyla kuvvetlendirdikleri gösterilmiştir (Walker vd., 2015). AR, AMH ile birlikte iç ve dış genital yollarda erkek fenotipine yol açan cinsiyet farklılaşması yolundaki ana düzenleyici faktördür. Testiste testosteron ayrıca Leydig hücrelerinde ifade edilen AR ile de etkileşime girer. Yetişkin erkekte testisteki testosteron seviyeleri sabit tutulur ve testislerde Leydig hücrelerinde AR seviyeleri sabittir. Buna karşılık Sertoli hücrelerinde AR ifadesi, aşamalara bağlı olarak döngüsel bir şekilde değişir (Köhler vd., 2007). Literatürde insan testis dokusuna ait bir çalışmada AR'nin testis dokusundaki hücrelerde ekspresyonu immunositokimya ile gösterilmiştir. Başka bir çalışmada ise testis germ hücrelerinde AR ekspresyonu gösterilmiştir (Kimura vd., 1993). Literatüre bakıldığını zaman germ hücrelerinde AR ekspresyonunun olup olmadığı tartışmalı bir konudur.

Bu tezde insan embriyonal karsinom hücrelerinde SVIP'in Ubikütün aracılı sinyal yolağı molekülleri (Ubikütün, USP26 ve UXT) ve AR protein ekspresyonları üzerine bir etkisinin olup olmadığını açık bir şekilde göstermek amacı ile testis embriyonal karsinom hücre hattı ile deneyler yapıldı. Kontrol grubu olarak ise Sertoli ve Leydig hücreleri seçildi. Literatürde erkek üreme sisteminde Leydig ve Sertoli hücrelerinde SVIP ekspresyonu gösterilmiştir (Akcan vd., 2020). Bu nedenle protein ekspresyonlarının belirlenmesinde çalışmamızda pozitif kontrol grubu olarak insan Leydig hücre hattı ve fare Sertoli hücre hattı kullanıldı. Sertoli hücre grubunda fare hücre hattı seçilmesinin sebebi, insan testis dokusuna ait Sertoli hücre hattı olmamasıdır.

SVIP'in androjene duyarlı bir gen olduğu tanımlanmıştır (Nagaham vd., 2003). Literatürde androjenlerin ve AR'nin fazla eksprese edildiği testis dokusunda SVIP varlığını gösteren çok az çalışma vardır (Akcan vd., 2020; Arıcı ve Erdemir, 2023). Çalışmamızda siRNA ile baskılanma öncesi ve sonrası AR gen ifadesine bakılmış olması ubikütün aracılı sinyal yolağının erkek infertilite mekanizmalarına etkisi

açısından literatüre önemli katkı sağlayacaktır. Ayrıca literatürde insan embriyonal karsinom hücre hattında SVIP ekspresyonu ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. Bu yüzden ilk kez bakılmış olması literatür açısından büyük önem teşkil etmektedir. Leydig ve Sertoli hücrelerinde SVIP varlığının gösterilmiş olması, bu hücrelerin pozitif kontrol olması için önemlidir. Embriyonal karsinom hücrelerinde SVIP ifadesinin siRNA ile baskılanması ile Ubikütin, UPS proteinleri (USP26 ve UXT) ve AR protein ekspresyon farklılıklarının olması SVIP ve Ubikütin aracılı sinyal yolağı hakkında literatüre katkı sağlayacaktır.

Tezin ilk aşamasında hücelere transfeksiyon yapmadan önce proteinlerin hücrelerde olup olmadığına bakmak için insan testis embriyonal karsinom hücrelerinde ve kontrol grubu olarak kullanılan olan insan Leydig ve fare Sertoli hücrelerinde immünofloresan boyama ile SVIP, Ubikütin, AR, USP26 ve UXT proteinlerin ekspresyonları gösterildi. Daha sonra hücelere SVIP siRNA transfeksiyonu yapıldı. Kontrol siRNA ve SVIP siRNA verdiğimiz gruplar arasındaki protein ekspresyon farklılıklarına immünofloresan boyama, western blot analiz ve qRT-PCR analiz yöntemleri ile bakıldı.

İnsan testis embriyonal karsinom hücre hattında SVIP ekspresyonun gösterilmiş olması çalışmanın orijinal bulgularındandır. Aynı zamanda bu hücrelerdeki SVIP aktivitesini baskılamak için kullanılan SVIP siRNA transfeksiyonu sonrası protein ve gen düzeyinde analizler yapılmıştır. UPS'de rol oynayan SVIP ve bununla ilişkili diğer genlerin ekspresyonlarının belirlenmesi testis biyolojisi için önemlidir.

CRL-2073 (insan testis embriyonal karsinom) hücrelerinde yapılan immünofloresan boyama sonucuna göre kontrol siRNA ve SVIP siRNA verilen gruplar arasında SVIP, AR ve USP26 protein ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldı. Ubikütin protein ekspresyonu da azaldı. UXT protein ekspresyonu ise artış gösterdi (Şekil 4.29). CRL-2073 hücrelerinde yapılan western blot analizi sonucuna göre kontrol siRNA ve SVIP siRNA verilen gruplar arasında SVIP ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı derece azaldı. USP26, AR ve Ubikütin protein ekspresyonu azaldı. Literatürde germ hücrelerinde AR ekspresyonu tartışmalı bir konudur. Tez çalışmamda kullandığım insan testis embriyonal karsinom hücre hattı germ hücre kökenlidir. Bu çalışmada yapılan western blot ve immünofloresan boyama sonuçlarına

göre CRL-2073 hücrelerinde AR ekspresyonu görüldü. Bu bulgu literatüre katkı sağlayacak ve ayrıca SVIP-AR ilişkisi için de önemli olacaktır. UXT protein ekspresyonu ise artış gösterdi (Şekil 4.43). CRL-2073 hücrelerinde yapılan qRT-PCR analizi sonucuna göre kontrol siRNA ve SVIP siRNA verilen gruplar arasında SVIP gen ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldı. UXT ve Ubikütin gen ekspresyonu anlamlı derecede arttı. AR ve USP26 gen ekspresyonları ise artış gösterdi (Şekil 4.48).

10 HU-103 (insan Leydig) hücrelerinde yapılan immunofloresan boyama sonucuna göre kontrol siRNA ve SVIP siRNA verilen gruplar arasında SVIP, AR ve USP26 protein ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldı. Ubikütin protein ekspresyonu da azaldı. UXT protein ekspresyonu ise anlamlı derece de artış gösterdi (Şekil 4.35). 10 HU-103 hücrelerinde yapılan western blot analizi sonucuna göre kontrol siRNA ve SVIP siRNA verilen gruplar arasında SVIP ekspresyonu ve AR ekspresyonu anlamlı derece azaldı. USP26 ve Ubikütin protein ekspresyonu azaldı. UXT protein ekspresyonu ise anlamlı derece de arttı (Şekil 4.45). 10 HU-103 hücrelerinde yapılan qRT-PCR analizi sonucuna göre kontrol siRNA ve SVIP siRNA verilen gruplar arasında SVIP gen ekspresyonu azaldı. AR gen ekspresyonu anlamlı derece de azaldı. UXT ve Ubikütin gen ekspresyonu arttı. USP26 gen ekspresyonları ise azaldı (Şekil 4.49).

CRL-2618 (fare Sertoli) hücrelerinde yapılan immunofloresan boyama sonucuna göre kontrol siRNA ve SVIP siRNA verilen gruplar arasında SVIP ve AR protein ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldı. Ubikütin ve USP26 protein ekspresyonu azaldı. UXT protein ekspresyonu ise arttı (Şekil 4.41). Özellikle SVIP ve UXT proteinlerinde hücrelerin sitoplazmalarında vakuol oluşumları görüldü. Bu oluşan vakuollerin büyük ihtimalle hatalı ER proteinlerinden kaynakladığı düşünülmektedir (Ballar vd., 2007). CRL-2618 hücrelerinde yapılan western blot analizi sonucuna göre kontrol siRNA ve SVIP siRNA verilen gruplar arasında SVIP, AR ve USP26 ekspresyonu anlamlı derece azaldı. Ubikütin protein ekspresyonu azaldı. UXT protein ekspresyonu ise anlamlı derece de arttı (Şekil 4.47). CRL-2618 hücrelerinde yapılan qRT-PCR analizi sonucuna göre kontrol siRNA ve SVIP siRNA verilen gruplar arasında SVIP ve AR gen ekspresyonları azaldı. Ubikütin, USP26 ve UXT gen ekspresyonları arttı (Şekil 4.50).

Yapılan immünofloresan boyama ve western blot analiz sonuçlarına göre çalıştığım tüm hücre hatlarında SVIP siRNA transfeksiyonu sonrası AR ve UPS yolağındaki proteinler bu baskılanmadan etkilendi. SVIP siRNA verildikten sonra SVIP ile birlikte AR protein ekspresyonunun da anlamlı olarak azalması SVIP ve steroidogenez mekanizmasının ilişkisi için önemli bir bulgudur. Literatüre bakıldığı zaman Leydig hücreleri ve SVIP ile ilgili yapılan bir çalışmada, SVIP'in Leydig hücrelerdeki steroidogenezdeki rolü tespit edilmiştir. İlgili çalışmada SVIP'in androjen sentezi veya androjen reseptör ile bir ilgisi olup olmadığının cevaplanması beklenen sorulardandır (Akcan vd., 2020). Biz de bu çalışmamızda SVIP-AR ilişkisi için temel bir çalışma yaptık ve ileri çalışmalar için önemli olduğunu düşünüyoruz. Yapmış olduğumuz analizlerde USP26 ve AR ekspresyon değişiklerinin aynı yönde olmasının nedeni, literatürde yer alan bilgilere göre USP26 proteinin AR ile aynı yerlerde lokalize olması ve AR'yi modüle ediyor olmasıdır (Ma vd., 2016). Ayrıca USP26'nın, AR ekspresyon seviyesini düzenlemek için AR'ye bağlanan nükleer proteinleri kodladığı bilinmektedir. Bu da USP26-AR ilişkisinin önemli bir mekanizma olduğunu gösteriyor (Li vd., 2020). Ayrıca USP26'nın spermatogonya, Sertoli, embriyonik kök hücre ve Leydig hücrelerindeki etkisinden dolayı, spermatogenezin düzenleyici proteinlerini ve AR'yi etkilediği literatürde gösterilmiştir. (Wosnitzer vd., 2014). Hücre hatlarında SVIP siRNA ile SVIP baskılanması sonrası Ubikütin proteinin de azaldığı görülüyor. SVIP, UPS ile ilişkili olduğu için SVIP'in baskılanması Ubikütin ekspresyonunu da azalttı ancak bu azalış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Hücre hatlarında UXT ile ilgili yapılan çalışmalarda, SVIP siRNA ile SVIP ekspresyonunun baskılanması sonrası UXT ekspresyonu artış gösterdi. Literatürde UXT'nin germ hücre ve Sertoli hücrelerindeki rolü ve mekanizması ile ilgili çok az çalışma vardır. Germ hücrelerinde UXT silinerek oluşturulan knock-out (KO) hayvan modellerinde testis büyüklüğünün azaldığı tespit edilmiştir ve Sertoli cell only (testis histolojisinde seminifer tübüllerde sadece sertoli hücresi olması durumu) sendromu görülmüştür (Schafner vd., 2018). UXT'nin Sertoli hücrelerindeki rolünü anlamak için yapılan bir başka çalışmada Sertoli hücrelerinde UXT geni silinerek KO hayvan modeli oluşturularak KO olan ve normal olan (WT) hayvanlar karşılaştırıldığında Sertoli hücre sayılarının birbirinden çok farklı olmadığı tespit edilmiş. UXT KO modelde oluşan Sertoli hücrelerinin olgunlaşmasının etkilenip etkilenmediği göstermek için AR ifadesine bakılmış ve hücrelerde UXT yokken AR ifadesinin olduğu tespit edilmiş. UXT KO olan farelerde sperm konsantrasyonunun

düştüğü tespit edilmiş (Schafler vd., 2018). Literatürde olduğu gibi bizim çalışmamızda SVIP siRNA sonrası UXT ve AR proteinlerinin birbirleri ile ters yönde etkilendiklerini göstermektedir. Ama UXT'nin Sertoli, germ ve Leydig hücrelerindeki rolü ile ilgili daha net bir şey söylemek için daha çok çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Çalışmamızda insan testis embriyonal karsinom, insan Leydig ve fare Sertoli hücreleri için araştırdığımız genlerin (SVIP, Ubikütin, AR, USP26 ve UXT) ekspresyonları cDNA'lar kalıp olarak kullanılarak qRT-PCR analizi ile de çalışıldı. Gen ekspresyonlarındaki farklılıklar kontrol siRNA ve SVIP siRNA verilen gruplar arasında belirlendi. Kontrol siRNA ve SVIP siRNA verilen gruplarda SVIP gen ekspresyonu azaldı. Yapılan deneylerin sonucunda protein ekspresyon sonuçları ve gen ekspresyon sonuçlarının tamamen aynı olmamasının nedeninin kodlanmamış RNA'lar (noncoding- ncRNA) olduğu düşünülmektedir. Ökaryotik DNA'ların yaklaşık %90'lık kısmının RNA'ya transkripsiyonu gerçekleşir. Fakat bunların sadece %1-2'lik kısmı proteine dönüşür. Proteine dönüşemeyen RNA'lar kodlanmamış RNA olarak isimlendirilir. ncRNA'lar biyolojik süreçlerde önemli rollere sahiptir. ncRNA'ların birçok alt grubu vardır. En önemlilerinden birisi yaşam için gerekli olan housekeeping olarak isimlendirilen gruptur. Bütün dokularda bulunur. Diğer önemli grup ise düzenleyici ncRNA'lardır (Güzelgün ve Aksoy, 2009). Literatüre bakıldığında bu tarz protein ve gen düzeyinde farklılıkların olduğu görülmüştür. 2023 yılında yapılan bir çalışmada meme kanseri dokusunda SVIP mRNA ekspresyonu kontrol dokusuna göre yüksek iken, SVIP protein düzeyi anlamlı derece düşük bulunmuştur (Şahar ve Kirmizibayrak, 2023). Bizim çalışmamızda SVIP gen ekspresyonunun istatistiksel olarak anlamlı sonuç vermesi gen ekspresyon çalışmalarının testis embriyonal karsinom ve SVIP protein ilişkisi için önemli sonuç verdiğini göstermektedir.

Tezimde yaptığım deneyler; CRL-2073 hücrelerinin SVIP siRNA transfeksiyonu sonrası SVIP ekspresyonunun baskılanması sonucu UPS'de görevli protein ekspresyonlarının etkilenmesi, SVIP'in testis embriyonal karsinom hücrelerinde UPS sürecinde önemli olduğunu göstermiştir. Ayrıca SVIP-AR ilişkisinin gösterilmesi bu proteinlerin erkek testis gelişimi, sekonder seks karakterlerinin gelişimi ve sperm üretimi üzerine etkili olabileceğini düşündürmüştür.

Yaptığımız deneyler ve elde ettiğimiz sonuçlar toplu olarak değerlendirildiğinde, çalışmaya ilk başladığımız zaman belirlediğimiz amaç ve hedeflere ulaşmamızın yanı sıra bundan sonrası için de ilgili alanda yapılabilecek daha ileri çalışmaların ilk adımını atmış bulunmaktayız. İlk olarak insan embriyonal karsinom hücrelerinde SVIP ve Ubikütin proteini ve bu proteinlerin etkileşimde olduğu UPS proteinlerinin (USP26 ve UXT) ekspresyonlarını gösterdik. İkinci olarak siRNA ile SVIP fonksiyonunun baskılanması sonrası diğer protein ekspresyonlarının nasıl değişeceğini gösterdik. Bu çalışma ile ubikütin aracılı sinyal yolağında yer alan ve infertilite ile ilişkilendirilen bu proteinlere embriyonal karsinom hücrelerinde ilk defa bakılmış olması literatür açısından önemlidir. Ayrıca Leydig ve Sertoli hücrelerinde de SVIP siRNA transfeksiyonu sonrası Ubikütin, USP26 ve UXT ifadeleri ilk kez gösterildi. Diğer önemli bir konuda ekspresyonu ve fonksiyonu üzerinde sınırlı bilgiye sahip olunan SVIP molekülü ile ilgili literatüre önemli katkı sağlandı.

Ayrıca literatürde germ hücrelerinde ekspresyonu tartışmalı olan AR'nin, germ hücre kökenli hücre hattı olan CRL-2073'de ekspresyonu gösterildi. Bu proteinin fetal testis gelişimi, sperm üretimi ve sekonder seks karakterlerin gelişimi üzerine etkisi olabileceği düşünülmektedir. Böylece SVIP ve androjen reseptörü arasındaki etkileşimin erkek üreme sistemi üzerinde etkisi olup olmadığı ile ilgili ileri çalışmalar için temel bir çalışma yapılmış oldu. Ayrıca bu tez çalışması insan testis embriyonal karsinom hücrelerinde SVIP ve Ubikütin aracılı sinyal yolağının testisteki olası rolü hedeflenerek testis tümörü patogenezi için yapılacak çalışmalar için de önemli bir ön çalışma niteliğindedir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma kapsamında aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir:

- 1) CRL-2073, 10 HU-103 ve CRL-2618 hücreleri uygun hücre kültürü ortamında çoğaltıldı ve daha sonra HE boyama ile hücrelerin morfolojik yapıları incelendi.
- 2) Bu hücrelerde SVIP, AR, Ubikütin, USP26 ve UXT proteinlerinin ekspresyonları immunofloresan boyama ile gösterildi. Ayrıca SVIP'in CRL-2073'te immünositokimyasal yöntemle lokalizasyonu ilk defa belirlendi.
- 3) Hücelere literatüre göre belirlenen dozda SVIP siRNA transfeksiyonu yapıldı. Uygulanan dozun hücreler için uygun olup olmadığını belirlemek için Tripan mavisi ile hücreler boyandı. Boyama sonucu canlı hücre sayılarına bakıldığı zaman uygulanan dozun hücreler için toksik olmadığı gösterildi.
- 4) Kontrol siRNA ve SVIP siRNA verilen hücre grupları arasında SVIP, AR, Ubikütin, USP26 ve UXT protein ekspresyonları arasında fark olup olmadığına immunofloresan boyama, western blot ve qRT-PCR analizleri ile bakıldı.
- 5) CRL-2073 hücre hattında SVIP siRNA ile yapılan transfeksiyon sonrası kontrol siRNA ve SVIP siRNA verilen grupların immünoFloresan boyama sonuçları karşılaştırıldığında SVIP, AR ve USP26 'nın ekspresyonlarının anlamlı derecede azaldığı görülmüştür. Ubikütin ekspresyonu azalmıştır ve UXT ekspresyonu artmıştır. Western blot analiz sonucuna göre, SVIP siRNA verilen gruplarda SVIP ekspresyonu anlamlı derecede azalmıştır. USP26, AR ve Ubikütin ekspresyonu azalmış ve UXT ekspresyonu artmıştır. qRT-PCR analiz sonucuna göre, SVIP siRNA verilen gruplarda SVIP gen ekspresyonu anlamlı derecede azalmıştır. AR, Ubikütin, USP26 ve UXT gen ekspresyonları artmıştır.
- 6) 10-HU103 hücre hattında SVIP siRNA ile yapılan transfeksiyon sonrası kontrol siRNA ve SVIP siRNA verilen grupların immünoFloresan boyama sonuçları karşılaştırıldığında SVIP, AR ve USP26'nın ekspresyonları anlamlı derecede azalmıştır. Ubikütin ekspresyonu azalmıştır ve UXT

ekspresyonu anlamlı derecede artmıştır. Western blot analiz sonucuna göre, SVIP siRNA verilen gruplarda SVIP ve AR ekspresyonu anlamlı derecede azalmıştır. USP26 ve Ubikütin ekspresyonları azalmış ve UXT ekspresyonu anlamlı derecede artmıştır. qRT-PCR analiz sonucuna göre, SVIP siRNA verilen gruplarda SVIP ve AR gen ekspresyonu azalmıştır. Ubikütin, USP26 ve UXT gen ekspresyonları artmıştır.

- 7) CRL-2618 hücre hattında SVIP siRNA ile yapılan transfeksiyon sonrası kontrol siRNA ve SVIP siRNA verilen grupların immünofloresan boyama sonuçları karşılaştırıldığında SVIP ve AR ekspresyonları anlamlı derecede azalmıştır. Ubikütin ve USP26 ekspresyonu azalmıştır ve UXT ekspresyonu artmıştır. Western blot analiz sonucuna göre, SVIP siRNA verilen gruplarda SVIP, AR ve USP26 ekspresyonu anlamlı derecede azalmıştır. Ubikütin ekspresyonu azalmış ve UXT ekspresyonu artmıştır. qRT-PCR analiz sonucuna göre, SVIP siRNA verilen gruplarda SVIP ve AR gen ekspresyonları azalmıştır. Ubikütin, USP26 ve UXT gen ekspresyonları artmıştır.
- 8) Bu çalışma ile insan testis embriyonal karsinom hücrelerinde ilk defa SVIP ekspresyonu gösterildi.
- 9) İnsan testis embriyonal karsinom hücrelerinde SVIP ve etkileşimde olduğu UPS proteinlerinin ekspresyonu gösterildi ve bu konu ile ilgili çok az sayıda çalışma olması nedeniyle literatüre önemli bir katkı sağlandı.

Çalışma sonrası öneriler aşağıda sıralanmıştır:

- 1) SVIP siRNA dışında diğer proteinler içinde spesifik siRNA'lar kullanılarak daha ileri çalışmalar yapılabilir.
- 2) Çalışmamızda testis embriyonal karsinom hücre hattı olarak CRL-2073 kullanılmıştır. Farklı testis tümör tiplerinde çalışma denenebilir. Böylece testis tümörleri arasındaki farklılıklar değerlendirilebilir.
- 3) UPS sinyal yolağının embriyonal karsinom üzerindeki etkisi için yolda yer alan daha fazla gen hedeflenebilir ve testisteki ekspresyonlarına bakılabilir ve ileri fonksiyonel çalışmalar yapılabilir.
- 4) Uygulanan siRNA transfeksiyonunun testis doku morfolojisini nasıl etkilediğini göstermek için hayvan deneyleri yapılabilir. Böylece spermatogenez mekanizması ile ilişkili olan proteinlerin testis dokusunda hücrelere nasıl bir morfolojik etki bıraktığı gözlenebilir. Ayrıca uygulanan transfeksiyon sonrası kontrol grubu ile SVIP siRNA verilmiş hayvan gruplarının testislerinin morfolojik olarak (testis hacmi, boyutu, ağırlığı vb.) farklılığı olup olmadığına bakılabilir.
- 5) İlerleyen aşamalarda söz konusu transfeksiyon sonrası hayvanlarda spermilerin morfolojik değerlendirmeleri ve fertilitate çalışmaları planlanabilir.
- 6) Testis tümörlerinde SVIP ve UPS ilişkili proteinlerin etkilenme düzey ve mekanizmaları açığa çıkarıldıktan sonra tümörlere yönelik uygulanan tedavi yöntemlerinin (kemoterapötik çeşitleri, radyoterapi vs.) bu proteinler üzerindeki etkileri araştırılabilir.
- 7) Bu yapmış olduğumuz çalışmanın ileri çalışmalara katkı sağlayabileceğini düşünüyoruz. Testis dokusunun moleküler mekanizmasını tam olarak aydınlatabilmek için gelecekte daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmakla birlikte tez çalışmamız ile bu yolun başlangıcına ışık tutabildiğimiz kanaatindeyiz.

## 7. KAYNAKLAR

- Agarwal, A. (2005). Disruption of spermatogenesis by the cancer disease process. *Journal of the National Cancer Institute. Monographs*, (34), 9-12. <https://doi.org/10.1093/jncimonographs/lgi005>
- Akcan, G., Alimogullari, E., Abu-Issa, R., & Cayli, S. (2020). Analysis of the developmental expression of small VCP-interacting protein and its interaction with steroidogenic acute regulatory protein in Leydig cells. *Reproductive Biology*, 20(1), 88-96. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2020.01.006>
- Alimogulları, E. (2020). *Fare testisinde ve Leydig hücre hatlarında endoplazmik retikulum ile ilişkili protein yıkımının (ERAD) steroidogenez ile ilişkisinin belirlenmesi* [Doktora tezi]. Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi.
- Alimogullari, E., Akcan, G., Ari, O., & Cayli, S. (2022). The determination of the relationship between p97/VCP, small VCP-interacting protein, two ERAD proteins and steroidogenesis in Leydig cell lines. *Molecular Biology Reports*, 49(10), 9159–9170. <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07740-3>
- Alshaer, W., Zureigat, H., Karaki, A. A., Al-Kadash, A., Gharaibeh, L., Hatmal, M. M., Aljabali, A. A. A., & Awidi, A. (2021). siRNA: Mechanism of action, challenges, and therapeutic approaches. *European Journal of Pharmacology*, 905, 174178. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174178>
- Arıcı, A., & Erdemir, F. (2023). A determination of p97/VCP (valosin containing protein) and SVIP (small VCP interacting protein) expression patterns in human testis. *Medicina*, 59(6), 1079. <https://doi.org/10.3390/medicina59061079>
- Ark, M. (2017). *Hücre Kültürü ve Temel Moleküler Biyoloji Protokolleri* (1.Baskı). Ankara: Nobel Tıp Kitabevi.
- Baird, D. C., Meyers, G. J., & Hu, J. S. (2018). Testicular cancer: Diagnosis and treatment. *American Family Physician*, 97(4), 261-268. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29671528>.
- Ballar, P., Zhong, Y., Nagahama, M., Tagaya, M., Shen, Y., & Fang, S. (2007). Identification of SVIP as an endogenous inhibitor of endoplasmic reticulum-associated degradation. *Journal of Biological Chemistry*, 282(47), 33908-33914. <https://doi.org/10.1074/jbc.m704446200>
- Bao, D., Cheng, C., Lan, X., Xing, R., Chen, Z., Zhao, H., Sun, J., Wang, Y., Niu, C., Zhang, B., & Fang, S. (2017). Regulation of p53wt glioma cell proliferation by androgen receptor-mediated inhibition of small VCP/p97-interacting protein expression. *Oncotarget*, 8(14), 23142–23154. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15509>
- Büyükalpelli, R., Erdemir, F., Aşçı, R., & Bolat, M. S. (2015). *Üreter ve Üretranın Hastalık ve Tedavileri*. İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevleri.

- Cancer Council. (2023). *Understanding Testicular Cancer – A Guide for People with Cancer, Their Families and Friends*. Australia: Cancer Council Publications.
- 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/Cell Cycle (Georgetown, Tex. Online)*, 3(4), 420–422. <https://doi.org/10.4161/cc.3.4.814>
- Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *EMBO Journal*, 17(24), 7151–7160. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.24.7151>.
- Cooper, T. G. (2007). Sperm maturation in the epididymis: a new look at an old problem. *Asian Journal of Andrology/Asian Journal of Andrology*, 9(4), 533–539. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7262.2007.00285.x>
- De Gendt, K., Swinnen, J. V., Saunders, P. T. K., Schoonjans, L., Dewerchin, M., Devos, A., Tan, K., Atanassova, N., Claessens, F., Lécureuil, C., Heyns, W., Carmeliet, P., Guillou, F., Sharpe, R. M., & Verhoeven, G. (2004). A Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(5), 1327–1332. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308114100>.
- De Jong, J., Weeda, S., Gillis, A. J. M., Oosterhuis, J. W., & Looijenga, L. H. J. (2007). Differential methylation of the OCT3/4 upstream region in primary human testicular germ cell tumors. *Oncology Reports*, 18(1), 127–132. <https://doi.org/10.3892/or.18.1.127>
- Erzurumlu, Y., & Ballar, P. (2017). Androgen mediated regulation of endoplasmic reticulum-associated degradation and its effects on prostate cancer. *Scientific Reports*, 7(1), 40719. <https://doi.org/10.1038/srep40719>
- Eşrefoğlu, M. (2016). *Özel Histoloji* (2021). 1. Baskı, Pelikan Kitapevi.
- Eşrefoğlu, M. (2022). *Genel Embriyoloji* (2022). 1. Baskı, Pelikan Kitapevi.
- Ferlin, A., Raicu, F., Gatta, V., Zuccarello, D., Palka, G., & Foresta, C. (2007). Male infertility: role of genetic background. *Reproductive Biomedicine Online*, 14(6), 734–745. [https://doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)60677-3](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)60677-3)
- Freshney, R. I. (2000). *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique* (3rd Edition). New York: Wiley-Liss.
- Gartner, L. P. (2013). *Color Atlas and Text of Histology* (6th Edition). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Gerber, D., Wright, H. C., Sussman, R. D., & Stamatakis, L. (2017). Embryonal carcinoma presenting as a calcified solitary testicular mass on ultrasound. *BMJ Case Reports*, bcr-220081. <https://doi.org/10.1136/bcr-2017-220081>

- Güzelgün F., & Aksoy K. (2009). Kodlanmayan RNA'ların işlevi ve tıpta kullanım alanı. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 18(3), 141-155.
- Han, H. (2018). RNA interference to knock down gene expression. In DiStefano, J. (Ed.), *Disease Gene Identification – Methods in molecular biology* (pp. 293–302). New York: Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7471-9\\_16](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7471-9_16)
- Hardell, L., Näsman, A., Ohlson, C. G., & Fredrikson, M. (1998). Case-control study on risk factors for testicular cancer. *International Journal of Oncology*, 13(6), 1299-1602. <https://doi.org/10.3892/ijo.13.6.1299>
- Hatada, I., Morita, S., Kimura, M., Horii, T., Yamashita, R., & Nakai, K. (2008). Genome-wide demethylation during neural differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *Journal of Human Genetics*, 53(2), 185–191. <https://doi.org/10.1007/s10038-007-0228-0>
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., & Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6(10), 986-994. <https://doi.org/10.1101/gr.6.10.986>
- Hiort, O., & Holterhus, P. (2003). Androgen insensitivity and male infertility 1. *Andrology*, 26(1), 16-20. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2605.2003.00369.x>
- Iczkowski, K. A. (2023). Germ cell neoplasms of the testis: Update for 2022. *Seminars in Diagnostic Pathology*, 40(1), 2–21. <https://doi.org/10.1053/j.semmp.2022.07.001>
- Jacobsen, K., Theodorsen, L., & Fossa, S. (2001). Spermatogenesis after unilateral orchiectomy for testicular cancer in patients following surveillance policy. *The Journal of Urology*, 165(1), 93-96. <https://doi.org/10.1097/00005392-200101000-00023>
- James, E. R., Carrell, D. T., Aston, K. I., Jenkins, T. G., Yeste, M., & Salas-Huetos, A. (2020). The role of the epididymis and the contribution of epididymosomes to mammalian reproduction. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(15), 5377. <https://doi.org/10.3390/ijms21155377>
- Johnson, A. E., Orr, B. O., Fetter, R. D., Moughamian, A. J., Primeaux, L. A., Geier, E. G., Yokoyama, J. S., Miller, B. L., & Davis, G. W. (2021). SVIP is a molecular determinant of lysosomal dynamic stability, neurodegeneration and lifespan. *Nature Communications*, 12(1), 513. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20796-8>
- Johnston, D. S., Russell, L. D., Friel, P. J., & Griswold, M. D. (2001). Murine germ cells do not require functional androgen receptors to complete spermatogenesis following spermatogonial stem cell transplantation. *Endocrinology*, 142(6), 2405. <https://doi.org/10.1210/endo.142.6.8317>
- Kierszenbaum, A. L., & Tres, L. (2015). *Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology E- Book*. Amsterdam: Elsevier Health Sciences.

- Kimura, N., Mizokami, A., Oonuma, T., Sasano, H., & Nagura, H. (1993). Immunocytochemical localization of androgen receptor with polyclonal antibody in paraffin-embedded human tissues. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, *41*(5), 671–678. <https://doi.org/10.1177/41.5.8468448>
- Kitaoka, M., & Yamashita, Y. M. (2024). Running the gauntlet: challenges to genome integrity in spermiogenesis. *Nucleus*, *15*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1080/19491034.2024.2339220>
- Köhler, B., Delezoide, A., Boizet-Bonhoure, B., McPhaul, M. J., Sultan, C., & Lumbroso, S. (2007). Coexpression of Wilms' tumor suppressor 1 (WT1) and androgen receptor (AR) in the genital tract of human male embryos and regulation of AR promoter activity by WT1. *Journal of Molecular Endocrinology*, *38*(5), 547–554. <https://doi.org/10.1677/jme-06-0020>
- Krausz, C., Escamilla, A. R., & Chianese, C. (2015). Genetics of male infertility: from research to clinic. *Reproduction*, *150*(5), R159–R174. <https://doi.org/10.1530/rep-15-0261>
- Kwon, Y. T., & Ciechanover, A. (2017). The ubiquitin code in the Ubiquitin-Proteasome system and autophagy. *Trends in Biochemical Sciences*, *42*(11), 873–886. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.09.002>
- Li, L., Xi, Q., Zhang, H., Fei, J., Jiang, Y., Li, L., Liu, R., Wang, R., & Zhang, G. (2020). A novel frameshift mutation in ubiquitin-specific protease 26 gene in a patient with severe oligozoospermia. *Bioscience Reports*, *40*(4), BSR20191902. <https://doi.org/10.1042/bsr20191902>
- Lin, Y., Hsu, T., & Yen, P. H. (2011). Localization of ubiquitin specific protease 26 at blood-testis barrier and near Sertoli cell-germ cell interface in mouse testes. *Andrology*, *34*(5pt2), e368–e377. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2010.01130.x>
- Llinàs-Arias, P., Rosselló-Tortella, M., López-Serra, P., Pérez-Salvia, M., Setién, F., Marin, S., Muñoz, J. P., Junza, A., Capellades, J., Calleja-Cervantes, M. E., Ferreira, H. J., De Moura, M. C., Srbic, M., Martínez-Cardús, A., De La Torre, C., Villanueva, A., Cascante, M., Yanes, O., Zorzano, A., Moutinho, C., & Esteller, M. (2019). Epigenetic loss of the endoplasmic reticulum-associated degradation inhibitor SVIP induces cancer cell metabolic reprogramming. *JCI Insight*, *4*(8). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.125888>
- Ma, Q., Li, Y., Guo, H., Li, C., Chen, J., Luo, M., Jiang, Z., Li, H., & Gui, Y. (2016). A novel missense mutation in USP26 gene is associated with nonobstructive azoospermia. *Reproductive Sciences*, *23*(10), 1434–1441. <https://doi.org/10.1177/1933719116641758>
- Maiolino, G., Fernández-Pascual, E., Arvizo, M. a. O., Vishwakarma, R., & Martínez-Salamanca, J. I. (2023). Male Infertility and the Risk of developing Testicular Cancer: A Critical contemporary Literature review. *Medicina*, *59*(7), 1305. <https://doi.org/10.3390/medicina59071305>

- Moore, K. L., Persaud, T. V. N., & Torchia, M. G. (2018). *The Developing Human-E-Book: Clinically Oriented Embryology*. Amsterdam: Elsevier Health Sciences.
- Nagahama, M., Suzuki, M., Hamada, Y., Hatsuzawa, K., Tani, K., Yamamoto, A., & Tagaya, M. (2003). SVIP Is a Novel VCP/p97-interacting Protein Whose Expression Causes Cell Vacuolation. *Molecular Biology of the Cell*, *14*(1), 262–273. <https://doi.org/10.1091/mbc.02-07-0115>
- Nakkaş, H., Ocal, B. G., Kipel, S., Akcan, G., Sahin, C., Ardicoglu, A., & Cayli, S. (2021). Ubiquitin proteasome system and autophagy associated proteins in human testicular tumors. *Tissue and Cell/Tissue & Cell*, *71*, 101513. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2021.101513>
- Napuri, L. (2016). Cáncer de testículo. Epidemiología y factores de riesgo <https://urologiaperuana.blogspot.com/2016/10/cancer-de-testiculo-epidemiologia-y.html>
- Nijman, S. M., Luna-Vargas, M. P., Velds, A., Brummelkamp, T. R., Dirac, A. M., Sixma, T. K., & Bernards, R. (2005). A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell*, *123*(5), 773–786. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.11.007>
- O'Donnell, L., Smith, L. B., & Rebourcet, D. (2022). Sertoli cells as key drivers of testis function. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *121*, 2–9. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2021.06.016>
- O'Hara, L., & Smith, L. B. (2015). Androgen receptor roles in spermatogenesis and infertility. *Baillière's Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism*, *29*(4), 595–605. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2015.04.006>
- Okada, K., & Fujisawa, M. (2019). Recovery of spermatogenesis following cancer treatment with cytotoxic chemotherapy and radiotherapy. *The World Journal of Men's Health*, *37*(2), 166. <https://doi.org/10.5534/wjmh.180043>
- Oosterhuis, J. W., & Looijenga, L. H. J. (2003). Current views on the pathogenesis of testicular germ cell tumours and perspectives for future research: Highlights of the 5th Copenhagen Workshop on Carcinoma in situ and Cancer of the Testis. *APMIS. Acta Pathologica, Microbiologica Et Immunologica Scandinavica. /APMIS*, *111*(1), 280–289. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0463.2003.1110131.x>
- Ory, J., Blankstein, U., Gonzalez, D. C., Sathe, A. A., White, J. T., Delgado, C., Reynolds, J., Jarvi, K., & Ramasamy, R. (2021). Outcomes of organ-sparing surgery for adult testicular tumors: A systematic review of the literature. *BJUI Compass*, *2*(5), 306–321. <https://doi.org/10.1002/bco.2.77>
- Pakkaya, S. (2020). Ubikutin-proteazom yolağı ve otofaji ilişkisi. *Bioinforange*. [https://www.bioinforange.com/bioinforeviews/biyobilimler/mbg/\\_\\_\\_trashed/](https://www.bioinforange.com/bioinforeviews/biyobilimler/mbg/___trashed/)

- Petersen, P. M., Skakkebaek, N. E., Rorth, M., & Giwercman, A. (1999). Semen quality and reproductive hormones before and after orchiectomy in men with testicular cancer. *The Journal of Urology*, *161*(3), 822–826. [https://doi.org/10.1016/s0022-5347\(01\)61781-6](https://doi.org/10.1016/s0022-5347(01)61781-6)
- Ping, P., Gu, B., Li, P., Huang, Y., & Li, Z. (2014). Fertility outcome of patients with testicular tumor: before and after treatment. *Asian Journal of Andrology/Asian Journal of Andrology*, *16*(1), 107. <https://doi.org/10.4103/1008-682x.122194>
- Reuter, V. E. (2005). Origins and molecular biology of testicular germ cell tumors. *Modern Pathology*, *18*(S2), S51–S60. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800309>
- Rives, N., Perdrix, A., Hennebicq, S., Saïas-Magnan, J., Melin, M., Berthaut, I., Barthélémy, C., Daudin, M., Szman, E., Bresson, J., Brugnon, F., & Bujan, L. (2012). The semen quality of 1158 men with testicular cancer at the time of cryopreservation: results of the French National CECOS Network. *Andrology*, *33*(6), 1394–1401. <https://doi.org/10.2164/jandrol.112.016592>
- Roldan, E. R., & Teves, M. E. (2020). Understanding sperm physiology: Proximate and evolutionary explanations of sperm diversity. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *518*, 110980. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110980>
- Romanuik, T. L., Wang, G., Morozova, O., Delaney, A., Marra, M. A., & Sadar, M. D. (2010). LNCaP Atlas: Gene expression associated with in vivoprogression to castration-recurrent prostate cancer. *BMC Medical Genomics*, *3*(1). <https://doi.org/10.1186/1755-8794-3-43>
- Ross, M. H., & Pawlina, W. (2006). *Histology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Sakai, K., Ito, C., Wakabayashi, M., Kanzaki, S., Ito, T., Takada, S., Toshimori, K., Sekita, Y., & Kimura, T. (2019). Usp26 mutation in mice leads to defective spermatogenesis depending on genetic background. *Scientific Reports*, *9*(1), 13757. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50318-6>
- Schafner, E. D., Thomas, P. A., Ha, S., Wang, Y., Bermudez-Hernandez, K., Tang, Z., Fenyö, D., Vigodner, M., & Logan, S. K. (2018). UXT is required for spermatogenesis in mice. *PloS One*, *13*(4), e0195747. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195747>
- Sharpe, R. M., & Mitchell, R. T. (2013). The downside of ‘inappropriate messaging’: new insight into the development of testicular germ cell tumours in young men? *Journal of Pathology*, *229*(4), 497–501. <https://doi.org/10.1002/path.4167>
- Shen, F., Li, L., Wang, D., Wang, M., Shevock, J. R., Zhao, J., & Shi, S. (2022). A comparison of drying methods on the quality for bryophyte molecular specimens collected in the field. *PloS One*, *17*(11), e0277778. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0277778>

- Shen, W., Azhar, S., & Kraemer, F. B. (2016). Lipid droplets and steroidogenic cells. *Experimental Cell Research*, 340(2), 209–214. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.11.024>
- Smith, L. B., & Walker, W. H. (2014). The regulation of spermatogenesis by androgens. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 30, 2–13. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.02.012>
- Smith, Z. L., Wertz, R. P., & Eggener, S. E. (2018). Testicular cancer. *Medical Clinics of North America*, 102(2), 251–264. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2017.10.003>
- Stouffs, K., Lissens, W., Tournaye, H., Van Steirteghem, A., & Liebaers, I. (2004). Possible role of USP26 in patients with severely impaired spermatogenesis. *European Journal of Human Genetics*, 13(3), 336–340. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201335>
- Stouffs, K., Tournaye, H., Liebaers, I., & Lissens, W. (2009). Male infertility and the involvement of the X chromosome. *Human Reproduction Update*, 15(6), 623–637. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmp023>
- Sullivan, R., & Mieuisset, R. (2016). The human epididymis: its function in sperm maturation. *Human Reproduction Update*, 22(5), 574–587. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmw015>
- Suresh, B., Lee, J., Hong, S., Kim, K., & Ramakrishna, S. (2015). The role of deubiquitinating enzymes in spermatogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(24), 4711–4720. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2030-z>
- Şahar, E. A., & Kirmizibayrak, P. B. (2023). Differential expression and function of SVIP in breast cancer cell lines and in Silico Analysis of its expression and prognostic potential in human breast cancer. *Cells*, 12(10), 1362. <https://doi.org/10.3390/cells12101362>
- Şahin, C. (2021). Gebeliğin farklı dönemlerinde insan plesantasında ubikütün proteazom sistemi protein ekspresyonlarının ve fonksiyonlarının incelenmesi [Doktora tezi]. Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi.
- Thomas, P. A., Schafner, E. D., Ruff, S. E., Voisin, M., Ha, S., & Logan, S. K. (2020). UXT in Sertoli cells is required for blood–testis barrier integrity. *Biology of Reproduction*, 103(4), 880–891. <https://doi.org/10.1093/biolre/iaaa121>
- Tian, H., Huo, Y., Zhang, J., Ding, S., Wang, Z., Li, H., Wang, L., Lu, M., Liu, S., Qiu, S., & Zhang, Q. (2019). Disruption of ubiquitin specific protease 26 gene causes male subfertility associated with spermatogenesis defects in mice. *Biology of Reproduction*, 100(4), 1118–1128. <https://doi.org/10.1093/biolre/iy258>

- Tiwari, S., Siddiqi, S., Zhelyabovska, O., & Siddiqi, S. A. (2016). Silencing of small valosin-containing protein-interacting protein (SVIP) reduces very low density lipoprotein (VLDL) secretion from rat hepatocytes by disrupting its endoplasmic reticulum (ER)-to-golgi trafficking. *Journal of Biological Chemistry/the Journal of Biological Chemistry*, 291(24), 12514–12526. <https://doi.org/10.1074/jbc.m115.705269>
- Tsai, M., Yeh, S., Wang, R., Yeh, S., Zhang, C., Lin, H., Tzeng, C., & Chang, C. (2006). Differential effects of spermatogenesis and fertility in mice lacking androgen receptor in individual testis cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(50), 18975–18980. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608565103>
- Tufan, A. (Ed). (2019). *Işık Mikroskopik Görşeller ve Çizimli Anlatımlarla Histoloji Laboratuvar Kitabı*. Ankara: Nobel Tıp Kitapevleri.
- University of Leeds. (2004). Male reproductive: The Histology Guide. <http://histology.leeds.ac.uk/male/>
- Ushida, H., Kawakami, T., Minami, K., Chano, T., Okabe, H., Okada, Y., & Okamoto, K. (2011). Methylation profile of DNA repetitive elements in human testicular germ cell tumor. *Molecular Carcinogenesis*, 51(9), 711–722. <https://doi.org/10.1002/mc.20831>
- Van Der Zwan, Y. G., Stoop, H., Rossello, F., White, S. J., & Looijenga, L. H. J. (2013). Role of epigenetics in the etiology of germ cell cancer. *International Journal of Developmental Biology*, 57(2-3-4), 299-308. <https://doi.org/10.1387/ijdb.1300171l>
- Walker, W. H., Easton, E., Moreci, R. S., Toocheck, C., Anamthathmakula, P., & Jeyasuria, P. (2015). Restoration of spermatogenesis and male fertility using an androgen receptor transgene. *PloS One*, 10(3), e0120783. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120783>
- Wang, J., Zhao, X., & Hong, R. (2020). USP26 deubiquitinates androgen receptor (AR) in the maintenance of sperm maturation and spermatogenesis through the androgen receptor signaling pathway. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 29(10), 1153–1160. <https://doi.org/10.17219/acem/123355>
- Wang, P. J., McCarrey, J. R., Yang, F., & Page, D. C. (2001). An abundance of X-linked genes expressed in spermatogonia. *Nature Genetics*, 27(4), 422-426. <https://doi.org/10.1038/86927>
- Wang, R., Yeh, S., Tzeng, C., & Chang, C. (2009). Androgen receptor roles in spermatogenesis and fertility: Lessons from testicular cell-specific androgen receptor knockout mice. *Endocrine Reviews*, 30(2), 119–132. <https://doi.org/10.1210/er.2008-0025>
- Wang, Y., Ballar, P., Zhong, Y., Zhang, X., Liu, C., Zhang, Y., Monteiro, M. J., Li, J., & Fang, S. (2011). SVIP induces localization of p97/VCP to the plasma and lysosomal membranes and regulates autophagy. *PloS One*, 6(8), e24478. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024478>

- Williams, D. H., Karpman, E., Sander, J. C., Spiess, P. E., Pisters, L. L., & Lipshultz, L. I. (2009). Pretreatment semen parameters in men with cancer. *The Journal of Urology*, *181*(2), 736-740. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2008.10.023>
- Wosnitzer, M. S., Mielnik, A., Dabaja, A., Robinson, B., Schlegel, P. N., & Paduch, D. A. (2014). Ubiquitin Specific protease 26 (USP26) expression analysis in human testicular and extragonadal tissues indicates diverse action of USP26 in cell differentiation and tumorigenesis. *PloS One*, *9*(6), e98638. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098638>
- Wu, J., Peng, D., Voehler, M., Sanders, C. R., & Li, J. (2013). Structure and expression of a novel compact myelin protein – Small VCP-interacting protein (SVIP). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *440*(1), 173-178. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.09.056>
- Yazici, S., Del Biondo, D., Napodano, G., Grillo, M., Calace, F. P., Prezioso, D., Crocetto, F., & Barone, B. (2023). Risk factors for testicular cancer: environment, genes and infections – Is it all? *Medicina*, *59*(4), 724. <https://doi.org/10.3390/medicina59040724>
- Yılmaz E., & Yuvaç, E. (2022). *Testis Kanseri – Tüm Yönleriyle*. Ankara: Hipokrat Yayıncılık.
- Zhang, J., Tian, H., Huo, Y., Zhou, D., Wang, H., Wang, L., Zhang, Q., & Qiu, S. (2009). The expression of Usp26 gene in mouse testis and brain. *Asian Journal of Andrology/Asian Journal of Andrology*, *11*(4), 478-483. <https://doi.org/10.1038/aja.2009.31>
- Zhang, Q., Zhang, X., Zhang, Z., Lu, W., Liu, L., Li, G., Cai, Z., Gui, Y., & Chang, C. (2011). Identification of testosterone-/androgen receptor-regulated genes in mouse Sertoli cells. *Asian Journal of Andrology/Asian Journal of Andrology*, *14*(2), 294-300. <https://doi.org/10.1038/aja.2011.94>
- Zhou, Q., Wu, Q., Xia, X., & Xu, H. (2016). Androgen receptor gene polymorphisms and male infertility. *PubMed*, *22*(10), 928-931. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29278476>