

T.C
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

EMBRYO ORGANOGENEZİ SIRASINDA TİMUSTAKİ
NECTİN-2 VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

Tezi Hazırlayan
Derya AKKUŞ

Tezi Yöneten
Yrd.Doç.Dr. Mehmet Fatih SÖNMEZ

Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi

Ocak-2011
KAYSERİ

T.C
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**EMBRYO ORGANOGENEZİ SIRASINDA TİMUSTAKİ
NECTİN-2 VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI**

Tezi Hazırlayan
Derya AKKUŞ

Tezi Yöneten
Yrd.Doç.Dr. Mehmet Fatih SÖNMEZ

Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
TSY-09-776 nolu proje ile desteklenmiştir.**

Ocak-2011
KAYSERİ

Yrd.Doç.Dr. Mehmet Fatih SÖNMEZ danışmanlığında **Derya AKKUŞ** tarafından hazırlanan “**Embriyo Organogenezi Sırasında Timustaki Nectin-2 Varlığının Araştırılması**” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Histoloji-Embriyoloji** Anabilim Dalı **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

07/01/2011

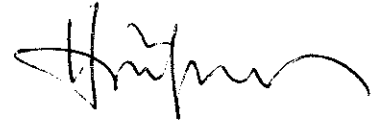
JÜRİ

İmza

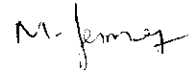
Başkan : Prof.Dr.Saim ÖZDAMAR



Üye : Prof.Dr.Harun ÜLGER



Üye : Yrd.Doç.Dr. Mehmet Fatih SÖNMEZ (Danışman)



ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun/...../..... tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../2011

Enstitü Müdürü

Prof.Dr.Saim ÖZDAMAR

TEŞEKKÜR

Bu tez konusunun seçilmesi, planlanması ve yürütülmesinde bana destek olan, yardımlarını esirgemeyen tez danışmanım sayın Yrd. Doç. Dr. Mehmet Fatih SÖNMEZ'e, yüksek lisans eğitimim boyunca hoşgörü ortamı içerisinde bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız sayın Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR ve bölüm hocalarımdan sayın Prof. Dr. Birkan YAKAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Her konuda desteğini benden esirgemeyen, varlığımı borçlu olduğum canım annem ve babama, kız kardeşlerim İpek ile Ezgi'ye, yardım ve anlayışından dolayı Ersin KARABULUT'a teşekkür ederim.

Bu çalışmayı yaparken boyama yöntem ve teknikleri için bilgisini ve yardımını esirgemeyen Araş. Gör. Arzu YAY'a, çalışmamın deneysel bölümünde katkısını esirgemeyen Araş. Gör. Esra BALCIOĞLU, Araş. Gör. Dr. Funda SELVİ, Araş. Gör. Dr. Yasemin SAVRANLAR'a, yüksek lisans öğrencisi arkadaşım Tuğba RIHTIM, Ayşegül Burçin TÜRKMEN ve Firuze BAYATLI'ya, ayrıca tüm Sağlık Bilimleri Enstitüsü ve DEKAM çalışanlarına teşekkür ederim.

EMBRIYO ORGANOGENEZİ SIRASINDA TİMUSTAKİ NECTİN-2 VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Timus, T lenfositlerin gelişimi ve olgunlaşması için gerekli mikroçevreyi sağlayan primer lenfoid organdır. Nectin'ler Ca^{+2} -bağımsız immunoglobulin-benzeri hücre adezyon molekülüdür. Bu çalışmanın amacı, gelişimin farklı dönemlerindeki sıçan fetus timusunda nectin-2 ekspresyonunun araştırılmasıdır.

Çalışmada 24 adet erişkin wistar-albino cinsi dişi sıçan kullanıldı. Çiftleşme için dişi sıçanlar her sabah vajinal smear ile test edildi ve estrus döngüsünün proestrus aşamasında olanlar erkek sıçanların kafesinde 1:1 eşleştirildi. Ertesi gün vajinal plak belirlenen sıçanlar 0,5 günlük gebe olarak kabul edildi. Sıçanlar ketamin anestezi altında dekapite edildi ve gebeliklerinin 14, 16, 18 ve 20. günlerde fetuslar çıkarıldı. Fetuslar parafin bloklara gömüldü. Genel histolojik yapıyı görmek amacıyla kesitler hematoksilen-eozin ile boyandı. Nectin-2, fetal timusda tavşan poliklonal antikor ve streptavidin-biotin peroksidaz tekniği kullanılarak immunohistokimyasal olarak belirlendi.

Timus taslağı gebeliğin 14 ve 16. gününde bağ dokusu kapsülü ile çevrelenmişti. Gebeliğin 18. gününde bağ dokusu kapsülünün oluşturduğu septa dokuyu tam olmayan lobüllere ayırdı. Lobulasyon gebeliğin 20. gününde daha belirgindi. Nectin-2 immunreaktivitesi gebeliğin 14. ve 20. gününde orta yoğunlukta, gebeliğin 16. ve 18. gününde zayıf reaksiyon gösterdi.

Sonuç olarak timopoezis sırasında hücre-hücre etkileşimlerinde Nectin-2'nin de katkısı olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Timus gelişimi, Nectin-2, Sıçan, İmmunohistokimya.

INVESTIGATING OF NECTIN-2 EXPRESSION IN THE RAT THYMUS DURING ORGANOGENESIS OF EMBRYO

ABSTRACT

The thymus is a primary lymphoid organ which provides the essential microenvironment of T lymphocytes development and maturation. Nectins are Ca^{2+} -independent Ig-like cell adhesion molecules. The purpose of the study is to investigate of nectin-2 expression in thymus which is different stages of development in the rat fetus.

In study, 24 adult female Wistar-albino pregnant rats were used. For mating, female rats were tested with a vaginal smear every morning and those shown to be in the proestrus stage of their estrus cycle were paired 1:1 in the home cages of male rats. The next day, female rats were designated vaginal plaque that day were considered as a gestation day 0,5 (GD 0,5). The rats were decapitated under ketamine anesthesia and its fetus was removed in 14, 16, 18, and 20 on days. Embryos were embedded in parafin blocks. General histological structure in order to see the sections were stained with hematoxylin-eosin. Nectin-2 was detected immunohistochemically in the fetal thymus using a rabbit polyclonal antibody and the streptavidin–biotin peroxidase technique.

The thymic primordium is surrounded by a connective tissue capsule at GD14 and GD16. At GD18, the connective tissue capsule has formed septa, which subdivide the tissue into incomplete lobules. Lobulation was more evident at GD20. Nectin-2 immunoreactivity was observed at medium-density in GD14 and GD20, was observed weak-density in GD16 and GD18.

As a result it has thought that nectin-2 is contribution to cell-cell interaction during thymopoiesis.

Key Words: Thymus development, Nectin-2, Rat, Immunohistochemistry.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	I
TEŞEKKÜR	II
ÖZET	III
ABSTRACT	IV
TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ.....	VI
İÇİNDEKİLER	V
KISALTMALAR.....	VII
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. TİMUS.....	3
2.1.1. Embriyolojisi.....	4
2.1.2. Anatomisi	7
2.1.3. Histolojisi	8
2.1.4. Timusun Fonksiyonu ve İmmünolojik Önemi	13
2.2. NECTİN.....	14
2.2.1. Nectin’lerin Moleküler Özellikleri	16
2.2.2. Nectin’lerin Hücre-Hücre Adezyon Aktivitesi.....	17
2.2.3. Nectin’lerin Temel Aktiviteleri	18
2.2.4. Nectin’in Doku Dağılımı	19
3.GEREÇ VE YÖNTEM	25
3.1. EMBRİYOLARIN VE DOKULARIN ELDESİ	25
3.2. İMMUNOHİSTOKİMYA UYGULAMA.....	28
4.BULGULAR	30
5.TARTIŞMA VE SONUÇ.....	38
6.KAYNAKLAR	43
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. Timusun gelişimi.....	4
Şekil 2.2. A. İnsan timus bezi B. Fare timus bezi anatomik konumu	7
Şekil 2.3. A.Timus histolojik kesiti..	8
Şekil 2.4. Nectin, Afadin ve Necl's'nin moleküler yapısı.....	17
Şekil 2.5. Nectin'ler, Necl's ve virüs arasındaki homofilik ve heterofilik <i>trans</i> -etkileşimler. B. Nectin'in hücreler arası adezyon aktivitesi.	18
Şekil 2.6. TJs kompleksi oluşumunda nectin-bağlı sinyal ve Par-3 hareketi	20
Şekil 2.7. Hipokampusün CA3 bölgesindeki piramidal hücre dendritleri ve yoğun lif terminalleri arasındaki sinapslarda, PJs ve SJs komplekslerinin oluşumu.....	23
Şekil 2.8. A. Testisin seminifer epitelyumundaki Sertoli hücre-Sertoli hücre ve Sertoli hücre-spermatid bağlantıları. B. Sertoli hücre-spermatid bağlantısındaki Sertoli hücresindeki nectin-2 ve spermatiddeki nectin-3 yapılarının hetero- <i>trans</i> - dimer oluşumu.	24
Tablo 3.1. Işık mikroskobu doku hazırlama tekniği.....	26
Tablo 3.2. Hematoksilen-Eozin boyama tekniği.....	27
Tablo 3.3. İmmünohistokimya boyama tekniği	29
Şekil 4.1. 14 günlük sıçan timus görüntüsü (H+E, X40).	32
Şekil 4.2. 14 günlük sıçan timusunda nectin-2 ekspresyonu (siyah ok) (İmmünperoksidaz, X40)..	32
Şekil 4.3. 16 günlük sıçan timus görüntüsü (H+E, X10)..	33
Şekil 4.4. 16 günlük sıçan timusunda nectin-2 ekspresyonu (siyah ok) (İmmünperoksidaz, X20)..	33
Şekil 4.5. 16 günlük sıçan timusunda nectin-2 ekspresyonu (İmmünperoksidaz, X40)..	34
Şekil 4.6. 18 günlük sıçan timus lobül (L), septa (S) ve bağ dokusu kapsülü (ok) görüntüsü (H+E, X10).	34
Şekil 4.7. 18 günlük sıçan timusunda nectin-2 ekspresyonu (İmmünperoksidaz, X10)..	35
Şekil 4.8. 18 günlük sıçan timusunda nectin-2 ekspresyonu (İmmünperoksidaz, X40)..	35
Şekil 4.9. 20 günlük sıçan timus korteks(K) ve medulla(M) görüntüsü (H+E, X10)..	36
Şekil 4.10. 20 günlük sıçan timusunda nectin-2 ekspresyonu (siyah ok) (İmmünperoksidaz, X20)	36
Şekil 4.11. 20 günlük sıçan timusunda nectin-2 ekspresyonu (İmmünperoksidaz, X40).	37
Şekil 4.12. 20 günlük sıçan timusu negatif kontrol (İmmünperoksidaz, X10).....	37

KISALTMALAR

AJs	: Adherens junctions
BTB	: Blood-testes barrier
CAMs	: Cell adhesion molecules
cTECs	: Thymic cortical epithelial cells
DAB	: Diaminobenzidin
DSs	: Desmozomlar
E-cadherin	: Epithelial cadherin
F-actin	: Actin filament-binding
GEF	: Guanin nucleotide exchange factor
H+E	: Hematoksilen-eozin
HSV	: Herpes simplex virüs
JAMs	: Junctional adhesion molecules
MDCK	: Madin Darby Canine Kidney
mTECs	: Thymic medullary epithelial cells
Necls	: Nectin-like molecules
N-cadherin	: Neural cadherin
NK	: Naturel killer
PVR	: Poliovirus receptor
PJs	: Puncta adherentia junctions
SJs	: Synaptic junctions
TECs	: Thymic epithelial cells
TCR	: T-cell receptor
TJs	: Tight junctions

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Organizmayı oluşturan hücrelerin çevresinde çözünebilir moleküllerden oluşan karmaşık bir karışım, diğer hücreler ve çözünebilir olmayan doku matriksi yer alır. Hücrenin bulunduğu bu çevreyi oluşturan ekstrasellüler sıvının bileşimi, diğer hücrelerin davranışları, şekilleri, kimyasal yapıları sürekli değişir. Doku ve hücrelerin bütünlüğünün ve işlevinin korunabilmesi için hücrenin çevresindeki değişimleri algılaması ve uygun cevaplar vermesi gerekir. Hücre bu olayı, yüzeyinde eksprese edilen hücre adezyon molekülleri aracılığı ile gerçekleştirir. Adezyon molekülleri, birbirleriyle veya ekstrasellüler sıvıdaki moleküllerle etkileşim gösteren, hücre-hücre ve hücre-ekstrasellüler matriks bağlantısını sağlayan protein molekülleridir. Hücre adezyon molekülleri hücre aktivasyonu, göçü, büyümesi, farklılaşması ve ölümü gibi bir çok olayın düzenlenmesinde rol oynarlar. Hücre adezyon molekülleri, heterojen bir reseptör grubudur ve embriyonel dönemde hücre bölünmesinde, hücre göçünde ve hücrelerin farklılaşmasında etkilidirler. Adezyon molekülleri sayesinde gerçekleştirilen hücre-hücre ve hücre-matriks adezyonu ile hücreler birbirleri ve çevreleri ile iletişim kurarlar. Bu nedenle doku yapısının oluşturulmasında adezyon moleküllerinin rolü hücre biyolojisi çalışmaları için önemlidir (1).

Nectin, Ca^{+2} -bağımsız Ig-benzeri hücre adezyon molekülüdür ve nectin-1, nectin-2, nectin-3, nectin-4 olmak üzere dört üyeden oluşur. Nectin-1, nectin-2 ve nectin-3 aynı zamanda her yerde bulunabilen epitelyal hücreler, nöronlar ve fibroblastları içeren çeşitli hücre tiplerinde bulunmaktadır. Nectin-2 ve nectin-3 cadherinlerin eksprese

edilmediği kan hücreleri (B hücreleri ve monositler) ve spermatidlerde eksprese edilirken, insanda nectin-4 başlıca plasentada eksprese edilmektedir (2).

Timus kemik iliği kaynaklı T hücrelerinin hem fetal hem de yetişkin hayatta farklılaştığı bağışıklık sisteminde görev alan önemli bir lenfoid organdır. Bu nedenle bağışıklık sisteminin en önemli organlarından ve komuta merkezlerinden biridir. Timus üç germ yaprağından (endoderm, mezoderm ve ektoderm) köken alır. Timus bağ dokusundan yapılmış ince bir kapsülle çevrilmiştir. Bu kapsül organı lob ve lobüllere ayırır. Her lobül periferde korteks, merkezde medulla adı verilen iki bölgeye sahiptir. Timusun korteks ve medullasında başta timosit adı verilen T hücreleri olmak üzere lenfoblastlar, epitelyal retiküler hücreler, makrofajlar, monositler, interdigitating hücreleri ve medullaya özgü Hassal cisimcikleri yer almaktadır. Timus korteksinde Tip I, Tip II ve Tip III, medullasında Tip IV, Tip V ve Tip VI olmak üzere toplam altı farklı epitelyal retiküler hücre bulunmaktadır. Korteksteki Tip I epitelyal retiküler hücreler, bu hücrelerin bazal laminası, perivasküler bağ dokusunun makrofajları, damar duvarı endoteli ve bazal laminası ile birlikte kan-timus bariyerini oluşturur. Tip II epitelyal retiküler hücreler birbirleriyle desmozomları vasıtasıyla bağlantı kurar. Tip III ve Tip IV epitelyal retiküler hücreler, Tip I epitelyal retiküler hücreler gibi sıkıca birbirlerine tutunarak korteks-medulla sınırında bir bariyer oluşturur. Tip V epitelyal retiküler hücreler medulla boyunca yayılarak birbirine desmozomlar aracılığıyla tutunup lenfositlerin yerleştiği bir ağ oluşturur. Tip VI epitelyal retiküler hücreler ise bir araya gelip konsantrik tabakalar oluşturarak Hassal cisimcikleri'ni yaparlar. Tip VI epitelyal retiküler hücrelerde desmozomlar çok olabilir ve hücre yüzeyinin büyük bir kısmını kaplayabilirler (3).

Korteks ve medullada yer alan bağlantı komplekslerinde ve kan-timus bariyerinde nectin-2 molekülünün varlığı bugüne kadar yapılan çalışmalarda henüz ortaya konulmamıştır. Bu nedenle çalışmada, gebe sıçanların embriyolarının timus dokusunun gelişiminde hücre adezyon molekülü olan nectin-2 dağılımının immünohistokimyasal olarak gösterilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Bağıışıklık sistemi tüm vücuda yayılmış, birincil işlevi organizmayı mikroorganizmaların ve yabancı maddelerin yayılmasından ve zararlı etkilerinden korumak olan çeşitli hücre ve yapılardan oluşur. Bağıışıklık yanıtında yer alan başlıca yapılar timus, dalak ve lenf düğümü gibi lenfoid organlardır. Esas olarak nodüler yığılmayla oluşan ve lenfoid nodül adı verilen daha küçük lenfoid doku birikimleri sindirim (tonsiller, Peyer plakları, appendiks), solunum, boşaltım ve üreme sistemleri mukozalarında mukoza-ilişkili lenfoid dokuyu oluşturur. Geniş lenfoid yapı dağılımı ve lenfoid hücrelerin kan, lenf ve bağ dokularındaki sabit dolaşımı immün yetenekli hücreler yardımıyla vücut için etkin bir gözetim ve savunma sistemi oluşturur. Tüm lenfositler kemik iliğinden köken alır. Fakat T lenfositler ileri olgunlaşmalarını timusta gerçekleştirirken, B lenfositler kemik iliğini olgun hücreler olarak terk eder. Bu nedenle kemik iliği ve timus birincil (primer) veya merkezi (santral) lenfoid organlar olarak tanımlanır. Lenfositler bu organlardan, kana ve çoğalıp farklanmalarını tamamladıkları periferik (sekonder) lenfoid organlara (dalak, lenf düğümü, lenfoid nodüller, tonsiller, appendiks, ileumun peyer plakları) göç ederler (4).

2.1. TİMUS

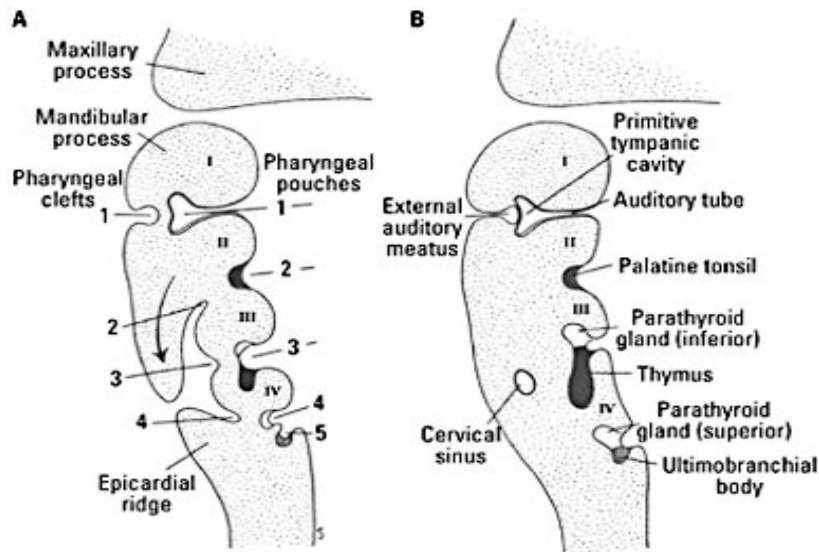
Timus T hücre öncüllerinin olgunlaştığı ve kendi özel fonksiyonel yeterliliğini kazandığı primer lenfoid organdır (5,6). T hücrelerinin olgunlaşması stromal hücrelerin birçok farklı türlerinin fiziksel ve fonksiyonel etkileşimine bağlıdır (5). Timik mikroçevre korteks ve medullanın her ikisinde epitelyal retiküler hücrelerin oluşturduğu

bir ağıdır. Fibroblastlar, makrofajlar ve interdigitasyon yapan hücreler gibi non-epitelyal stromal hücreler bu ağda bulunur (6).

2.1.1. Embriyolojisi

Timus, kemik iliğinden dolaşım ile gelen progenitör hücrelerin T lenfositlere farklılaştığı primer bir lenfoid organ olmasına rağmen yapısı diğer lenfoid organlardan farklıdır. Bu farklılık, timusun embriyonel gelişiminden kaynaklanmaktadır. Sekonder lenfoid organlar mezodermal kökenli iken timus üç germ yaprağından (endoderm, mezoderm ve ektoderm) köken alır (4,6,7). Bu gelişim sürecinde ilk olarak timositlerin yokluğunda epitelyal-mezenkimal etkileşimler gerçekleşir, böylece sonraki basamaklarda timositler ve mezenkimal hücreler arasında karşılıklı etkileşim gözlenir (7,8). Timusun oluşumu sırasında epitelyal-mezenkimal etkileşimler devam eder. Timus organogenezinin farklı aşamalarında mezenkimal hücrelerin rol oynadığı kanıtlanmıştır (9).

Timus insanda embriyolojik olarak intrauterin hayatın altıncı haftasında üçüncü faringeal cep endoderminden gelişerek ortaya çıkar (10,11). Bazen üçüncü faringeal cep ile birlikte, dördüncü faringeal cep endodermide gelişime katılır (6,12). Bu gelişmeyi paratiroid bezle birlikte yapan timusun gelişimine, servikal sinüsün ektodermal yaprağının da katıldığı belirtilmektedir (Şekil 2.1). Timus gelişimin sekizinci haftasında toraksta kalıcı bir pozisyon almak için aşağı doğru hareket eder (11).



Şekil 2.1. Timus'un gelişimi (13).

Elektron mikroskobu incelemelerinde sekizinci gebelik haftasında timus taslağının hemen hemen tamamının epitelyal hücrelerden yapıldığı görülmüştür. Bu dönemde çevrede ve ortada yerleşim gösteren iki tip epitelyal hücre bulunmaktadır. Erken timus taslağında faringeal kese epiteline benzer hücrelerinde görülebileceği bildirilmektedir. Bu hücreler dokuzuncu gebelik haftasında da seyrek olarak görülebilmekle birlikte, normal timusta ortadan kalkar. Dokuzuncu gebelik haftası boyunca epitelyal timus için de bazofilik mezenkimal hücreler ve lenfoid hücreler görülmeye başlar. Timustaki T-lenfosit öncüsü hücreler, dokuzuncu haftada timus epitel ağı içindeki kapiller etrafında birikmeye başlamaktadır. 9-12. gebelik haftasında, korteks ve medulla ayrımının olmadığı dönemde, lenfositler tüm organa dağılmıştır. Bu lenfoid hücrelerin hem elektron mikroskobik, hem fonksiyonel incelenmesinde immatürite işaretleri taşıdığı gösterilmiştir (12).

Epitelyal timus taslağı, nöral krestten geliştiği sanılan bir mezenkim ile sarılıdır (14). Bu faringeal bölgenin mezoektodermi, timusun bağ dokusunu oluşturur ve 9-12. gebelik haftasında timusun periferi mezenkimal septumlarla bölünmeye başlar. On yedinci gebelik haftasında, bu septumlar kortikomedullar bölgeye uzanır ve dallanarak genişler (12).

Korteks ve medulla sınırında bulunan küçük damarların çevresinde doku boşlukları yer alır. Bu boşluklar, timik epitelyal alan ile perifer arasında, hücre değişim yerini oluşturur. Elektron mikroskobik olarak, tüm perivasküler boşluklar timik epitelyal hücreler ve onların bazal laminaları ile kuşatılmıştır. Timusta olgunlaşan T hücreler, timik epitelyal alanda perivasküler alana ya da ters yöne diapedez yolu ile geçer. Fetal yaşamda görülen hemopoez, özelliklede granulopoez bu perivasküler alanlarda gerçekleşir. Postnatal dönemde ise bu bölgeler çok sayıda lenfosit ve diğer gezici hücreleri içerir. Postnatal timusta görülen, histogenezi tartışmalı Hassal cisimciklerinin öncüleri, 10-12. haftalarda timus lobüllerinin orta kısmında belirmeye başlar. Hassal cisimciklerinin, iki ya da üç ektodermal hücrenin plak şeklinde dizilmesi ile oluşmaya başladığı bildirilmektedir. Hassal cisimciklerinin oluşumu fetal ve postnatal dönem boyunca kesintisiz olarak devam eder. Bundan dolayı timus içinde farklı gelişim evrelerinde Hassal cisimciklerini görmek mümkündür. 14. gebelik haftasında korteks ve medulla ayrımı belirgin hale gelmeye başlar. Bu farklılaşma 17. haftada tamamlanır (12).

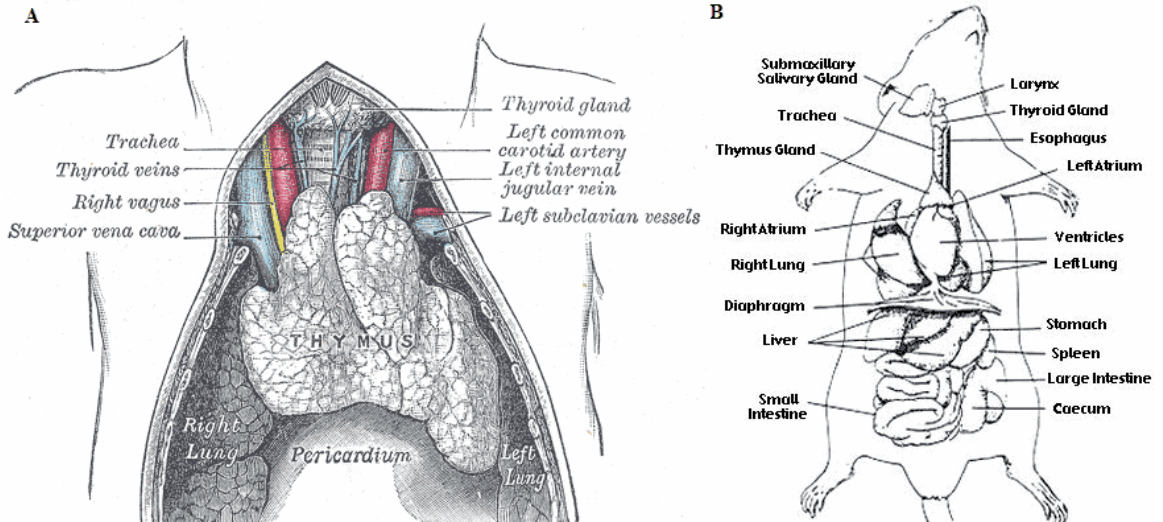
Timus sıçanlarda ve farelerde üçüncü faringeal cep ve üçüncü faringeal yarık endoderminden paratiroid bezi ile birlikte gelişmeye başlar. Gebeliğin 9,5 gününde endodermal ve ektodermal germ tabakaları fiziksel temas kurar. Böylece 10,5-11,5 günleri arasında üçüncü faringeal cep endodermi ektodermal hücreleri kaplar (14). Timik epitelyal hücrelerin sadece endodermal kökenli değil ektodermal kökenli olduğu kanıtlanmıştır (15,16). Endodermal epitelin önemine ek olarak, timus taslağının düzenli oluşumunda faringeal ark mezenkimi önemli rol oynar. Mezenkimal hücrelerin bazıları üç kaudal faringeal ark (3,4 ve 6) içinde nöral krest hücrelerinden köken alır (17). Bu hücreler yalnızca aortik arkus çevresinde değil aynı zamanda büyük sefalik arterlerin hücreleri ve pulmoner aorta septumu çevresinde timus ve paratiroid bez dokusunun her ikisinin de dokularıyla bağlantılıdır (18). Gebeliğin 10. gününde timik taslaklar kalbin üzerinde, vücudun orta hattından ventral bir göçün başlamasıyla lateral bir şekilde oluşmaya başlar (6). 10-11. günlerde timus ince duvarlı bir lümen vasıtasıyla farinkse bağlıdır (14). 11. günde Whn ve Pax 1 transkripsiyon faktörleri eksprese edilmiştir (19). Böylece nöral krest'ten türemiş mezenkimal hücreler ve epitelyal hücreler arasındaki aralıksız etkileşim sonucu timus lobulasyonu indüklenir (6). Ayrıca timus kapsülü 11. günde mezenkimal hücrelerinden türemeye başlar (7). Gebeliğin 12. gününde kortikal ve medullar epitelyal hücreleri farklılaşmaya başlarken, 11-12. günlerde epitelin kalınlaştığı lümenin ise farinks ile bağlantısının 13. güne kadar devam ettiği görülmüştür (14). 14. günde korteks ve medulla şekillenmeye başlar. 16. günde ise timik stroma timositlerin seçici gelişimi oluşmaya başlar (6).

Ergin farelerde, progenitör T hücreleri kemik iliğinden türer ve göç ederek korteks medulla sınırından timik stromaya giriş yapar. Bu hücreler subkapsüler korteksten, korteksin derinliklerine, daha sonra kortikomedullar sınırdan medullaya geçerek farklılaşır. T hücreleri farklılaşma esnasında bu mikroçevre içinde timositler ve timik hücreler ile etkileşim gösterir (6). Timik stroma tarafından timositlerin gelişim hızı, stromal hücrelerdeki timositler yüzeyindeki T-hücre reseptörleri (TCR) ve major histokompatibilite kompleksi (MHC) arasındaki etkileşim ile belirlenir. Böylece T hücrelerinin gelişiminde korteks epitel hücrelerindeki pozitif seçim (20,21), medulladaki epitel ve interdigitasyon yapan retiküler hücrelerinin negatif seçimi bu şekilde gerçekleşir (22). 13 günlük fare fetus timusunun, 30-33 günlük kobay fetus timusuna görünüm açısından benzerlik gösterdiği ve her iki türün bu dönemdeki fetuslarının esas yapısının farklılaşmamış epitelyal hücreler ve büyük lenfoblastlardan

ibaret olduğu anlaşılmıştır. Erişkinlerde epitelyal hücrelerdeki mitoz olayına kortekste pek rastlanmamasına rağmen medullada gözlenir. İnsan timusunda da buna benzer bulgular işaret edilmiştir (23). Fare ve kobay timusları arasındaki en belirgin fark, Hassal cisimcikleri'nin gelişimidir. Kobaylarda Hassal cisimcikleri büyük, karmaşık ve kaba bir yapıya sahiptir; farelerde ise Hassal cisimcikleri dağınık ve az gelişmiştir (24). Farelerde, fetal dönemde Hassal cisimciklerinin gelişmediği hatta postnatal dönemde de çok nadiren bulunduğu bildirilmiştir (23).

2.1.2. Anatomisi

Timus göğüs boşluğunda, mediastenumun içerisinde, sternumun arkasında, trakea ve perikardın önünde yerleşmiş lenfoid sistemin esas organıdır. Doğumda 10-15 gr ağırlığı, pubertede 30-40 gr'a kadar çıkar. Puberteden sonra atrofiye uğrar ve ağırlığı 10 gr'a kadar düşer. Bu dönemden sonra timus involusyonu başlar ve dokunun birçok kısımlarında fibröz ve adipöz doku yer alır (25) (Şekil 2.2). Fakat, timus hiçbir zaman tamamen ortadan kalkmaz, mediastende küçük bir yastıkçık şeklinde kalır (12).



Şekil 2.2. A. İnsan timus bezi (26). B. Fare timus bezi anatomik konumu (27).

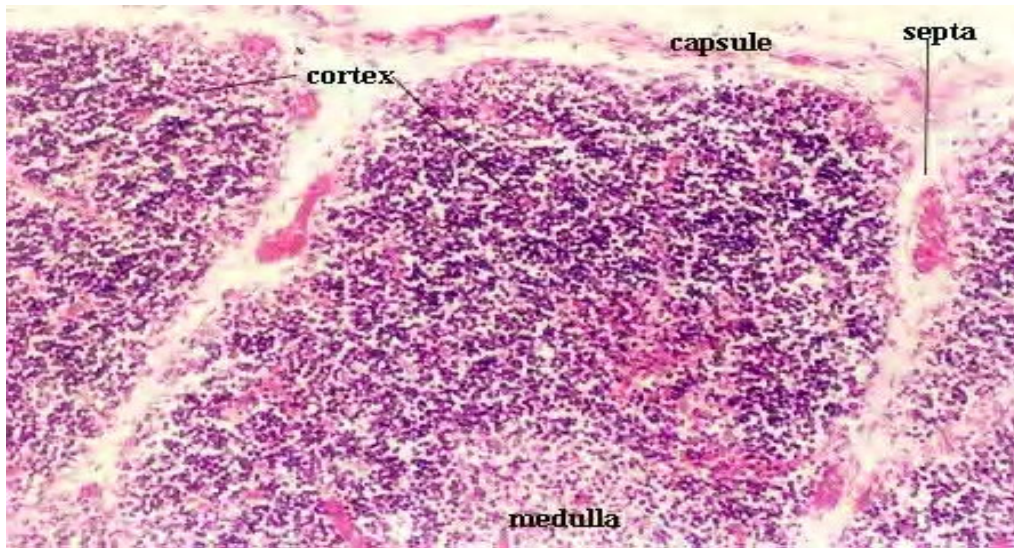
Anatomik olarak timus parankima içinde bulunan, onu lob ve lobüllere bölen bağ dokusundan bir kapsüle sahiptir. Her lobül korteks adı verilen periferde, koyu renkli bir bölge ve medulla adı verilen merkezde, açık renkli bir bölgeye sahiptir. Korteks küçük lenfositlerden zengin olduğu için medulladan daha koyu boyanır (4).

Gelişmesi tamamlanmış timus, pembe renkli olup, formalin tesbitinden sonra gri renk alır. Doğumdan sonra timus hemen hemen tamamen gelişmiştir ve fonksiyoneldir.

Puberteye kadar T lenfositler timusta farklılaşır ve çoğalırlar. Puberteyle birlikte T hücre farklılaşması ve çoğalmasına duyulan ihtiyaç azaldığından, timusun lenfoid hücreleri yerini yağ hücrelerine bırakır, timus küçülür. Bu fizyolojik olaya timus involusyonu denir. İnvolusyondan geriye kalan timus dokusu yinede fonksiyoneldir. Yüksek oranda T lenfosit proliferasyonuna ihtiyaç duyulduğunda aktivitesi artar (3).

2.1.3. Histolojisi

Timus çevresi dıştan fibröz kapsülle çevrili iki lobdan oluşmuştur ve bu iki lob gevşek bir bağ dokusu ile birbirine tutunmuştur (28). Kapsül, organın içine septum adı verilen bir takım bölmeler gönderir. Kapsül ve septumlarda kan damarları, efferent lenf damarları ve sinirler bulunur, afferent lenf damarları bulunmaz (3). Gevşek bağ dokusuna sahip bu septumlar ile timus birbirleriyle bağlantılı lobüllere ayrılır (3,28). Her lobül korteks adı verilen periferik, koyu renkli bir bölge ve medulla adı verilen merkezi, açık renkli bir bölgeye sahiptir. Korteks küçük lenfositlerden zengin olduğu için medulladan daha koyu boyanır. Aralarındaki renk farkına rağmen, aslında korteks ve medullanın yapısı aynıdır, her ikisinde lenfositler ve epitelyal hücrelerden oluşmuştur, ancak bunların oranları farklıdır (4) (Şekil 2.3). Timus lobüllerinin medulla bölümlerinin açık, korteks bölümlerinin koyu boyanması bir lenf folikülü gibi görünmelerine yol açar. Ancak timusta lenf folikülü bulunmamaktadır (3). İçinde kan damarları taşıyan trabeküller ise korteksin yüzeyinden içe doğru kortikomedullar sınıra kadar uzanır. Böylece, kapiller sadece kortekste yer almaz, medullada da küçük arter ve arterioller bulunur (28).



Şekil 2.3. A. Timus histolojik kesiti.

Timus parankiması diğer lenfoid organların parankimasından bazı farklılıklar gösterir. Timusta retikulum lifleri bulunmaz. Bu nedenle timusun serbest hücreleri diğer lenfoid organlardan farklı olarak, sadece epitelyal retiküler hücrelerin oluşturduğu ağ üzerine yerleşmişlerdir (3). Timik korteksin marjinal kısmında lenfopoez yaygındır. Burada büyük lenfositler, orta çaplı lenfositler, lenfoblastlar ve mitoz oldukça fazladır. Korteksin iç kısmında ise küçük lenfositler en fazla sayıdaki hücre tipidir. Bunun dışında kortekste; epitelyal retiküler hücreler, lenfoblastlar, makrofajlar, az sayıda monosit ve mast hücreleri bulunur (4). Medulla hücrelere bağlı olarak daha az yoğun bir boyanma gösterir. Medullada bulunan hücreler; epitelyal retiküler hücreler, interdigitasyon yapan retiküler hücreleri, birkaç makrofaj, lenfositler ve Hassal cisimsikleridir (4).

Lenfoblastlar: Lenfoid hücrelerin ilk progenitörü olan prelenfositleri oluşturmak üzere 2 veya 3 kere bölünme yeteneğine sahip hücrelerdir (4) ve iç kortekste farklılaşan küçük lenfositleri üretmek için mitoz bölünmeye maruz kalırlar (29). Bu hücreler, ortalama 10-20 µm bir çapa sahip olup, çekirdekleri yuvarlak veya oval, 1-2 çekirdekçik içerirler. Ayrıca ince kromatinli, mavi sitoplazmaya sahiptir (30,31).

Lenfositler: Lenfositler fonksiyonel olarak T lenfosit, B lenfosit ve Naturel killer (doğal öldürücü; NK) lenfositler olmak üzere üç gruba ayrılır (3). Bununla birlikte tüm öncül lenfosit hücreleri kemik iliğinden kaynaklanır. Bu lenfositlerin bazıları T lenfositlerin bütün niteliklerini kazandıkları timusa göç eder. T lenfositler periferik lenfoid organların özel bölgelerine yerleşir. Diğer kemik iliği lenfositleri kemik iliğinde B lenfositlerine farklılaşır ve kendi özel bölmelerinde yerleştikleri ve çoğaldıkları periferik lenfoid organlara göç ederler (4). T lenfositler hücre aracılı immün cevapların oluşmasını sağlar. Lenfositler çaplarına göre küçük, orta ve büyük çaplı lenfositler olmak üzere 3 gruba ayrılır. Bunlar sırası ile 6, 12, 18 µm çapındaki hücrelerdir. Küçük lenfositler 6-9 µm çapında, büyük lenfositler 9-18 µm çapında olarak da değerlendirilebilir (3).

Timus'un temel hücre birimi küçük lenfositlerdir. Bunlar 'timosit' olarak tanımlanır (32). T hücrelerinin olgunlaşması timositlerin pozitif ve negatif seleksiyonu ile olur. Bu da farklı stromal hücrelerin ve olgunlaşmamış timositler arasındaki etkileşim ile gerçekleşir (19). Bu etkileşim timositlerin yüzeyindeki TCR ve stromal hücrelerin yüzeyindeki MHC-peptid kompleksi arasında olur (6,7). Timik stromal hücreler T

hücrelerinin gelişmesi, farklılaşması ve olgunlaşması için timik epitelyal hücreler (TECs) arasında ekstraselüler matriks, sitokinler ve büyüme faktörü sağlayabilir. TECs pozitif seleksiyona katılan timik kortikal epitelyal hücreler (cTECs) ve negatif seleksiyona katılan timik medullar epitelyal hücreler (mTECs) olmak üzere 2 büyük kategoriye ayrılır (7).

Epitelyal retiküler hücreler: Epitelyal retiküler hücreler, hem korteks hem de medullada bulunur. Kortekste bulunan retiküler hücreler oval ve ökromatik çekirdekleri olan, asidofilik sitoplazmalı, ince gevşek kromatinli, geniş membranlı, yıldız biçimli hücrelerdir (3,4,29). Bir çekirdekte 3 çekirdekçik görülebilirse de sıklıkla 2 μ çapa sahip tek bir çekirdekçik görülür (29). Bu hücreler desmozomları sayesinde benzer komşu hücreler ile bağlantı kurar (4,33).

Timus korteksinde üç tip epitelyal retiküler hücre bulunur. Kapsül ve trabeküllerin hemen altında bulunan Tip I epitelyal retiküler hücreler, kortekste bulunan kan damarlarının adventisyalı çevreler. Aralarında sıkı bağlantı (TJs) kompleksi bulunduğundan dolayı bu hücrelerin timus parankimasını dış ortamdan izole ederek T lenfositlerin antijenlere maruz kalmaksızın gelişimlerini tamamlamalarını sağladıkları düşünülmektedir. Tip I epitelyal retiküler hücrelerin altında bazal lamina uzanır. Damar duvarı endotelinin ve perivasküler makrofajların da katkıda bulunduğu bu bariyere kan-timus bariyeri denir. Kısaca kan-timus bariyeri Tip I epitelyal retiküler hücreler ve bu hücrelerin bazal laminası, perivasküler bağ dokusunun makrofajları, damar duvarı endoteli ve bazal laminasından oluşur.

Timusun Tip II epitelyal retiküler hücresi korteksin ortalarında yer alır. Bu hücrelerin sitoplazmasında yoğun intermediyer lif demetleri ve uzantıları arasında desmozomlar bulunur.

Kortekste yer alan son epitelyal retiküler hücre tipi, Tip III epitelyal retiküler hücrelerdir. Medulla sınırına yakın yerleşen bu hücreler Tip I epitelyal retiküler hücreler gibi sıkıca birbirlerine tutunarak korteks-medulla sınırında bir bariyer oluştururlar (3).

Medullada bulunan retiküler hücrelerin sitoplazması fibril ve granül içerdiğinden dolayı kortikal retiküler hücrelerin sitoplazmasından daha kolay saptanabilir ve sıklıkla fibril veya granül içerir. Bazı hücrelerin Golgi zonunda kırmızımsı granüller görülebilir. Çekirdeklerin çoğu kortikal retiküler hücrelerinkine benzer. Az bir kısmı ise (özellikle

Hassal cisimcikleriyle birlikte olanlar) biraz daha büyüktür. Bazen 4-6 çekirdekçik içeren tetraploid-benzeri çok büyük çekirdekler görülebilir (29).

Timus medullasında üç tip epitelyal retiküler hücre bulunur. Bu hücreler korteks sınırından başlamak üzere Tip IV, Tip V ve Tip VI epitelyal retiküler hücrelerdir.

Tip IV epitelyal retiküler hücreler korteks-medulla sınırında Tip III epitelyal retiküler hücrelere yakın bulunur. Bu hücrelerde, Tip III epitelyal retiküler hücrelerde olduğu gibi TJs kompleksi ile birbirine bağlanmışlardır. Böylece korteks tarafında Tip III epitelyal retiküler hücreler ve medulla tarafında Tip IV epitelyal retiküler hücreler tarafından oluşturulan hücresel bariyerle korteks ve medulla birbirinden ayrılır. Bu izolasyon, damarları nispeten geçirgen olan medulladan giren antiijenlerin kortekse ulaşmasını engellemek açısından son derece önemlidir.

Tip V epitelyal retiküler hücreler medulla boyunca yayılarak birbirine desmozomlar aracılığıyla tutunup lenfositlerin yerleştiği bir ağ oluştururlar.

Tip VI epitelyal retiküler hücreler ise medullada en tipik epitelyal retiküler hücrelerdir. Bu hücreler bir araya gelip konsantrik tabakalar oluşturarak ışık mikroskopik olarak asidofilik boyanan Hassal cisimciklerini yaparlar (3).

Timik epitelyal retiküler hücreler sitoplazmik uzantıları vasıtasıyla birbirlerine bağlanarak bazal membran üzerinde üç boyutlu bir ağ oluşturur. Bu üç boyutlu oluşum T hücrelerinin gelişimi ve stromal hücreler arasındaki temas vasıtasıyla stroma boyunca T hücre göçünü mümkün kılmaktadır (6). Timik epitelyal hücrelerinin epitelyal kökenli olmaları nedeniyle aralarında bağlantı komplekslerinin bulunması doğaldır (3).

Timusta epitelyal hücrelerin yanında non-epitelyal hücreler de bulunur. Bu hücreler, makrofajlar ve interdigitasyon yapan hücrelerdir.

Makrofajlar: Makrofajlar ilk olarak fagositoz yetenekleri ile keşfedilmiştir. Bu hücrelerin morfolojik özellikleri işlevsel etkinliklerine ve yerleştikleri dokulara uygun olarak çok çeşitlilik gösterir. Elektron mikroskopi görüntüsünde aktif pinositotik ve fagositotik aktivitelerinin morfolojik karşılığı olan girintili, çıkıntılı, düzensiz yüzeyleri ile ayırt edilir. Genellikle iyi gelişmiş bir Golgi aygıtı, çok sayıda lizozom, ve belirgin granüllü endoplazmik retikulumu bulunur.

Makrofajlar kökenini kemik iliğinden alan ve bölünerek dolaşımdaki monositleri oluşturan öncül hücrelerden alır. İkinci aşamada bu hücreler venüllerin ve kapillerlerin

duvarlarını aşarak, içinde olgunlaşıp makrofaj özelliklerini kazanacak oldukları bağ dokusuna göç ederler. Bu yüzden monositler ve makrofajlar olgunlaşmalarının farklı aşamalarında aynı hücrelerdir (34).

Makrofajlar timusun korteks, kortiko-medullar bölge ve medullasında bulunan bir hücre tipidir. Tipik korteks makrofajları korteksin her tarafına dağılır. Bu hücreler, ışık mikroskopuyla fagosit olmuş lenfositlerin intrasitoplazmik çekirdek kalıntılarının varlığı sayesinde kolaylıkla tanınırlar. Ayrıca korteks makrofajları geniş hücrelerdir ve çekirdekleri geniş olup çekirdek membranının iç yüzeyinde heterokromatin kümeleri bulunur. Medullada bulunan makrofajlar ise kortekstekilere benzer (35).

Kortiko-medullar bölge makrofajları ışık mikroskopik olarak korteks ve medulla makrofajlarından farklı yapı gösterirler. Buradaki hücreler korteks ve medulla arasında kümelenme oluşturur. Sitoplazmalarında çok sayıda aldehit-fuksin ile boyandığında kolayca ayırt edilebilen sitoplazmik granüller yer alır. Bu granüller çok büyük olup çekirdeğe baskı yaptıklarında çekirdek düzensiz şekilde gözlenir. Çekirdek ökromatik olup belirgin bir çekirdekçiğe sahiptir. Sitoplazmada tonofilamanlar ve desmozomlar bulunmaz (35).

İnterdigitasyon yapan hücreler: Bu hücreler, timusta bulunan non-lenfoid hücreler olup, medulla ve kortiko-medullar bölgede bulunurlar. Epitelyal hücrelere benzemeyen bu hücreler, komşu hücrelerle desmozom oluşturmazlar. Bu hücreler medulla'da mononükleer fagositik sistem hücrelerini temsil etmektedirler (35). İlk olarak insan timusunda tanımlanan bu hücreler daha sonra sıçan, kobay ve kuşlarda incelenmiş olup, farelerde nadiren görülmüştür.

Mast Hücreleri: Mast hücreleri şekli oval ile yuvarlak arası, çapı 20-30 µm, sitoplazması bazofilik salgı granülleriyle dolu olan bağ dokusu hücreleridir (3).

Hassal cisimcikleri: Medullada yer alan Hassal cisimcikleri timus için karakteristik olup, bunlar Tip VI epitelyal retiküler hücrelerin (3) sıklaşıp bir araya toplanmasıyla şekillenen küresel yapılardır. Bu yapılar halkasal tarzda düzenlenmiş, yassılaştırmış epitelyal retiküler hücrelerin keratin filamanları ile dolması, dejenere ve bazen de kalsifiye olmasıyla oluşur. İşlevleri ise henüz bilinmemektedir (4). Bu cisimciklerin, antijenle antikorların depolanması ve fagositozunda rol oynadığı öne sürülmektedir (23).

2.1.4. Timusun Fonksiyonu ve İmmünolojik Önemi

Timus, vücut ağırlığına göre en fazla gelişimini doğumdan hemen sonra gösterir, ergenlikten sonra ise geriler. Sürekli olarak kemik iliği kaynaklı hücrelerin akımına uğrar. T hücrelerini oluşturacak olan kök hücreler, kemik iliğinden köken alarak, hem fetal hem de yetişkin hayatta timusa göç eder. Timus, T hücrelerinin son farklanma ve seçilme yeridir. Bu işlem esnasında timus lenfositleri pek çok mitoz bölünme geçirir. Buna karşın bu hücrelerin %95'den fazlası apoptozis ile ortadan kaldırılır. Ortadan kaldırılanlar antijenlere yanıt vermedikleri için organizmanın kendi antijenleri ile tepkime veren lenfositlerdir. Organizmanın kendi antijenleri ile tepkime veren lenfositler ortadan kaldırılmadığı takdirde otoimmün hastalığa yol açar. Sonuçta timusta üretilen lenfositler, yabancı antijenlere karşı yanıt geliştiren edinilmiş bağışıklık için temel öneme sahip T hücreleridir.

Timus T lenfositlerin çoğalma ve farklanmasını uyaran birkaç protein faktör salgılar. Bunların timusta etkili olan parakrin salgılar olduğu düşünülmektedir (4). Epitelyal retiküler hücrelerden salgılanan (3) bu dört faktör: timozin- α , timopietin, timolin ve timus hümmoral faktördür. Timus ayrıca bazı hormonlardan etkilenir. Adrenal kortikosteroidler, lenfosit sayısının azalmasına ve mitoz hızının düşmesine, kortikal dokunun bozulmasına neden olur. Adenohipofizden salgılanan adrenokortikotropik hormon adrenal korteksi uyarak benzer bir etkinin ortaya çıkmasına neden olur. Erkek ve dişi seks hormonları da timus gerilemesini hızlandırır (4).

Timus T lenfositlerin seleksiyonunun immunolojik olarak gerçekleştiği yerdir. Korteksin dış bölümünde T lenfosit membranlarında CD2 ve CD7 (CD4 ve CD8 yoktur) molekülleri bulunur. Bu döneme double negatif dönem denir. Bu erken dönemin ardından CD1 molekülleri belirir. CD1 moleküllerinin görülmesi T lenfosit farklılaşmasının orta dönemlerini işaret eder. Daha sonra TCR, CD3, CD4, CD8 molekülleri kazanılır. Bu döneme double pozitif dönem (CD4 ve CD8 bulunur) denir. Bu hücrelere epitelyal retiküler hücrelerden MHC-I ve MHC-II sunulur. Kendi MHC moleküllerini ve kendi veya yabancı antijenleri tanıyan lenfositler hayatta kalırken, tanıyamayanlar apoptozla ölür. Bu olaya pozitif seleksiyon denir. Kortekste gerçekleşen bu olay sonunda ölen hücreleri makrofajlar fagosit eder. Yaşayanlar ise medullaya geçer. Medullada ikinci bir eleme yapılır. Hücrelerin kendi MHC moleküllerince gösterilen kendi antijenlerini tanıması elenmelerine neden olur. Bu olaya

negatif seleksiyon denir. Negatif seleksiyondan kurtulan hücreler CD4 veya CD8 pozitif hücrelere farklılaşırlar. Bu lenfositler ya CD4 ya da CD8 molekülü taşıdıklarından dolayı bu dönem single pozitif dönem olarak bilinir. Hayatta kalan immun yetenekli, self-tolerans gösteren T lenfositin diğer lenfoid organlara yolculuğu kan dolaşımı yolu ile gerçekleşir. Eğitimini tamamlamış olgun T lenfositler kan yolu ile taşınarak lenfoid organlarda belirli alanlarda yoğunlaşırlar. Bu alanlara timusa bağlı alanlar denir. Bunlar lenf düğümleri parakorteksi, dalağın periarteriyel lenfoid kılıfı ve ince bağırsakların Peyer plaklarının lenfoid dokusudur (3).

2.2. NECTİN

Çok hücreli organizmalardaki hücreler büyüme, farklılaşma, çoğalma ve göç gibi çeşitli hücresel metotlar kullanarak komşu hücreleri ile birbirlerine tutunur ve hücrelerarası bağlantılar oluşturur (36-38). Hücrelerarası bağlantılar oluşurken genellikle hücre iskeleti elemanlarıyla ilişki kurulur ve bu hücreler arası adezyonlar ile kuvvetlendirilir (39). Epitelyal hücreler, hücre-hücre arası adezyon oluşumunda özel bir membran yapısı olan sıkı bağlantı tight junctions (TJs), hücre-hücre yapıştırma bağlantısı adherens junctions (AJs) ve desmozomlar (DSs) olarak bilinen bağlantı komplekslerinden oluşur (40,41). Bu bağlantı kompleksleri tipik olarak aynı hizada apikal ve bazalde bulunurken, DSs başka bölgelerde de bulunmaktadır (40,42).

AJs ile TJs kompleksleri, epitelyal ve endotelyal hücrelerin apikal kısımlarında oluşan bağlantı yapılarıdır. Bunlar hücre polaritesi ve parasellüler geçirgenliğin kontrolünde merkezi bir rol oynar (43). TJs kompleksi, epitelyal hücrelerin apikal ve bazolateral plazma membranları arasında parmaklık görevi üstlenir ve parasellüler yoldan geçen su ve çözünen maddeleri önlemek için bir bariyer olarak görev yapar (42). Dolayısıyla TJs kompleksinin 2 önemli fonksiyonu vardır: Birincisi hücreler arasındaki boşluklar boyunca çözülebilir moleküllerin geçmesini sağlayan bariyer fonksiyonu, ikincisi ise apikal bölgeden bazolateral bölgeye yayılan hücre yüzey proteinleri ve lipidlerini tutmada bir parmaklık görevi üstlenme fonksiyonudur (44). TJs kompleksi claudinler, occludin (40) ve bağlantı adezyon molekülleri (JAMs) (44) gibi transmembran üyelerinden ve ZO-1, ZO-2, ZO-3, cingulin, 7H6, rab3B, rab13, symplekin ve AF-6 gibi sitoplazmik moleküllerden oluşur (43). Claudin, Ca^{+2} -bağımsız hücre-hücre adezyon molekülüdür ve 20 üyeden oluşur (39,45). Occludin, TJs kompleksinde bir

transmembran proteinidir, fakat TJs kompleksi oluşumundaki rolü henüz saptanamamıştır (37,39,40,45). Claudin ve occludin, ZO-1, ZO-2 ve ZO-3 gibi periferel membran proteinleri vasıtasıyla aktin ile ilişki içerisinde. JAMs, Ca^{+2} -bağımsız Ig-benzeri hücre adezyon molekülüdür ve TJs kompleksi ZO proteinleri ile etkileşim kurar (45). Ayrıca, JAM AJs kompleksinin apikal tarafında TJs kompleksinin oluşumu için gerekli olan Par-3, Par-6 ve aPKC'den oluşan hücre kutup kompleksini bağlar (44).

TJs kompleksinde ayrıca tümör baskılayıcı proteinleri ile hücre kutup proteinleri de bulunur (45). TJs kompleksi, AJs kompleksinin apikalinde lokalize olmasında AJs kompleksi anahtar rol oynar. Ayrıca hücre içi sinyal molekülleri, oncoproteinler ve hücre yüzey reseptörleri gibi biyolojik olarak aktif moleküllerin etrafında toplanmasını sağlar (44,45).

AJs kompleksi, TJs kompleksi ve DSs oluşumu ve onarımında, ayrıca membran reseptörleri, sinyal molekülleri ve oncoproteinler gibi birkaç biyolojik aktif moleküllerin konsantrasyonunda anahtar rol oynar (39,45-48). Cadherinlerin her biri AJs kompleksinde extrasellüler yüzeyde sitoplazmik bölge boyunca Ca^{+2} -bağımlı hücre iskeleti elemanı olan aktin, periferel membran proteinleri olan α -catenin, β -catenin, γ -catenin, α -aktinin ve vinculin içerir (40,49). α -aktinin ve vinculin ayrıca aktin bağlayıcı (F-aktin) proteinlerdir ve aktin'i α -catenin'e doğrudan bağlar (50).

Hücre-hücre arası bağlantılar, hücre adezyon molekülleri (CAM) tarafından oluşturulur (37). Bu hücreler arası bağlantılarda cadherin süperailisi anahtar rol oynar (39). Epitelyal hücrelerdeki hücre-hücre arası bağlantılar AJs kompleksinde cadherin-catenin ile lokalize olmaktadır (40). Cadherin 80 üyeden oluşan Ca^{+2} -bağımlı hücre adezyon molekülüdür (36,37,44,45,51). E-cadherin epitelyal hücrelerin AJs komplekslerinde eksprese edilen cadherin ailesi üyesidir (36,39,52). E-cadherin AJs kompleksinde lokalize ve α -catenin, β -catenin, α -aktinin ve vinculin içeren periferel membran proteinleri vasıtasıyla hücre iskeleti elemanı olan aktin ile ilişkilidir (45,47,50,52). E-cadherin epitelyal hücrelerde β -catenin'i doğrudan bağlarken, α -catenin ile dolaylı bir etkileşim kurar ve aktin'le ilişki içerisinde (44). Bu ilişki AJs kompleksinin hücre-hücre yapışmasını güçlendirir (45).

Epitelyal hücrelerin AJs komplekslerinde cadherin-catenin sistemi ile kolokelize ve daha yüksek konsantrasyonda bir hücre-hücre adezyon sistemi tanımlanmıştır (40,53-55). Bu NAP adı verilen adezyon sistemi nectin, afadin ve ponsin'den oluşur (40).

Nectin ve afadin çeşitli hücrelerarası birleşmelerde birbirleriyle işbirliği kurarak ya da birbirlerinden bağımsız olarak cadherin'le ilişki içerisinde (39). Bu hücre-hücre adezyon sistemi E-cadherin bağlı AJs kompleksi oluşumunda ve epitelyal hücrelerdeki claudin-bağlı TJs kompleksi oluşumunda rol oynar (39,45,56,57). Nectin poliovirüs reseptör-ilişkili proteine benzeyen Ca^{+2} -bağımsız immunoglobulin-benzeri hücre adezyon molekülüdür (40,58) ve α -herpesvirüs giriş mediatörü olarak tespit edilmiştir (39,40,51,59,60). Bu molekül çeşitli hücrelerarası bağlantıların birbirleri ile temasına katkıda bulunur. Bunu cadherin'lerden bağımsız olarak ya da cadherin'lerin işbirliği ile gerçekleştirir (37,45). Ig-süperaillesinin üyeleri Ca^{+2} -bağımsız CAMs olarak önemli rol oynamaktadır (37). Ca^{+2} -bağımsız Ig-benzeri bir başka hücre adezyon molekülü olan nectin-benzeri moleküller (NecIs) tanımlanmıştır. NecIs, NecIs-1, NecIs-2, NecIs-3, NecIs-4 ve NecIs-5 olmak üzere 5 üyeden oluşur. NecIs, hücre adezyonunda nectin ile etkileşim göstererek ya da nectin'lerden bağımsız olarak hücre adezyonu, göçü ve proliferasyonunda rol oynamaktadır. NecIs, nectin'e benzer domain yapısına sahiptir fakat nectin'den farklı olarak afadin ile etkileşim göstermemektedir (37,38,45) (Şekil 2.4). Afadin ise F-actin'i kullanarak nectin'nin sitoplazmik bölgesine aktin bağlar (39,40). Afadin'in l-afadin ve s-afadin olmak üzere 2 varyansı vardır (40). p205 olarak adlandırılan l-afadin AJs komplekslerinde AF-6 proteininin lokalize olduğu büyük varyansdır (54,61) ve bütün dokularda eksprese olur (39,40,50). p190 olarak adlandırılan s-afadin ise küçük varyansdır (54,61) ve daha çok nöral dokularda eksprese olur (40,50,53) (Şekil 2.4). Ponsin ise vinculin'e l-afadin bağlayıcı bir proteindir (51) ve vinculin vasıtasıyla cadherin-catenin'e nectin-afadin'in bağlanmasını sağlar (40,55).

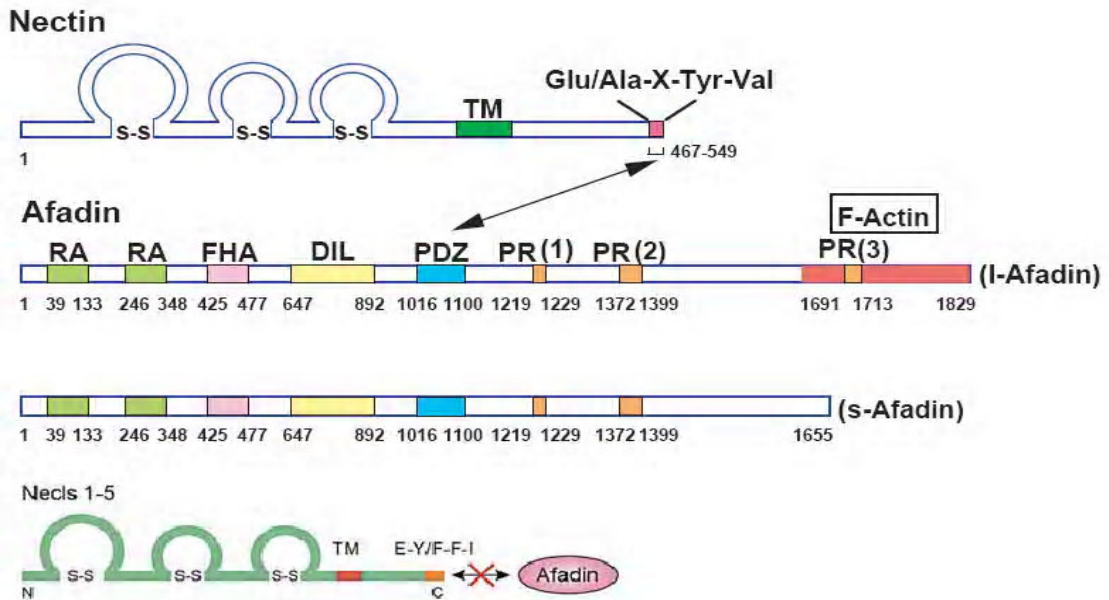
2.2.1. Nectin'lerin Moleküler Özellikleri

Nectin'ler Ca^{+2} -bağımsız Ig-benzeri hücre adezyon molekülü (CAM)'dür ve nectin-1, nectin-2, nectin-3, nectin-4 olmak üzere dört üyeden oluşur (37,39,45,50,51,53,56,60). Nectin-4 hariç diğer tüm üyeler, nectin-1 α , nectin-1 β , nectin-1 γ , nectin-2 α , nectin-2 δ , nectin-3 α , nectin-3 β ve nectin-3 γ olmak üzere iki veya üç çeşit yapıya sahiptir (39,45,60). Nectin-1 γ haricindeki diğer nectin üyeleri bir ekstrasellüler bölge ile üç Ig-benzeri domaine, tek bir transmembran bölgeye ve son bir sitoplazmik bölgeye sahiptir (39,45) (Şekil 2.4).

Nectin-1 γ transmembran bölgesi eksik bir proteindir (39,45). Nectin-1 β , nectin-1 γ , nectin-3 γ ve nectin-4 haricindeki diğer üyeler karboksil ucunda dört amino asitin

(Glu/Ala-X-Tyr-Val) bulunduğu korunmuş motife sahiptir (Şekil 2.4). Bu korunmuş bölge vasıtasıyla afadin'in sitoplazmik C ucundaki PDZ domaini ile nectin'in bağlanması sağlanır (45,51,53,54) ve ayrıca aktin'e nectin'in, nectin'e ise afadin'in bağlanmasını sağlar (45). Nectin-4'te bu korunmuş motif eksik olmasına rağmen yine de afadin'in PDZ domainini bağlar (45,49,51,61).

Nectin-1 α ve nectin-2 α PRR-1 ve PRR-2 adı verilen poliovirüs reseptör ilişkili protein olarak izole edilmesine rağmen sonradan poliovirüs reseptör ilişkili olmadıkları anlaşılmıştır. Bunlar daha sonra α -herpes virüsü için hücre-hücre yayılmasına ve girişini kolaylaştırmak amacıyla reseptör olarak hizmet etmiş, bu yüzden sırasıyla HveC ve HveB olarak yeniden adlandırılmıştır (45).



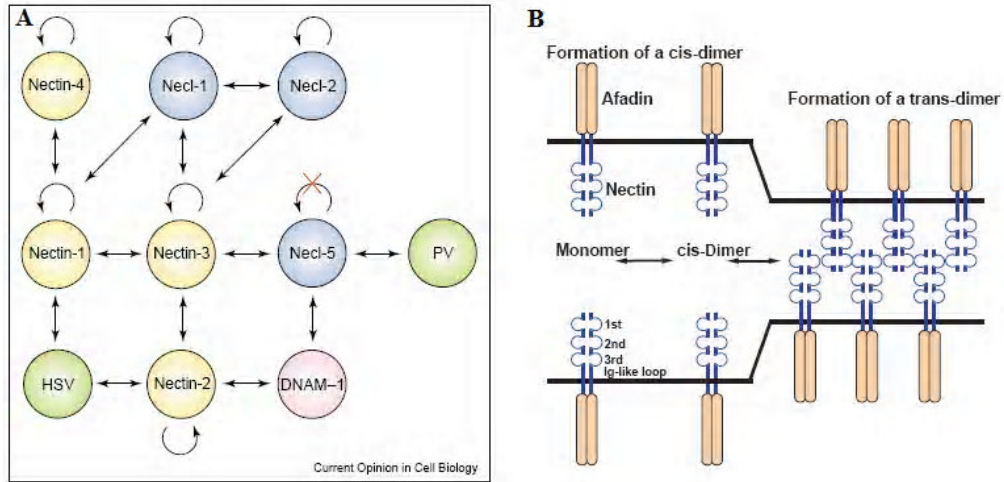
Şekil 2.4. Nectin, Afadin ve Neclis'nin moleküler yapısı (38,39).

2.2.2. Nectin'lerin Hücre-Hücre Adezyon Aktivitesi

Nectin'lerin hücre-hücre adezyon aktivitesi Ca^{+2} -bağımsızdır (38,39). Her üyenin hücre-hücre adezyonunda ilk olarak homofilik *cis*-dimer formu ve daha sonra homofilik ya da heterofilik *trans*-dimer formu (trans etkileşimlerde) gerekir (51). Nectinlerin ekstrasellüler domaini aynı hücrelerin yüzeyinde ilk olarak *cis*-dimer forma bağlanır ve daha sonra hücre-hücre temaslarında promotörler Ca -bağımsız olarak homofilik ya da heterofilik *trans*-dimer formu oluşturur (38) (Şekil 2.5).

Nectin aile üyesinin çoğu homo-*cis*-dimer formdadır. Fakat nectin-2 α ve nectin-2 γ hetero-*cis*-dimer formlara da sahiptir. Ayrıca, her nectin homo-*trans*-dimer forma sahiptir (39). Nectin'in ikinci Ig-benzeri ilmiği *cis*-dimer oluşumu için gereklidir. Böylece birinci Ig-benzeri ilmik *trans*-dimer form oluşumu için gerekli iken *cis*-dimer form oluşumu için gerekmemektedir. Üçüncü Ig-benzeri ilmiğin fonksiyonu ise henüz bilinmemektedir (39,45).

Hücre-hücre yapışmasında heterofilik *trans*-dimer formun, homofilik *trans*-dimer formdan daha güçlü olduğu belirlenmiştir. Heterofilik etkileşimler nectin-2-nectin-3, nectin-1-nectin-3 ve nectin-1-nectin-4 arasında gerçekleşir (38). Nectin-3, nectin-1 ya da nectin-2'den birisiyle hetero-*trans*-dimer form oluşturduğunda oluşan bu hetero-*trans*-dimer formu homo-*trans*-dimer formundan daha güçlü olmaktadır (39). Ayrıca nectin-4 ile nectin-1 hetero-*trans*-dimer forma sahip iken nectin-1 ve nectin-2 hetero-*trans*-dimer forma sahip değildir (39,61).



Şekil 2.5. A. Nectin'ler, Necls ve virüs arasındaki homofilik ve heterofilik *trans*-etkileşimler (37). **B.** Nectin'in hücreler arası adezyon aktivitesi (39).

2.2.3. Nectin'lerin Temel Aktiviteleri

Her nectinin hücre-hücre adezyonuna sebep olan ekstrasellüler bölgesinde hetero- *trans*-dimer ya da homo-*trans*-dimer ve bir homo-*cis*-dimer formu vardır. Ayrıca Necl-5 ve nectin-2 DNAM-1/CD226 ile heterofilik-*trans* etkilidir ve başka bir Ig-süperailisi'nin hücre adezyon molekülü olup, insanda doğal öldürücü hücrelerde eksprese edilmiştir. DNAM-1 bir ekstrasellüler bölge ile iki Ig-benzeri ilmiğe, bir transmembran bölge ve bir sitoplazmik bölgeye sahiptir. Nectin aktin bağlayıcı filament (F-aktin) vasıtasıyla

sitoplazmik son kısmı boyunca afadin ile bağlanmaktadır. Aktin ile nectin bağlanması cadherinlerin α -catenin ve β -catenin kompleksine sitoplazmik kısmı boyunca bağlanmasına benzer bir şekilde gerçekleşir. Nectin bir hücre kutup proteini olan Par-3'e sitoplazmik kısmı boyunca bağlanmaktadır. Böylece hücre polarizasyonu ile ilişkili diğer hücre kutup proteinleri olan aPKC ve Par-6 ile kompleks oluşturmaktadır. Nectin ve nectinlerin ekstrasellüler bölgeleri boyunca Nectin ile heterofilik-*trans* etkileşimli olmalarıdır (37).

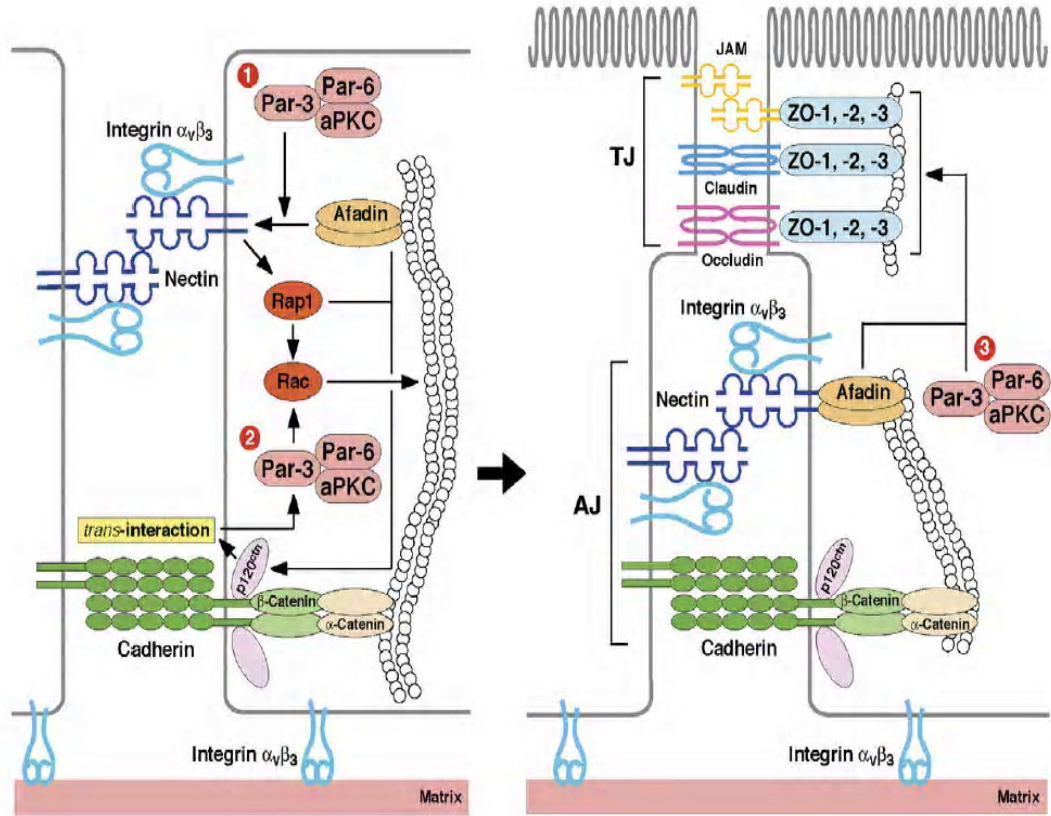
2.2.4. Nectin'in Doku Dağılımı

Nectin-1, nectin-2 ve nectin-3 aynı zamanda her yerde bulunabilen epitelyal hücreler, nöronlar ve fibroblastları içeren çeşitli hücre tiplerinde bulunmaktadır. Nectin-2 ve nectin-3 cadherinlerin eksprese edilmediği kan hücreleri ve spermatidlerde eksprese edilirken, insanda nectin-4 başlıca plasentada eksprese edilmektedir (37,39,45).

2.2.4.1. Epitelyal Hücrelerdeki Bağlantı Kompleksleri Oluşumunda Nectin'in Rolü

Nectin-bağlı hücre-hücre bağlantıları hem CAMs'nin işbirliği ile hem de bunlardan bağımsız olarak gerçekleşir. Örneğin, nectin-bağlı hücre-hücre adezyonu nöronlarda sinaptik bağlantılar, epitelyal hücreler ve fibroblastlarda AJs kompleksinin oluşumu cadherin iş birliği ile gerçekleşir. Ayrıca epitelyal hücrelerde TJs kompleksi oluşumu TJ öğelerinin işbirliği ile gerçekleşir. Her nectinin sitoplazmik kısmı afadin ile direkt etkileşim kurmakta, F-actin ve hücre kutup proteini Par-3, α -catenin, ZO proteinleri, annexin II ve IQGAP gibi birçok membran proteini ile indirekt ilişki kurmaktadır. Nectin ile bu proteinlerin etkileşimi AJs ve TJs komplekslerinin oluşumu için gereklidir (51).

Nectin'ler AJs kompleksi oluşumu boyunca ya da oluşumundan sonra JAMs ile işbirliği yapar (37,51,62). JAMs'nin bağladığı hücre kutup proteinleri (Par-3, Par-6 ve aPKC) TJs kompleksinin oluşumu için gereklidir. Örneğin, AJs kompleksinin apikal tarafında claudin'ler ve occludin'i takip ederek E-cadherin ile işbirliği yapar ve böylece TJs kompleksinin oluşumuna katılmış olur (51) (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. TJs kompleksi oluşumunda nectin-bağlı sinyal ve Par-3 hareketi. Epitelyal hücrelerin oluşturduğu bağlantı yapılarında Par-3 en az 3 bölgede düzenleme gerçekleştirir: (1) Par-3 AJs kompleksinin oluşumunda nectin ile afadin'in *trans*-etkileşimini düzenler. (2) Par-3 AJs kompleksinin oluşumunda uyarılmış E-cadherin ile Rac aktivasyonunu düzenler. (3) Par-3 afadin ile işbirliği oluşturarak TJs kompleksinin oluşumunda nectin'i düzenler (51).

E-cadherin bağlı hücre-hücre adezyonu TJs kompleksinin oluşumu için gereklidir. TJs kompleksi oluşumunda, E-cadherin bağlı hücre-hücre adezyonunun olmadığı durumlarda, nectin-bağlı hücre-hücre adezyonunun temel alındığı gösterilmiştir (51). Ayrıca bu Par proteinleri nectin-bağlı hücre-hücre adezyonunun oluşumu için gerekmediği halde, AJs kompleksinin oluşumu için gereklidir. Bu Par proteinleri nectin ile afadin'in ilişkisi için de gereklidir ve böylece nectin ile Par-3 ilişkisi için afadin gerekmediği ortaya çıkar (51).

AJs ve TJs komplekslerinin oluşumu için nectin afadin ilişkisi yeterli değildir. AJs ve TJs komplekslerinin düzenli oluşması için Par proteinleri ve afadin işbirliği kurmaktadır. Birde TJs kompleksi oluşumu için F-actin bağlayıcı ZO proteinleri gereklidir. ZO proteinleri claudinler, occludin, JAMs ve aktin ile ilişki içerisindedir. ZO proteinleri ayrıca afadin vasıtasıyla nectin'lerle de ilişki kurmaktadır. Bu durumda

nectinler afadin ve ZO proteinleri vasıtasıyla TJs kompleksi öğeleri ile iş birliği kurar (51).

Fare ince bağırsak epitelyum hücrelerindeki AJs kompleksi yüksek oranda nectin-1, nectin-2, nectin-3 ve afadin bulunurken, TJs kompleksi ve DS'larda bulunmamaktadır (39,53,54). İmmunoelektron mikroskopunda cadherin-bağlı AJs komplekslerine bakıldığında nectin-2'nin var olduğu ve nectin-2'nin altında yığın şeklinde F-actin olduğu gözlenmiştir (53).

Epitelyal hücrelerde nectin-afadin ve E-cadherin-catenin sistemleri fiziksel ve fonksiyonel olarak ilişki kurmaktadır. Bu ilişki ilk olarak vahşi-tip Madin Darby Canine Kidney (MDCK) hücrelerinde TJs ve AJs komplekslerinin oluşumu sırasında nectin-1-bağlı bağlantılarda E-cadherin ile afadin'in kolokalizasyonu ve iş birliğinin yanı sıra ekzojen nectin-1 (nectin-1-MDCK) hücrelerinde eksprese edilmiştir. (39,50)

Afadin eksikliği gösteren vahşi-tip farelerin gastrulasyon aşamasında eksiklik, ektoderm oluşumunda düzensizlik, mezoderm göçünde zayıflama, somitler, ektoderm ve mezodermden oluşan yapıların gelişim aşamalarında bozukluk gözlenmiştir. Ayrıca afadin yetersizliğinden dolayı ektoderm düzensizliği gösteren embriyonik kök hücrelerden kistik embriyo cisimleri oluşmaktadır. Ektodermdeki afadin yetersizliği farelerde ve embriyo hücrelerinde AJs kompleksi oluşumunu büyük ölçüde bozmuştur. Bu sonuçlar dokulardaki hücrelerarası bağlantıların oluşumunda nectin-afadin sisteminin önemli olduğunu göstermektedir (39,40).

Nectin-2 ve E-cadherin'in tek molekül görüntü analizinde anne-fare tümör hücrelerinin plazma membranının serbest yüzünde nectin-2'nin E-cadherin'den daha hızlı hareket ettiği gösterilmiştir. Bu sonuçlar nectin-afadin ve E-cadherin-catenin sistemlerinin AJs komplekslerinde ortak bir şekilde organize olduğunu gösterir. Sonuç olarak epitelyal hücrelerdeki nectin-afadin ve E-cadherin-catenin sistemlerinin moleküler mekanizması, fibroblastlardaki moleküler mekanizmaya benzerdir (39).

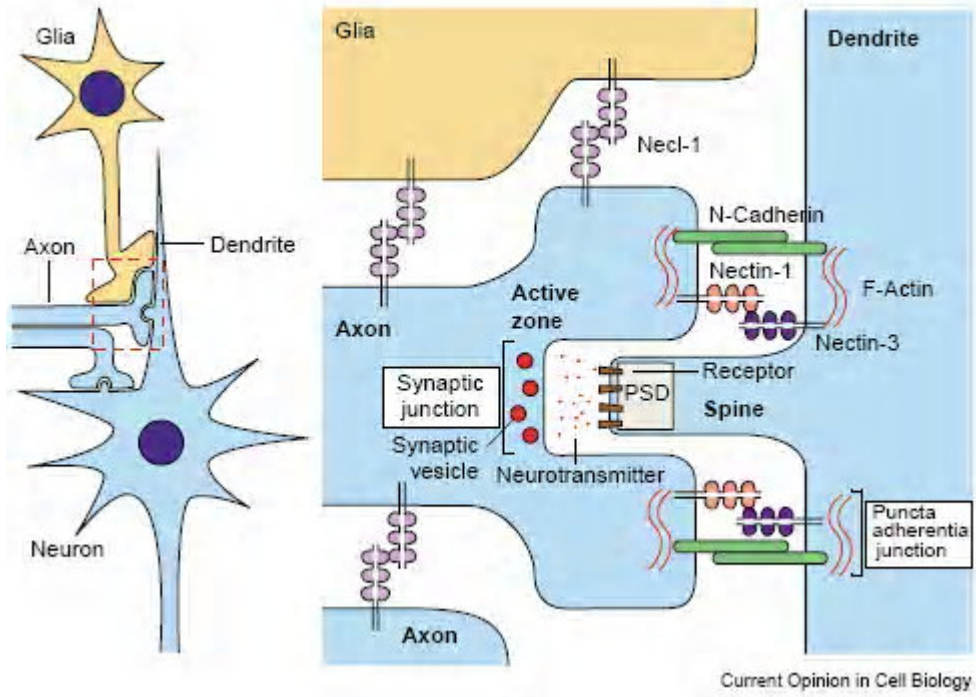
TJs kompleksi oluşumunun, E-cadherin bağlı AJs kompleksinin oluşumuna bağlı olmasına kanıt olarak bu oluşumunda nectin-afadin sisteminin bulunduğu öne sürülmektedir (39,63). Nectin-1-MDCK hücrelerindeki AJs ve TJs komplekslerinin oluşumunda, afadin ve ZO-1'in lokalize olduğu bölgede claudin, occludin ve JAM yer alır. Bunlar nectin-1 bağlı bağlantıların apikal tarafında işbirliği içerisindedir. Sonra bu

yapılar işbirliği oluşturarak kendi apikal taraflarına nectin-1 bağlı bağlantılardan ZO-1 transfer etmektedirler (39,56).

2.2.4.2. Sinaps Oluşumunda Nectin'in Rolü

Sinapslarda birbirinden farklı fonksiyonları bulunan 2 tip hücrelerarası bağlantı tanımlanmıştır. Bunlar synaptic junctions (SJs) ve puncta adherentia junctions (PJs) kompleksleridir. SJs komplekslerinin nörotransmisyon bölgesinde Ca^{+2} kanalları ve kaynaşmış halde sinaptik veziküller bulunurken, postsinaptik yoğunlukta ise nörotransmitter reseptörler bulunmaktadır. PJs komplekslerinde ise, epitelyal hücrelerin AJs komplekslerine benzer bir yapısı bulunmaktadır (39,64) ve sinaptik veziküller veya postsinaptik yoğunluk ile ilişkili değildir, fakat simetrik paramembranöz yoğunluğa sahiptir (64). PJs kompleksleri nöronal hücrelerin mekaniksel adezyon bölgelerinde hareket eder ve SJs kompleksi oluşumunda nörotransmisyon düzenleyicilerine katılırlar (38). Bu iki bağlantı kompleksi akson terminalleri ve diğer hedef hücreler arasındaki mekaniksel adezyonla ilişkilidir, fakat molekül mekanizmaları tam olarak bilinmemektedir (64).

Hipokampusün CA3 bölgesindeki piramidal hücrelerin yoğun lif terminalleri ve dendritleri arasındaki sinapslarda SJs ve PJs komplekslerinin her ikisi de yüksek ölçüde gelişmiştir (Şekil 2.7). Bu bağlantılar yetişkinlerde bile beynin gelişimi süresince aktif-bağlı tarzda yeniden biçimlenmektedir (37,39,64). Bağlantıların bu bölgede oluşumu, hafıza ve öğrenmenin başlıca mekanizması olan sinaptik plastisitede anahtar rol oynadığı öne sürülmektedir. Sinapslar ve epitelyal hücrelerin bağlantıları arasındaki moleküler mekanizmalardaki benzerlikte işlev gören nöral (N) ve epitelyal (E) cadherinler olan klasik cadherinler bulunmuştur. Bunlar beynin bazı bölgelerindeki SJs ve PJs komplekslerinin her ikisinde de lokalizedir. Ayrıca α N-catenin ve β -cateninler, cadherin-ilişkili proteinler PJs kompleksinde lokalizedir. Ayrıca SJs kompleksinde cadherin-ilişkili nöronal reseptörler bulunmaktadır. Bu bulgular, sinapslardaki SJs ve PJs komplekslerinin epitelyal hücrelerdeki cadherin-bağlı hücre bağlantılarına benzediğini öne sürmektedir (64).



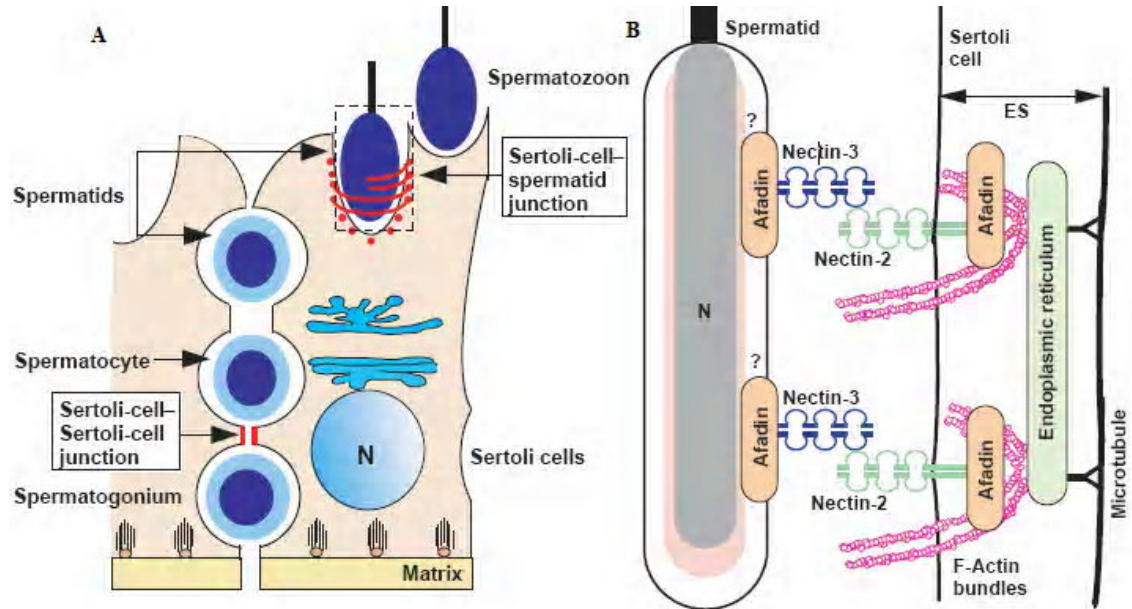
Şekil 2.7. Hipokampüsün CA3 bölgesindeki piramidal hücre dendritleri ve yoğun lif terminalleri arasındaki sinapslarda, PJs ve SJs komplekslerinin oluşumu gösterilmektedir. PJs komplekslerindeki presinaptik ve postsinaptik bölgede nectin-1 ve nectin-3'ün asimetrik lokalizasyonu gösterilmektedir. Afadin, N-cadherin ve catenin ise her iki bölgede simetrik olarak yerleşim göstermektedir. SJs kompleksinde ise presinaptik bölgede sinaptik veziküller ile ilişki içerisinde (37,39).

2.2.4.3. Sertoli hücre-Spermatid Bağlantıları Oluşumunda Nectin'in Rolü

Testisdeki Sertoli hücreleri komşu Sertoli hücreleri ile TJs kompleksleri ve tek tabakalı bir epitelium oluşturmaktadır (52,65). Diğer taraftan spermatogenez boyunca Sertoli hücreleri tarafından gelişimi ve olgunlaşması sağlanır. Spermiogenezin ikinci yarısı boyunca spermatidler Sertoli hücreleri ile Sertoli hücre-spermatid adı verilen hücreler arası bağlantı yapıları oluşturur ve spermatozoa olan hücreler serbest bırakılır (52). Sertoli-Sertoli hücre bağlantıları AJs kompleksinin yanı sıra TJs komplekslerinden oluşur ve kan-testis bariyeri (BTB) olarak görev yapar (39,52). Testisdeki TJs komplekslerinin 3 fonksiyonu vardır. Birinci fonksiyonu, komşu hücreler arasında çözünen maddelerin parasellüler yolla hareketini kısıtlayarak bir bariyer oluşturması ve kompartimentalizasyon sağlamasıdır. İkinci fonksiyonu, farklı protein ve lipid bileşimleri hücrenin bazolateral ve apikal domainleri arasında bir sınır oluşturur. Böylece endotelial ve epitelial hücre kutuplaşmasının oluşmasını ve korunmasını sağlar. Bu iki rolü TJ komplekslerinin bariyer ve parmaklık fonksiyonu

olarak nitelendirilir. Üçüncü fonksiyonu ise BTB ile germ hücre yüzeyi üzerinde sistemik sirkülasyondan belirli antijenleri ayrı tutarak immünolojik bir bariyer oluşturmaktır (65).

Sertoli-Sertoli hücre bağlantılarının yanı sıra Sertoli hücre-spermatid bağlantılarının oluşumunun moleküler mekanizması tam olarak açıklanmamıştır. AJs komplekslerinde cadherin-cathenin sisteminin varlığı açıklanmış olmasına rağmen Sertoli hücre-spermatid bağlantılarındaki varlığı henüz tam bir netlik kazanmamıştır (52,65). Fakat yapılan son çalışmalarda Sertoli hücre-spermatid bağlantılarında cadherin-cathenin sisteminin lokalize olduğu öne sürülmektedir (65). Claudin-11, occludin, N-cadherin ve nectin-2 Sertoli-Sertoli hücre bağlantılarında bulunmaktadır (52,65). Sertoli hücre-spermatid bağlantılarının altında F-actin, nectin-2, nectin-3 ve afadinin kolokalize olduğu gösterilmiştir. Nectin-2 Sertoli hücrelerinde, nectin-3 spermatidlerde özel olarak yerleşim gösterir. Sertoli hücresindeki nectin-2 ve spermatidlerdeki nectin-3 arasında hetero-*trans*-dimer oluşumunun bulunduğu öne sürülmektedir. Nectin-bağlı yapıştırıcı membran mikrodomenleri Sertoli-spermatid bağlantılarında her F-actin yığını ile bire bir bağlandığını göstermektedir (39) (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. A. Testisin seminifer epitelyumundaki Sertoli hücre-Sertoli hücre ve Sertoli hücre-spermatid bağlantıları. Sertoli hücre-spermatid bağlantısındaki spermatid başını paralel dairelerle saran yığın şeklindeki F-actin. **B.** Sertoli hücre-spermatid bağlantısındaki Sertoli hücresindeki nectin-2 ve spermatiddeki nectin-3 yapılarının hetero-*trans*-dimer oluşumu. Nectin-bağlı yapıştırıcı membran domainleri her F-actin bandı ile bire bir bağlanmakta (39).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. EMBRİYOLARIN VE DOKULARIN ELDESİ

Bu çalışmada Erciyes Üniversitesi Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezinde (DEKAM) yetiştirilen 24 adet Wistar albino türü dişi sıçanlar kullanılmıştır. Kafesler içinde tutulan sıçanlara günün normal düzeninde 21 °C ve 12 saatlik aydınlık/karanlık ortamında su ve besin ihtiyaçları sağlanmıştır. 150-250 gr ağırlığındaki 4-10 aylık dişiler döllenme yeteneği olan erkeklerle bir kafese konulmadan önce vajinal smear alınarak estrus siklusuna bakıldı ve estrus ve proestrus periyodundaki dişiler bir gece boyunca (saat 17.00 ile 9.00 arası) erkek sıçan ile aynı kafeste tutulmuştur. Ertesi gün, vaginal plak belirlenen fareler 0,5 günlük gebe olarak kabul edildi ve ayrı bir kafese alınıp normal diyet ile beslendi. Gebe sıçanlar ketamin anestezi altında dekapite edilerek gebeliklerinin 14, 16, 18 ve 20. günlerde fetuslar çıkarıldı. Tüm prosedürler etik kurallara uygun bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

Hayatlarına son verilen gebe sıçanlardan alınan fetuslar %4'lük formaldehit, Bouin ve %4'lük paraformaldehit solüsyonlarında tespit edildi. Tespit solüsyonlarında 12'şer saat bekleyen fetuslar aşağıdaki tabloda ayrıntılı olarak verilmiş olan doku hazırlama metodu ile bloklanmıştır (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Işık mikroskobu doku hazırlama tekniği.

Sıra	Yapılan işlem	Süre
1	Musluk suyu	1 gece
2	%50 Alkol	1 saat
3	%70 Alkol	1 saat
4	%80 Alkol	1 saat
5	%96 Alkol	1 saat
6	Absolü Alkol	1 saat
7	Absolü Alkol	1 saat
8	Absolü Alkol	1 saat
9	%50 Ksilen- Alkol	10 dakika
10	%70 Ksilen-Alkol	10 dakika
11	Ksilen	20 dakika
12	Ksilen	20 dakika
13	Ksilen	20 dakika
14	Eriyik parafin	1 gece
15	Bloklama	

Bir gece akan musluk suyunda bırakılan fetuslar artan alkol serilerinden geçirilerek sudan kurtarıldı, ksilol ile şeffaflandırıldıktan sonra parafine gömülerek bloklandı. Alınan 5 µm’luk kesitler polilizin kaplı lamlara yayıldı. Hazırlanan lamlar standart histolojik yöntemler kullanılarak ksilol ile parafini uzaklaştırıldı ve dereceli alkol serilerinden geçirilip sulandırıldı. Genel histolojik yapıyı görmek amacıyla kesitler hematoksilin-eozin (H+E) (Tablo 3.2) ile boyanarak önce artan alkol serilerinden daha sonra ksilolden geçirilerek incelendi.

Tablo 3.2. Hematoksilen-Eozin boyama tekniği.

Sıra	Yapılan İşlem	Süre
1	Etüv (60 °C)	1 saat
2	Ksilen I	20 dakika
3	Ksilen II	20 dakika
4	Ksilen III	20 dakika
5	Absolu Alkol I	20 dakika
6	Absolu Alkol II	20 dakika
7	%96 Alkol	20 dakika
8	%80 Alkol	20 dakika
9	%70 Alkol	20 dakika
10	%50 Alkol	20 dakika
11	Akarsu	5 dakika
12	Hematoksilen	5-8 dakika
13	Akarsu	5 dakika
14	Eozin	3-5 dakika
15	Akarsu	5 dakika
16	%50 Alkol	10 dakika
17	%70 Alkol	10 dakika
18	%80 Alkol	10 dakika
19	%96 Alkol	10 dakika
20	Absolu Alkol I	10 dakika
21	Absolu Alkol II	10 dakika
22	Ksilen I	20 dakika
23	Ksilen II	20 dakika
24	Kapatma	

3.2. İMMUNOHİSTOKİMYA UYGULAMA

Deneydeki fetuslara ait timus dokularında nectin-2 molekülünü belirlemek için avidin-biotin-peroksidaz yöntemi ile immunohistokimya uygulandı. Bir gece 60°C’de tutulan önce ksilen sonra dereceli alkol serilerinden geçirilerek rehidrate edilen kesitler daha sonra fosfat tampon (PBS) ile 3 defa 5’er dakika yıkandı. Daha sonra antijen geri kazanımı için %5’lik sitrat tamponu ile mikrodalga fırında 600W’de 3X5 defa kaynatılan kesitler 20 dakika oda ısısında aynı tampon solüsyon içinde bekletildi. PBS ile tekrar yıkanan kesitler endojen peroksidaz aktivitesini engellemek için 5 dakika %3 hidrojen peroksit (H₂O₂) ile muamele edildi. Bundan sonraki aşamalar için ABC staining system (*Santa Cruz, sc-2023*) boyama kiti kullanıldı. Tekrar PBS ile yıkanan kesitlere antijenik alanların dışında kalan bölgelerin kapatılmasını sağlamak için oda sıcaklığında 20 dakika Blok serum uygulandı. Hemen ardından kesitler fare dokularına özgüllük gösteren keçi poliklonal birincil antikoru nectin-2 ile 1 gece +4°C’de bekledikten sonra 20 dakika inkübe edildi. Negatif kontrol olarak, birincil antikor yerine PBS kullanıldı. Yıkama işleminden sonra kesitler fare dokularına bağlanabilen biotin-sekonder antikor ile 30 dakika inkübe edildi ve ardından yıkama işlemi tekrarlandı. Daha sonra AB enzim ayracı ile 30 dakika muamele edilen kesitler yıkanarak immunreaktiviteyi görünür hale getirmek için diaminobenzidin (DAB) özelliği gösteren kitteki peroksidaz substrat ile 1-10 dakika muamele edildikten sonra 5 dakika deiyoinze H₂O ile yıkandı. Gill hematoksilen ile karşıt boyanan kesitler birkaç kez deiyoinze H₂O ile yıkandı. Son olarak artan alkol serileri ile suyu uzaklaştırılarak ksilenden geçirilen kesitler kapatma ortamı (*Entellan®, Merck*) ile kapatılarak ışık mikroskopunda incelendi. Boyama metodu aşağıdaki tabloda ayrıntılı olarak verilmiştir (Tablo 3.3). İmmun reaktivite açısından boyanan sıçan fetusuna ait timus dokularının değerlendirilmesi iki uzman histolog tarafından yapıldı. İmmunohistokimya uygulanan kesitlerdeki nectin-2 ekspresyonu görülmeyen negatif (-), zayıf reaksiyon (+), orta yoğunlukta reaksiyon (++) ve çok yoğun reaksiyon (+++) olarak değerlendirildi.

Tablo3.3. İmmünohistokimya boyama tekniği.

Sıra	Yapılan işlem	Süre	Sıra	Yapılan işlem	Süre
1	Etüv (60 °C)	1 saat	18	PBS	3x5 dk
2	Ksilen I	5 dk	19	Streptavidin Horse Radish Peroksidaz	10 dk
3	Ksilen II	5 dakika	20	PBS	3x5 dk
4	Ksilen III	5 dakika	21	DAB kromojen	3-5 dk
5	Absolü Alkol	10 dk	22	Distile su	Yıka
6	%96 Alkol	10 dk	23	Hematoksilen	3-4 dk
7	%80 Alkol	10 dk	24	Musluk suyu	5 dk
8	%70 Alkol	10 dk	25	Distile su	Yıka
9	Distile Su	3 kez yıka	26	%70 Alkol	5 dk
10	%5 Sitrat Buffer	10-20 dk	27	%80 Alkol	5 dk
11	PBS	2x5 dk	28	%96 Alkol	5 dk
12	%3 H2O2	5 dk	29	Absolü Alkol	5 dk
13	PBS	3x5 dk	30	Ksilen I	5 dk
14	Normal Serum	20 dk	31	Ksilen II	5 dk
15	Primer Antikor	Bir gece +4° C	32	Ksilen III	5 dk
16	PBS	3x5 dk	33	Kapatma	
17	Sekonder Antikor	30 dk			

4.BULGULAR

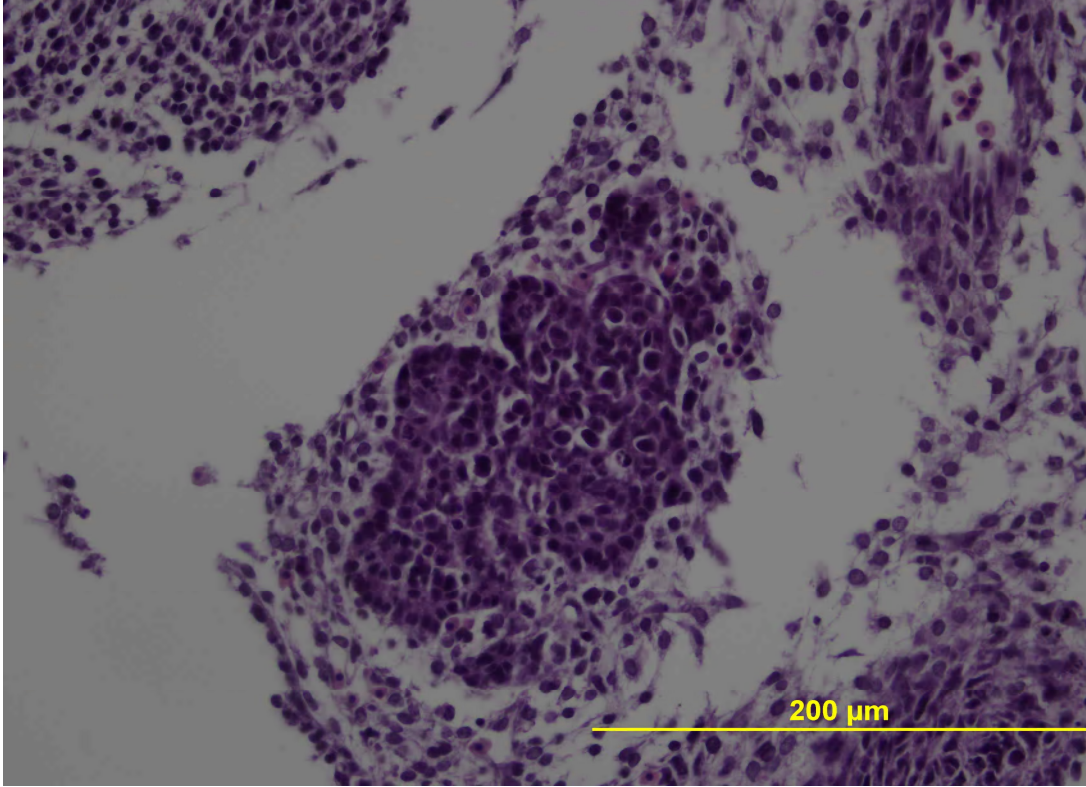
Ondört günlük sıçan fetus kesitlerindeki timus her iki boyama yönteminde de solit hücre kitlesi şeklinde izlendi ve dıştan bir bağ dokusu kapsülü ile çevrelendiği gözlemlendi. Bu gruba ait timus kesitlerinde lobulasyon gözlemlenmedi. Ayrıca korteks ve medulla ayrımı da yoktu. Timus taslağını oluşturan farklılaşmış epitelyal hücreler ve lenfoblastların asidofilik sitoplazması, bazofilik çekirdekleri belirgin bir şekilde gözlemlendi (Şekil 4.1). Bu dönemdeki immunohistokimya uygulanan timus stromasında nectin-2 ekspresyonu orta yoğunlukta reaksiyon (++) gösterdi (Şekil 4.2).

Onaltı günlük sıçan fetus kesitlerinde timusun bağ dokusuyla çevrelendiği, septaların lob ve lobülleri oluşturmaya başladığı gözlemlendi. Bu gruba ait timus kesitlerinde korteks ve medulla ayrımı yapılmaktaydı. Ayrıca kortekste bulunan timositlerin medulladaki timositlere göre bazofilik karakterinin artmış olduğu gözlemlendi (Şekil 4.3). İmmunohistokimya uygulanan kesitlerde timus stroması, 14 günlük timus stromasına kıyasla nectin-2 ekspresyonu daha zayıf reaksiyon (+) gösterdi (Şekil 4.4-5).

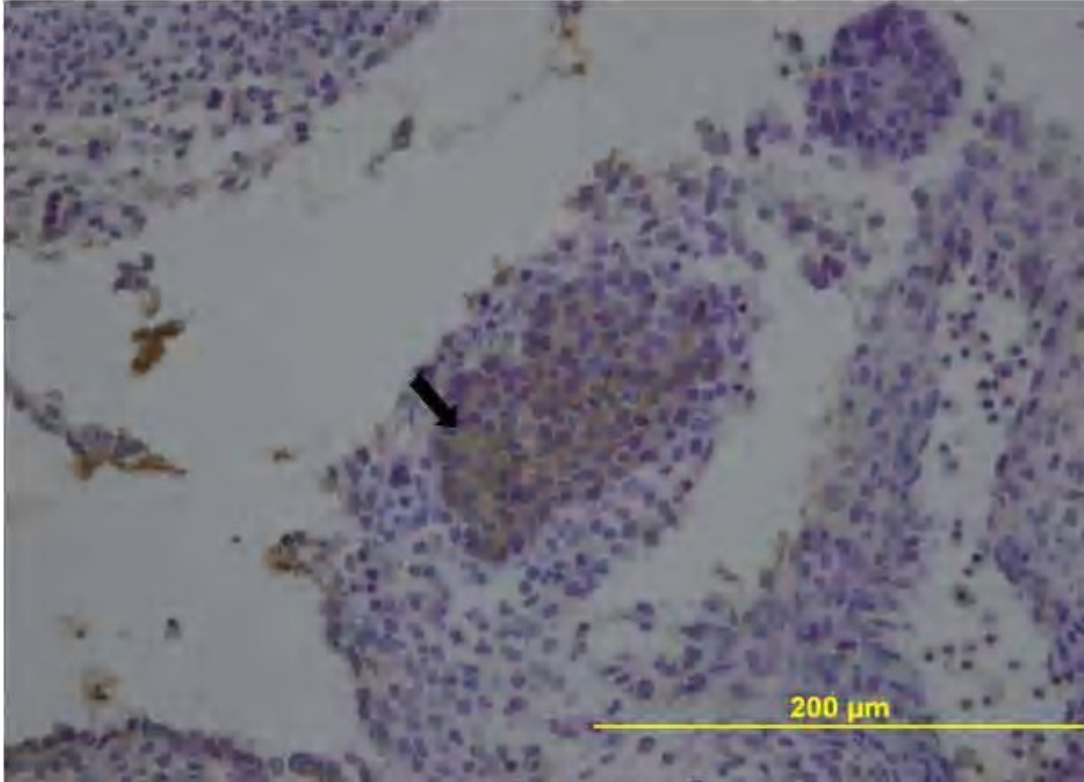
Onsekiz günlük sıçan fetus kesitlerinde bağ dokusu kapsülünün nispeten kalınlaşmış olduğu ve septumların timusu lob ve lobüllere ayırdığı gözlemlendi. Gelişimin ileri safhasında olmasından dolayı kortekste yer alan timositlerin bazofilik karakterinin ve mitotik aktivitesinin artmasıyla dokudaki korteks ve medulla ayrımı daha belirgindi. Hematoksilen-eozin boyanmış kesitlerde medulladaki timositlerin geniş hacimli olması nedeniyle medulla korteksten daha açık renkte olmasıyla ayırt edildi (Şekil 4.6). Bu

gruba ait immunohistokimya uygulanan kesitlerde timus stromasında nectin-2 ekspresyonu zayıf reaksiyon (+) göstermiştir (Şekil 4.7-8).

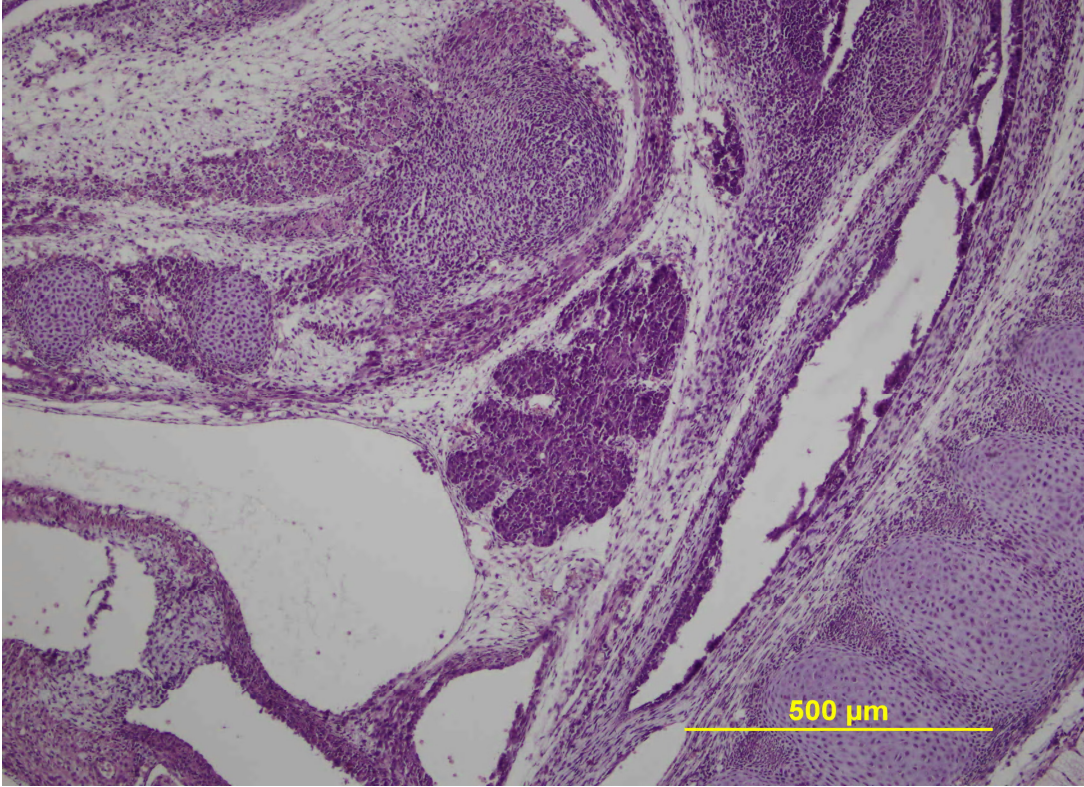
Yirmi günlük sıçan fetus kesitlerinde kapsülden organın içine giren bağ dokusu artışı mevcuttu. Korteks ve medulla ayrımı belirgindi. Ayrıca kortekste yer alan timositlerin birbirlerine daha yakın olduğu ve çekirdeklerinin kromatin yoğunluğundan dolayı koyu boyanmış olduğu gözlemlendi. Lobüllerin medullasındaki timositlerin azlığı sebebiyle epitelyal retiküler hücreleri rahatlıkla seçilebilmekteydi. Bu epitelyal retiküler hücreleri arasında az sayıda timositlere rastlandı (Şekil 4.9). Bu dönemdeki immunohistokimya uygulanan kesitlerde nectin-2 ekspresyonu orta yoğunlukta reaksiyon (++) gösterdi (Şekil 4.10-11). İmmunohistokimya uygulanan kesitlerde negatif kontrol olarak, birincil antikor yerine PBS kullanılmıştır (Şekil 4.12).



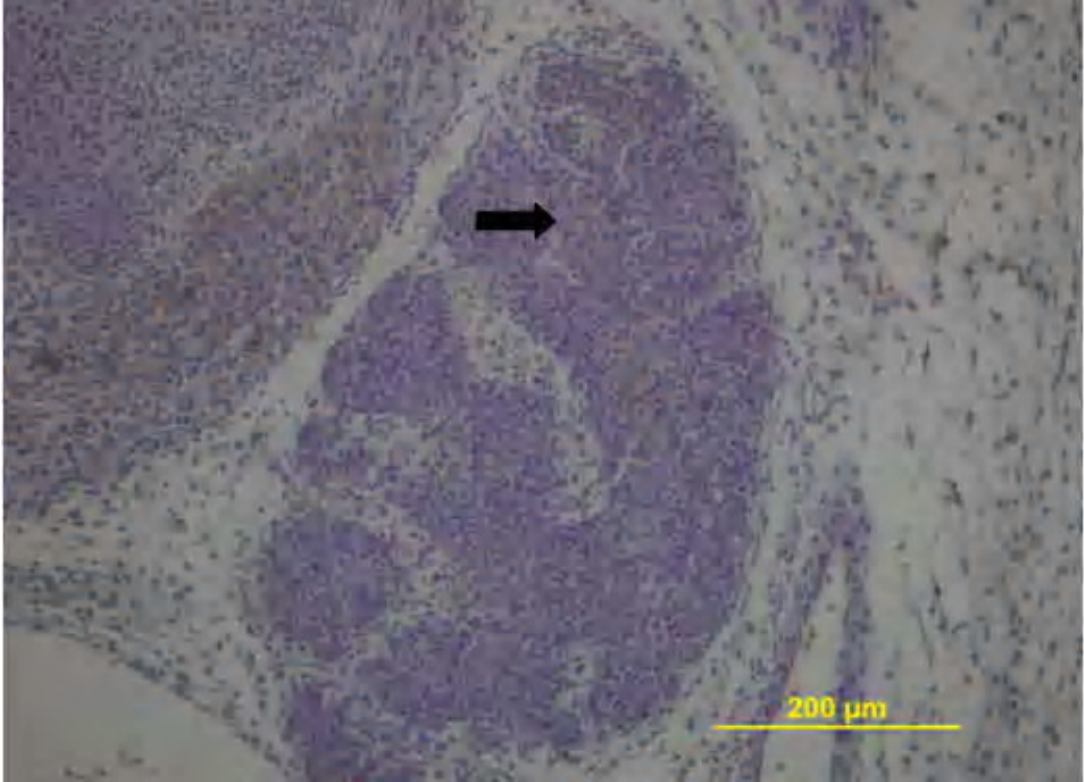
Şekil 4.1. 14 günlük sıçan timus görüntüsü (H+E, X40).



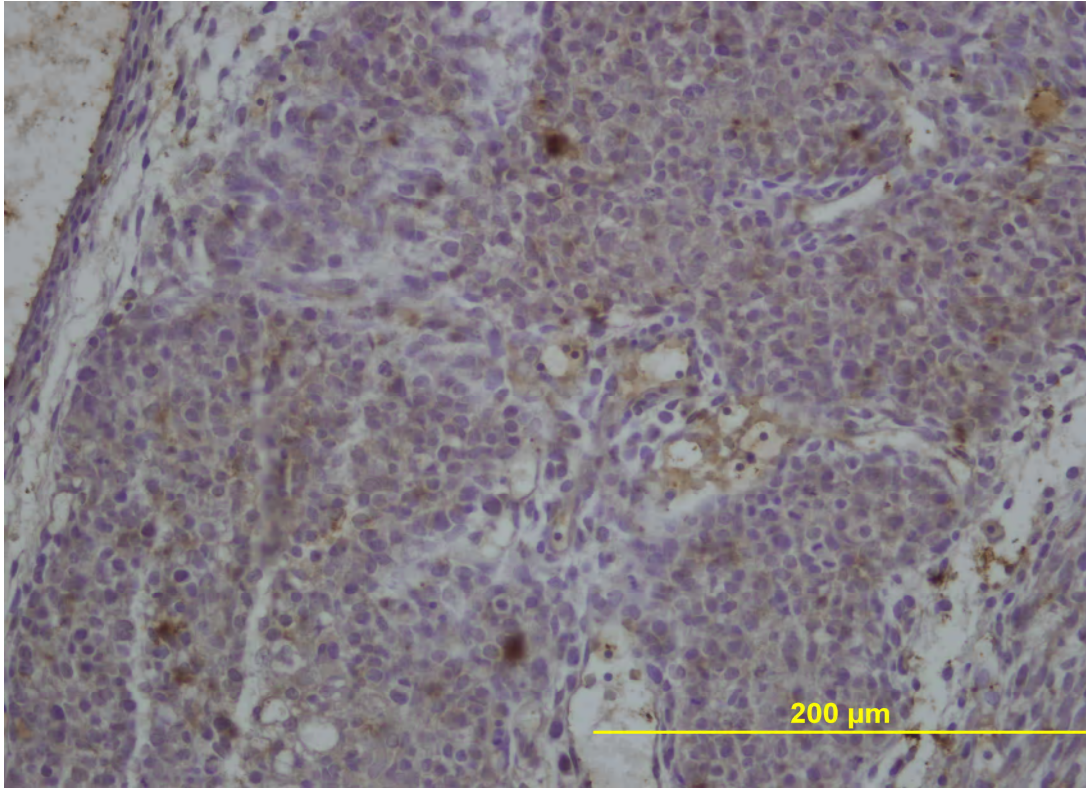
Şekil 4.2. 14 günlük sıçan timusunda nectin-2 ekspresyonu (siyah ok) (İmmunperoksidaz, X40).



Şekil 4.3. 16 günlük sıçan timus görüntüsü (H+E, X10).



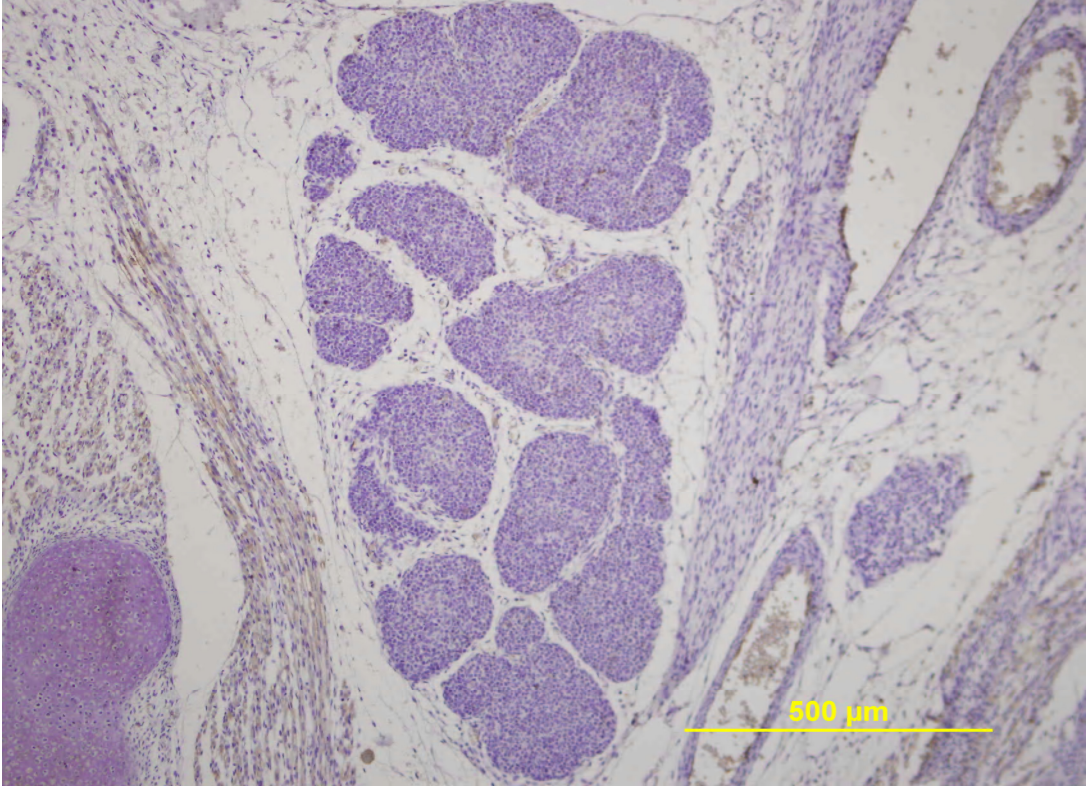
Şekil 4.4. 16 günlük sıçan timusunda nectin-2 ekspresyonu (siyah ok) (İmmunperoksidaz, X20).



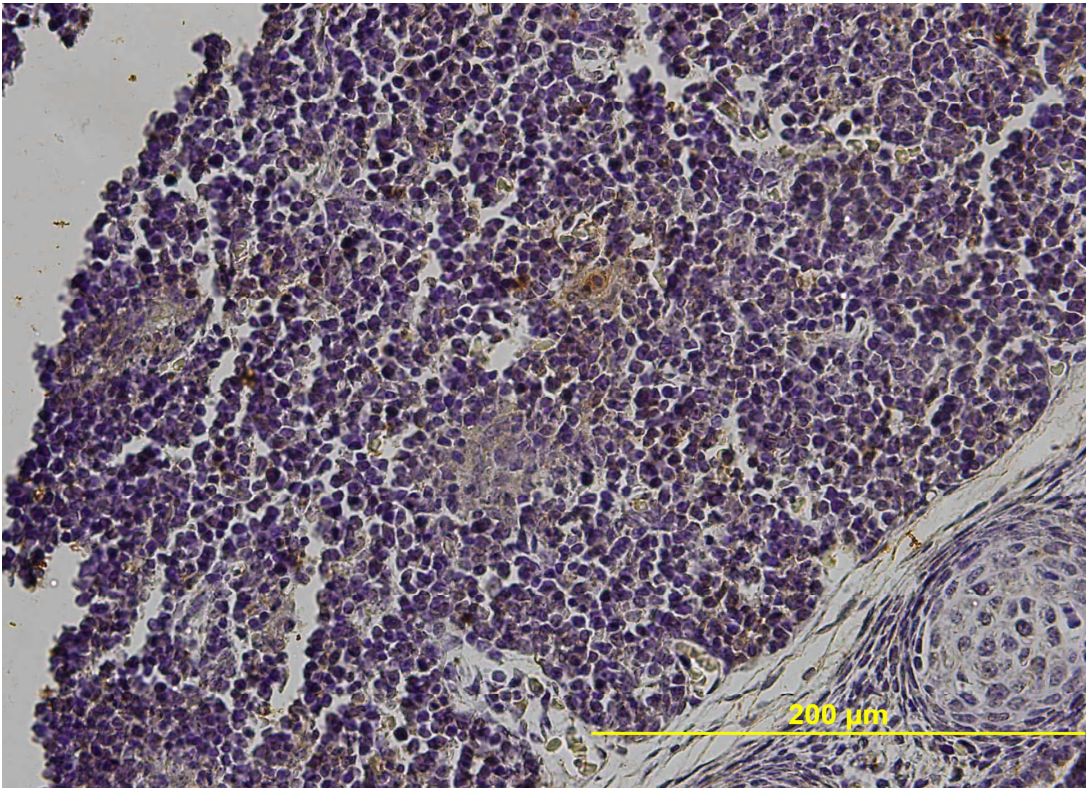
Şekil 4.5. 16 günlük sıçan timusunda nectin-2 ekspresyonu (İmmunperoksidaz, X40).



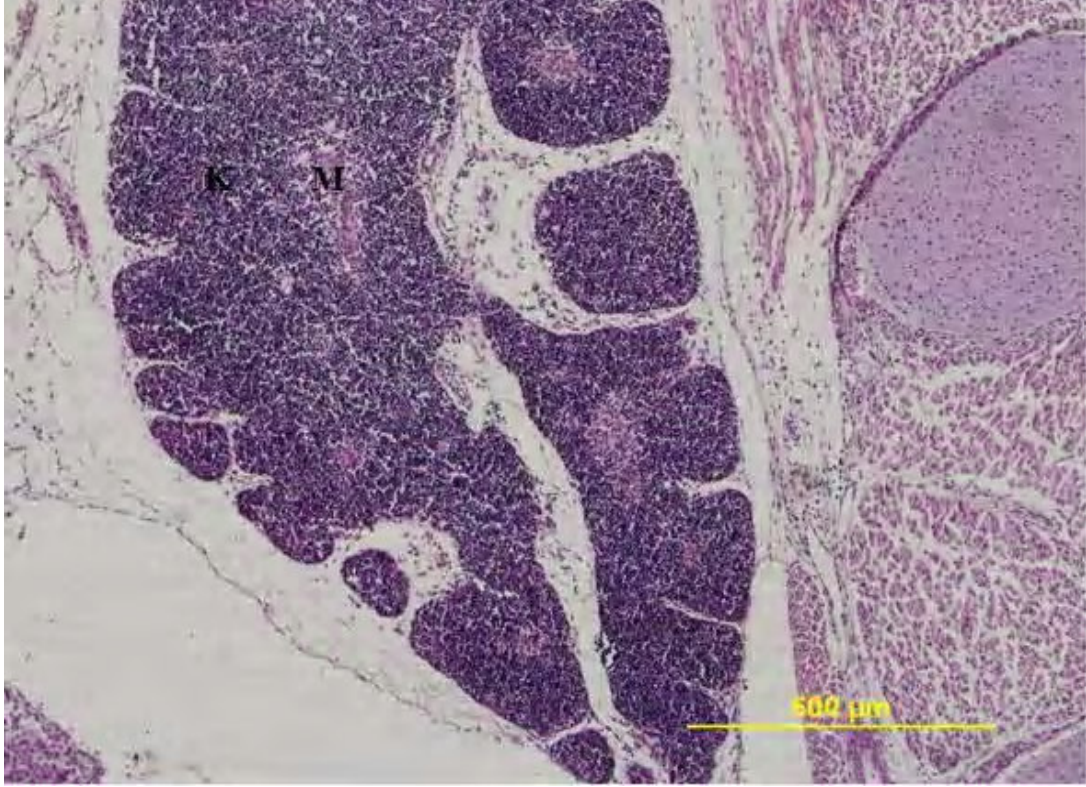
Şekil 4.6. 18 günlük sıçan timus lobül (L), septa (S) ve bağ dokusu kapsülü (ok) görüntüsü (H+E, X10).



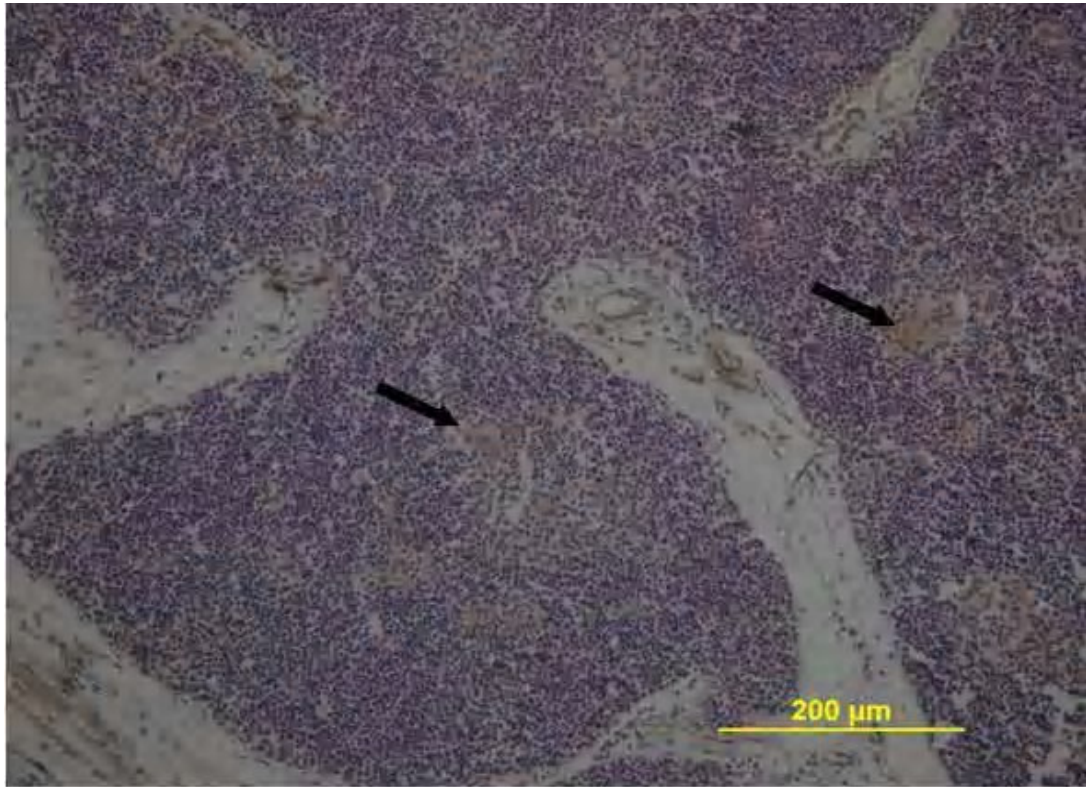
Şekil 4.7. 18 günlük sıçan timusunda nectin-2 ekspresyonu (İmmunperoksidaz, X10).



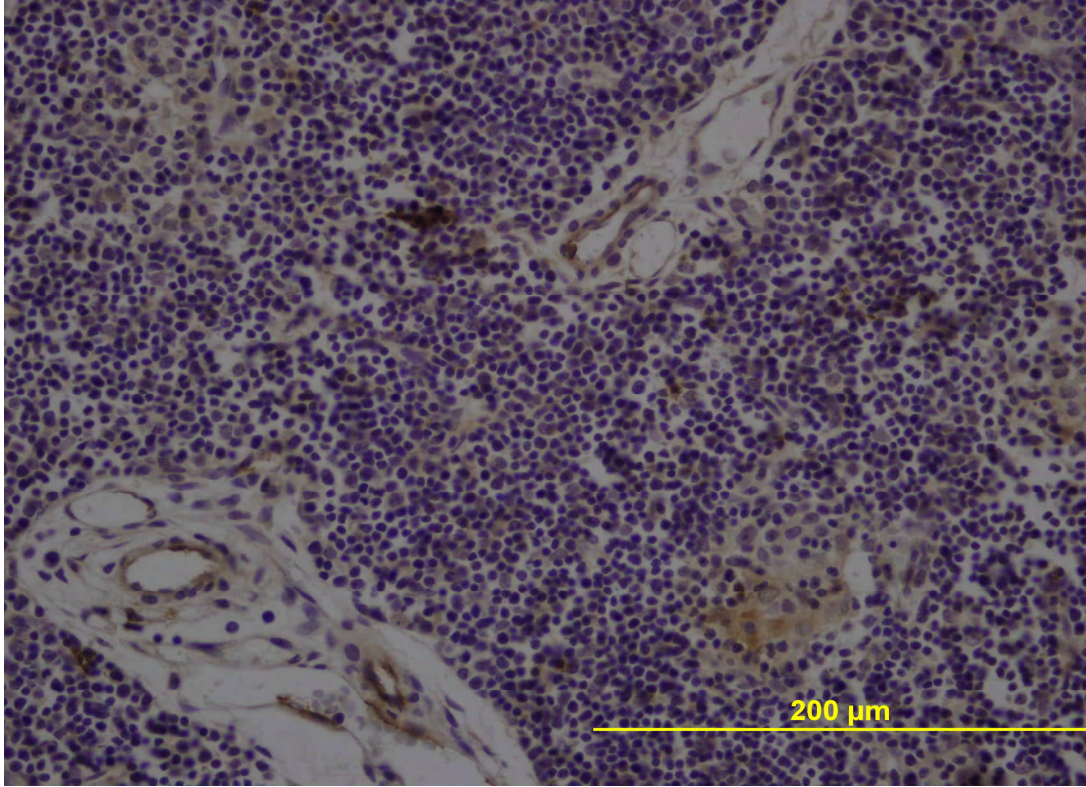
Şekil 4.8. 18 günlük sıçan timusunda nectin-2 ekspresyonu (İmmunperoksidaz, X40).



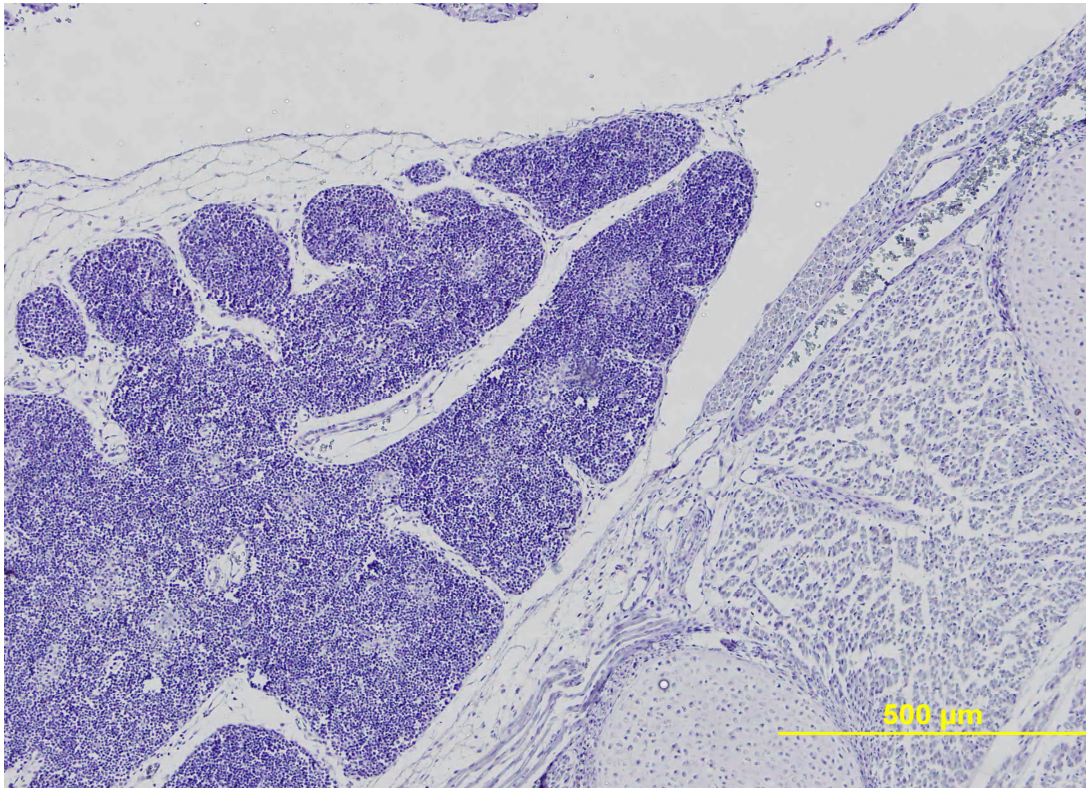
Şekil 4.9. 20 günlük sıçan timus korteks(K) ve medulla(M) görüntüsü (H+E, X10).



Şekil 4.10. 20 günlük sıçan timusunda nectin-2 ekspresyonu (siyah ok) (İmmunperoksidaz, X20).



Şekil 4.11. 20 günlük sıçan timusunda nectin-2 ekspresyonu (İmmunperoksidaz, X40).



Şekil 4.12. 20 günlük sıçan timusu negatif kontrol (İmmunperoksidaz, X10).

5.TARTIşMA VE SONUÇ

Endotelyal hücrelerle lökositler arasında adheziv etkileşimi sağlayan bir grup hücre yüzey molekülünün 1980'lerin ortalarından itibaren moleküler olarak saptanması, adezyon molekülleri ile ilgili bilgilerimizin hızla artmasına neden olmuştur. Daha sonraki yıllarda adezyon moleküllerinin, histogenez, embriyogenez, hücre büyümesi, hücre farklılaşması ve inflamasyon gibi olguların düzenlenmesinde görev aldıkları belirlenmiştir (66).

Hücre adezyon molekülleri değişik patolojik durumlarda da önemli rol oynamaktadır. Adezyon moleküllerinin potansiyel klinik ve terapötik kullanımlarını daha iyi değerlendirebilmek için yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Her iki alandaki bu çalışma sonuçları, adezyon moleküllerinin terapötik hedefleri konusunda bilgilerimizi artıracaktır (67).

Adezyon moleküllerinden olan nectin ailesinin hücre adezyonundaki rolü merak konusu olmuş ve bunun üzerine çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Mizoguchi ve arkadaşları (64) yetişkin sıçan hipokampusünün CA3 bölgesinde nectin-1, nectin-2, nectin-3 lokalizasyonunu incelemiştir. Nectin-1 ekspresyonu, CA3 bölgesindeki stratum lucidumda piramidal hücrelerin dendritik gövdesinde yoğun yassı diskler ve nokta şeklinde ayrıca strata radiatum ve orienste orta yoğunlukta çok küçük nokta şeklinde gözlenmiştir. Nectin-3 ekspresyonu stratum lucidumda yassı diskler, stratum radiatumda ve orienste küçük noktalar ve geniş çizgisel bir görüntü ile gösterilerek belirlenmiştir. Sonuç olarak nectin-1 ve nectin-3 sinapslardaki puncta adherentia

bağlantıların presinaptik ve postsinaptik bölgelerinde asimetrik olarak lokalize olduğu ortaya çıkarılmış ve bu durumda sinapsların oluşumunda nectin-afadin sisteminin önemli bir rol oynadığı kanıtlanmıştır. Nectin-2 ekspresyonu CA3 bölgesinde bulunmamaktadır (64). Başka bir çalışmada ise nectin-4'ün fare beyinde eksprese olduğu gösterilmiştir (61).

Ozaki-Kuroda ve arkadaşları (68) nectin-2^{-/-} farelerinde yaptıkları bir çalışmayla erkeğe özgü infertilite, sperm gelişim basamaklarında bozukluk, anormal mitokondri dağılımı ve çekirdek biçiminin bozulduğunu bildirmişlerdir (68,69). Bu durumda Sertoli hücre-spermatid bağlantılarında nectin-afadin sisteminin geniş bir yer aldığını, Sertoli-Sertoli hücre bağlantılarının ise bir çok hücrelerarası adezyon sisteminin işbirliği vasıtasıyla oluştuğu anlaşılmaktadır (39). Böylece nectin-2'nin Sertoli hücre-spermatid bağlantılarının oluşumu ve bakımı için temel bir faktör olduğu anlaşılmaktadır (52). Ek olarak nectin-2^{-/-} fare spermatozoalarının zona pellucidaya bağlanması ve oosit penetrasyonunda da bozukluk olduğu gözlenmiştir (70).

Bir başka çalışmada ise nectin-3^{-/-} fare testisinde Sertoli hücre-spermatid bağlantılarında bulunan nectin-2 eksikliğine bakıldığında nectin-3 ekspresyonu gözlenmemiştir. Sertoli hücre-spermatid bağlantılarında nectin-2 ekspresyonu gözlenmezken, Sertoli-Sertoli hücre bağlantılarında görülmektedir. Bu sonuçlar Sertoli hücre-spermatid bağlantılarında nectin-2'nin lokalizasyonu için nectin-3'ün var olması gerektiğini gösterirken, Sertoli-Sertoli hücre bağlantısında böyle bir durum söz konusu değildir (52).

Inagaki ve arkadaşları (71) yetişkin vahşi-tip farelerin siliyer cisimlerinde nectin-1 ve nectin-3 lokalizasyonu incelenmiştir. Nectin-1 ekspresyonunun, siliyer epitelin pigmentli ve pigmentsiz hücre tabakaları temas bölgelerinde ve ZO-1 ile kolokalize olduğu gözlenmiştir. Nectin-3 ve afadin ekspresyonu nectin-1, ZO-1 ve P-cadherin ile kolokalizidir. Nectin-2 ekspresyonu nectin-1, nectin-3, afadin, ZO-1 ve P-cadherin ekspresyonundan daha yoğun gözlenmiştir. Nectin-2 ekspresyonu apikolateral bağlantıların apikal tarafında daha yoğun gözlenirken, apeks-apeks bağlantı girişinde bulunmamaktadır. Böylece siliyer epitelin pigmentli ve pigmentsiz hücre tabakaları arasındaki apeks-apeks bağlantı adezyonuna nectin-1 ve nectin-3 katılırken, nectin-2'nin katılmadığı anlaşılmaktadır (71).

Nectin'in farklı dokulardaki ekspresyonu ile ilgili çalışmalar bildirilmiştir ancak timus gelişiminde nectin ekspresyonu ile ilgili çalışma bulunmamaktadır. Timus taslağını oluşturan hücreler ile T hücrelerinin farklılaşması ve çoğalması sırasında meydana gelen etkileşimlerde rol oynayan faktörlerin belirlenmesi üzerine çeşitli çalışmalar bulunmaktadır.

Timik mikroçevre sitokinler, timik hormonlar ve büyüme faktörleri gibi çözülebilir faktörleri salgılar, T hücrelerin farklılaşma ve çoğalmasında gerekli olduğu bilinen, MHC Tip I ve II yapıları T hücre repertuarı ve ekstrasellüler matriks üyelerinin şekillenmesinde gereklidir, bunlar hücre-hücre etkileşimine doğrudan aracılık yaparak katkıda bulunur (72).

Antijen bağımlı ve antijen bağımsız T lenfositlerin gelişimi ve işlevi sırasında önemli hücre-hücre etkileşimler meydana gelir. T lenfositler ile diğer hücre tiplerinin etkileşiminde adezyon molekülleri önemlidir. Timusun nonlenfoid bileşenleri sinyal salgılar ve bunlar T lenfositlerin farklılaşması ve çoğalmasında önemli bir rol oynar. Bunlar timik hormonların yanı sıra interlökinler ve koloni-uyarıcı faktör gibi sitokinlerdir. T lenfositlerin farklılaşma aşamalarında bu sitokinlerin rolü olduğu öne sürülmüştür (73).

Lökositlerin damarlardan geçmesinde başlıca CD44 ve selektinler rol oynarken, integrinlerin rolü tam olarak netlik kazanmamıştır. Kemokinler ise olgun hücrelerin oluşması, timik hücrelerin diğer dokulara göçü, timus içindeki T hücre göçü ve gelişimi sırasında önemli rol oynar. Kemokinler ayrıca timus içindeki projenitör hücrelerin göçünde de rol oynamaktadır (74). Kemokinlerden CXCL12 özellikle kapsül altı ve medullar bölgedeki timik epitelyal hücreler tarafından salgılanır ve olgunlaşmamış $CD4^- CD8^-$ ve $CD4^+ CD8^+$ hücrelerini etkilemektedir. CXCR4 özel reseptörü başlıca timosit gelişim aşamalarında eksprese edilir ve CXCL12 ile kapsül altı ve kortikomedullar bölgede etkileşim gösterdiği görülmüştür. Timik epitelyal hücreler olgun insan $TCR\alpha\beta^+$ timositlerin lokalizasyonunda ve göçünde, $TCR\gamma\delta^+$ veya kendi reseptörleri üzerinden doğal öldürücü hücrelerde CCL4, CCL11, CCL19, CCL21, CCL22, CXCL9, CXCL10 ve CXCL11 gibi kemokinleri üretmektedirler (75).

Timik epitelyal hücre kültürü üzerine yapılan bir çalışmada bu hücrelerin laminin, fibronektin ve Tip IV kollajen ürettiği gösterilmiştir. Timik mikroçevre hücreleri

tarafından üretilen timositlerin ekstrasellüler matriks etkileşiminde, göçünde ve apoptozisinde yer alan galectin-1, galectin-3 ve galectin-9 tanımlanmıştır (75).

Timus ve adezyon molekülleri üzerine yapılan bir çalışmada, insan timusundaki E-cadherin ekspresyonu incelenmiştir. Timik hücrelerin çoğalması sırasında gelişen timik epitelyal hücreler ile CD103⁺ timositler arasındaki E-cadherin bağlı etkileşim ele alınmıştır. Klasik Tip I cadherinler E-, N- ve P-cadherin'dir ve bunlar homofilik etkileşim yapmaktadır. Fakat E-cadherin ile integrin $\alpha_E(\text{CD103})\beta_7$ 'nin heterofilik etkileşim yaptığı belirlenmiştir. İntegrin $\alpha_E\beta_7$ deri ve bağırsakların, intraepitelyal T lenfositler üzerinde eksprese edilmiştir. Fakat periferik kan lenfositlerinde ve timusta gelişen T hücrelerinde çok az bir yüzde olarak bulunmaktadır. Yapılan flowsitometri analizi sonucunda, DN CD4⁻ CD8⁻ alt populasyonlarında ve olgun SP CD8⁺ timositlerinde CD103 E-cadherin ligandının bulunduğu anlaşılmıştır. İmmunofloresan uygulama sonucunda medullar epitelyal retiküler hücrelerde güçlü E-cadherin ekspresyonu görülmüştür. Bu hücrelerin sitoplazmalarında cadherin-catenin kompleksi oluşturmak için gerekli olan catenin'ler eksprese edilmiştir. İnsan timositlerinde homofilik etkileşimler meydana gelmediğinden E-cadherin eksprese edilmemiştir. Fakat E-cadherin ergin farelerin timositlerinde görülmezken, embriyonik döneminin 14-18 günleri arasında timositler ve epitelyal retiküler hücrelerde eksprese edildiği gözlenmiştir (76).

Çalışmamızda 14 günlük fetus timusu stromasında, 20 günlük fetus timusunun korteks ve medullasında nectin-2 ekspresyonu orta yoğunlukta reaksiyon göstermiştir. On altı günlük sıçan fetus timusu medullasında nectin-2 ekspresyonu zayıf reaksiyon göstermiştir. On sekiz günlük fetus kesitinde çevre dokularda nectin-2 ekspresyonu orta yoğunlukta reaksiyon gösterirken, timus stromasında nectin-2 ekspresyonu zayıf reaksiyon göstermiştir. Bu ekspresyon paterni bize timopoezis sırasında nectin-2'nin özellikle gelişimin erken ve geç dönemlerinde daha etkili bir rol oynadığını düşündürmektedir.

Timus organogenezi, nöroektoderm-kökenli nöral krest mezenkimi, endoderm-kökenli epitelyum ve mezoderm kökenli hemapoetik hücreler olmak üzere üç embriyonik germ tabakasının hücreleri arasındaki etkileşime bağlıdır. Birkaç çalışma gelişen timositler ve timik mikroçevre arasındaki etkileşimin sadece T hücrelerin gelişiminin

düzenlenmesinde değil, ayrıca korteks ve medulladaki olgun timik epitelyal mikroçevrelerin bakımı ve oluşumu içinde gerekli olduğunu öne sürmektedir (77,78).

Yapılan bir çalışmada sıçan fetus timusu gebeliğin 16, 18 ve 20. günlerinde incelenmiştir (77). Gebeliğin 16. gününde fetus timusunun doku kapsülü ile çevrelendiği ve lobulasyonun olmadığı gözlenmiştir. Gebeliğin 18. gününde doku kapsülünün oluşturduğu septanın dokuyu tam olmayan lobüllere ayırdığı, özellikle kortekste mitozun yoğun olduğu ve medullada birkaç epitelyal retiküler hücre gözlenmiştir. Gebeliğin 20. gününde lobulasyon belirgin olarak gözlenmiş ve epitelyal retiküler hücreler medullada açık bir şekilde ayırt edilmiştir (77).

Çalışmamızda da 14 günlük fetus timus dokusu dıştan bir bağ dokusu kapsülü ile çevrelendiği gözlemlendi. Fakat lobulasyon görülmedi. Gebeliğin 16. gününde fetus timusunun bağ dokusu kapsülü ile çevrili olduğu ve lobulasyonun oluşmaya başladığı fark edildi. Gebeliğin 18. gününde bağ dokusu kapsülünün nispeten kalınlaşmış olduğu ve septaların timusu lob ve lobüllere ayırdığı gözlemlendi. Gelişimin ileri safhasında olmasından dolayı kortekste yer alan timositlerin bazofilik karakterinin ve mitotik aktivitesinin artmasıyla dokudaki korteks ve medulla ayrımı daha belirgindi. Gebeliğin 20. gününde kapsülden organın içine giren bağ dokusu artışı mevcuttu. Korteks ve medullada yer alan epitelyal retiküler hücreler kolayca ayırt edilebiliyordu.

Nectin ekspresyonu üzerine yapılan çalışmalarda, dokudaki bağlantı kompleksleri olan AJs, TJs ve DSs'larda nectin'in hücre adezyon molekülü olarak görev yaptığı anlaşılmaktadır. Bu durumda nectin-2 ekspresyonu dokunun stromasını oluşturan hücrelerin bu bağlantı komplekslerinden AJs kompleksini bulundurmamasından, Tip III ve Tip IV epitelyal retiküler hücrelerin birbirleri arasında, kan-timus bariyeri oluşumuna katılan Tip I epitelyal retiküler hücrelerin oluşturduğu TJs komplekslerini bulundurmasından, Tip II ve Tip V epitelyal retiküler hücreler arasında yer alan DSs'ı içermesinden dolayı nectin-2 ekspresyonunun timusun farklı gelişim evrelerinde farklı reaksiyonda gözlemlendiği sonucuna varılabilir. Sonuçlarımızın immunoelektron, immunofloresan, western-blott ve PCR gibi yöntemler ile daha detaylı düzeyde araştırılması gerekmektedir.

6.KAYNAKLAR

1. Darka Ö. Hücre Adezyon Molekülleri ve Enflamasyondaki Roller. T Klin Mikrobiyoloji Enfeksiyon 2003; 2: 36-43.
2. Takai Y, Nakanishi H. Nectin and afadin: novel organizers of intercellular junctions. Journal of Cell Science 2003; 116: 17-27.
3. Eşrefoğlu M. Özel Histoloji. 1. Baskı Medipres Yayıncılık. Malatya 2009; 21-47.
4. Junqueira LC, Carneiro J. Temel Histoloji (Çeviri editörü: Aytekin Y, Solakoğlu S.). Nobel Tıp Kitapevleri. İstanbul 2006; 260-287.
5. Maret A, Bourdeau I, Ding C, et al. Expression of *GCMB* by Intrathymic Parathyroid Hormone-Secreting Adenomas Indicates Their Parathyroid Cell Origin. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 2004; 89(1): 8–12.
6. Ewijk WV, Holländer G, Terhorst C, et al. Stepwise development of thymic microenvironments in vivo is regulated by thymocyte subsets. Development 2000; 127: 1583-1591.
7. Zhang L, Sun L, Zhao Y. Thymic epithelial progenitor cells and thymus regeneration: an update. Cell Research 2007; 17: 50-55.
8. Klug DB, Carter C, Gimenez-Conti IB, et al. Cutting Edge: Thymocyte-Independent and Thymocyte-Dependent Phases of Epithelial Patterning in the Fetal Thymus. J Immunol 2002; 169: 2842-2845.
9. Suniara RK, Jenkinson EJ, Owen JJT. An Essential Role for Thymic Mesenchyme in Early T Cell Development. J Exp Med 2000; 191: 1051–1056.

10. Özbal Y. Lenfosit. Erciyes Üniversitesi Yayınları, Kayseri 1999; No: 117.
11. Shackelford GD, McAlister WH, Louis MD. The aberrantly positioned thymus a cause of mediastinal or neck masses in children. 1974; 120: 291-296.
12. Gaudecker BV. The development of the human thymus microenvironment. Curr.Top.Pathol. 1986; 75: 1-41.
13. T.W. Sadler Susceptible Periods during Embryogenesis of the Heart and Endocrine Glands. Environ Health Perspect 2000; 108(13) : 555-556.
14. Blackburn CC, Manley NR. Developing a new paradigm for thymus organogenesis. Nature Publishing Group 2004; 4: 278-289.
15. Barthlott T, Keller MP, Krenger W, Holländer GA. A short primer on early molecular and cellular events in thymus organogenesis and replacement. Swiss Med WKLY 2006; 136: 365–369.
16. Gordon J, Wilson VA, Blair NF, et al. Functional evidence for a single endodermal origin for the thymic epithelium. Nature Immunology 2004; 5: 546–553.
17. Kuratani S. Craniofacial development and the evolution of the vertebrates: the old problems on a new background. Zoological science 2005; 22: 1-19.
18. Le Lèvre CS, Le Douarin NM. Mesenchymal derivatives of the neural crest: analysis of chimaeric quail and chick embryos. J Embryol Exp Morph 1975; 34: 125-154.
19. Wallin J, Eibel H, Neubüser A, et al. Pax1 is expressed during development of the thymus epithelium and is required for normal T-cell maturation. Development Germany 1996; 122: 23-30.
20. Anderson G, Jenkinson EJ, Moore NC, Owen JJT. MHC class II-positive epithelium and mesenchyme cells are both required for T-cell development in the thymus. Nature 1993; 362: 70-73.
21. Bevan MJ. In Thymic Selection, Peptide Diversity Gives and Takes Away. Immunity 1997; 7: 175–178.
22. Lo D, Reilly CR, Burkly LC, et al. thymic stromal cell specialization and the T-cell receptor repertoire. Immunologic research 1997; 16: 3-14.
23. Mandel T. The development and structure of Hassall's Corpuscles in the guinea pig. Zeitschrift für Zellforschung 1968; 89: 180-192.
24. Irving L, Weissman MD. Thymus cell migration. Palo Alto 1967; 28-31.

25. Unur E, Ülger H, Ekinçi N. Anatomi. 1. Baskı Ufuk Kitap, Kırtasiye-Yayıncılık Tic.Ltd.Şti. Kayseri 2002; 139.
26. Human anatomy. Erişim [http://www.theodora.com/anatomy/the_thymus.html] Erişim tarihi: 17.12.2010.
27. Rat anatomy. Erişim. [http://www.biologycorner.com/worksheets/rat_head.html] Erişim tarihi: 17.12.2010.
28. Han BK, Suh YL, Yoon HK. Thymic ultrasound. *Pediatr Radiol* 2001; 31: 474-479.
29. Chan C, Sainte-Marie G. Distribution and morphology of the subcapsular and reticular cells of the ten-week-old rat thymus. *J Anat* 1968; 102: 477-491.
30. Darbyshore PJ, Lilleyman JS. Granular acute lymphoblastic leukemia of childhood: A morphologic phenomenon. *J Clin Pathol* 1987; 40: 251.
31. Brunning RD, Borowitz M, Matutes E, et al. Precursor B lymphoblastic leukemia/lymphoblastic lymphoma& Precursor T lymphoblastic leukemia/lymphoblastic lymphoma. In Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, ed. *Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue*. Lyon IARC 2001; 111-117.
32. Owen JJT, Raff MC. Studies on the differentiation of the thymus-derived lymphocytes. 1970; 1216-1232.
33. Vicente A, Varas A, Sacedon R, Zapata AG. Histogenesis of the Epithelial Component of Rat Thymus: An Ultrastructural and immunohistological Analysis. *The Anatomical Record* 1996; 244: 506-519.
34. Junqueira LC, Carneiro J. Temel Histoloji (Çeviri editörü: Aytekin Y, Solakoğlu S.). Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul 2006; 97-100.
35. Mılicevic NM, Mılicevic Z, Colic M, Mujovic S. Ultrastructural study of macrophages in the rat thymus, with special reference to the cortico-medullary zone. *J Anat* 1987; 150: 89-98.
36. Angst BD, Marcozzi C, Magee AI. The cadherin superfamily: diversity in form and function. *Journal of Cell Science*. Milan 114; 4: 629-664.
37. Sakisaka T, Takai Y. Biology and pathology of nectins and nectin-like molecules. *Current Opinion in Cell Biology* 2004; 16: 513-552.
38. Miyoshi J, Takai Y. Nectin and Nectin-Like Molecules: Biology and Pathology. *Am J Nephrol* 2007; 27: 590-604.

39. Takai Y, Nahanishi H. Nectin and afadin: novel organizers of intercellular junctions. *Journal of Cell Science* 2003; 116: 17-27.
40. Ikeda W, Nakanishi H, Miyoshi J, et al. Afadin: A Key Molecule Essential for Structural Organization of Cell–Cell Junctions of Polarized Epithelia during Embryogenesis. *The Journal of Cell Biology* 1999; 146: 1117–1131.
41. Farquhar MG, Palade GE. Junctional complexes in various epithelia. *The journal of cell biology* 1963; 17: 375-412.
42. Tsukita S, Furuse M, Itoh M. Multifunctional strands in tight junctions. *Molecular cell biology* 2001; 2: 285-293.
43. Bazzoni G, Martí´nez-Estrada OM, Orsenigo F, et al. Interaction of Junctional Adhesion Molecule with the Tight Junction Components ZO-1, Cingulin, and Occludin. *The journal of biological chemistry* 2000; 275: 20520-20526.
44. Kuramitsu K, Ikeda W, Inoue N, et al. Novel role of nectin: implication in the co-localization of JAM-A and claudin-1 at the same cell–cell adhesion membrane domain. *Genes to Cells* 2008; 13: 797–805.
45. Takai Y, Irie K, Shimizu K, et al. Nectins and nectin-like molecules: Roles in cell adhesion, migration, and polarization. *Cancer Sci* 2003; 94: 655–667.
46. Aberle H, Schwartz H, Kemler R. Cadherin-Catenin Complex: Protein Interactions and Their Implications for Cadherin function. *Journal of Cellular Biochemistry* 1996; 61: 514-523.
47. Gumbiner BM. Regulation of Cadherin Adhesive Activity. *The Journal of Cell Biology* 2000; 148: 399–403.
48. Panos Z, Reynolds AB. The p120 catenin family: complex roles in adhesion, signaling and cancer. *Journal of Cell Science* 2000; 113: 1319-1334.
49. Geiger B, Ginsberg D. The Cytoplasmic Domain of Adherens-Type Junctions. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 1991; 20: 1-6.
50. Honda T, Shimizu K, Kawakatsu T, et al. Antagonistic and agonistic effects of an extracellular fragment of nectin on formation of E-cadherin-based cell-cell adhesion. *Genes to Cells* 2003; 8: 51–63.
51. Sakisaka T, Ikeda W, Ogita H, et al. The roles of nectins in cell adhesions: cooperation with other cell adhesion molecules and growth factor receptors. *Current Opinion in Cell Biology* 2007; 19: 593–602.

52. Inagaki M, Irie K, Ishizaki H, et al. Role of cell adhesion molecule nectin-3 in spermatid Development. *Genes to Cells* 2006; 11: 1125–1132.
53. Takahashi K, Nakanishi H, Miyahara M, et al. Nectin/PRR: An Immunoglobulin-like Cell Adhesion Molecule Recruited to Cadherin-based Adherens Junctions through Interaction with Afadin, a PDZ Domain-containing Protein. *The Journal of Cell Biology* 1999; 145(3): 539-549.
54. Mandai K, Nakanishi H, Satoh A, et al. Afadin: A Novel Actin Filament-binding Protein with One PDZ Domain Localized at Cadherin-based Cell-to-Cell Adherens Junction. *The Journal of Cell Biology* 1997; 139(2): 517–528.
55. Mandai K, Nakanishi H, Satoh A, et al. Ponsin/SH3P12: An I-Afadin- and Vinculin-binding Protein Localized at Cell-Cell and Cell-Matrix Adherens Junctions. *The Journal of Cell Biology* 1999; 144(5): 1001-1017.
56. Fukuhara A, Irie K, Nakanishi H, et al. Involvement of nectin in the localization of junctional adhesion molecule at tight junctions. *Oncogene* 2002; 21: 7642-7655.
57. Tanaka Y, Nakanishi H, Kakunaga S, et al. Role of Nectin in Formation of E-Cadherin-based Adherens Junctions in Keratinocytes: Analysis with the N-Cadherin Dominant Negative Mutant. *Molecular Biology of the Cell* Vol 2003; 14: 1597–1609.
58. Morrison ME, Racaniello VR. Molecular Cloning and Expression of a Murine Homolog of the Human Poliovirus Receptor Gene. *Journal of Virology* 1992; 66: 2807-2813.
59. Warner MS, Geraghty RJ, Martinez VM, et al. A Cell Surface Protein with Herpesvirus Entry Activity (HveB) Confers Susceptibility to Infection by Mutants of Herpes Simplex Virus Type 1, Herpes Simplex Virus Type 2, and Pseudorabies Virus. *Virology* 1998; 246: 179–189.
60. Satoh-Horikawa K, Nakanishi H, Takahashi K, et al. Nectin-3, a New Member of Immunoglobulin-like Cell Adhesion Molecules That Shows Homophilic and Heterophilic Cell-Cell Adhesion Activities. *The Journal of Biological Chemistry* 2000; 275: 10291–10299.
61. Reymond N, Fabre S, Lecocq E, et al. Nectin4/PRR4, a New Afadin-associated Member of the Nectin Family That Trans-interacts with Nectin1/PRR1 through V Domain Interaction. *The Journal of Biological Chemistry* 2001; 276: 43205–43215.
62. Shimizu K, Takai Y. Roles of the Intercellular Adhesion Molecule Nectin in Intracellular Signaling. *J Biochem* 2003; 134: 631–636.

63. Gumbiner BM. Cell Adhesion: The Molecular Basis of Tissue Architecture and Morphogenesis Cell 1996; 84: 345–357.
64. Mizoguchi A, Nakanishi H, Kimura K, et al. Nectin: an adhesion molecule involved in formation of synapses. The Journal of Cell Biology 2002; 156: 555–565.
65. Cheng CY, Mruk DD. Cell Junction Dynamics in the Testis: Sertoli-Germ Cell Interactions and Male Contraceptive Development. Physiol Rev 2002; 82: 825–874.
66. Güç D. Adezyon molekülleri. Ankem Derg 2004; 18(2): 158-163.
67. Terekeci H, Şahan B, Top C. Hücre adezyon molekülleri. Nobel Med 2008; 4(1): 4-10.
68. Ozaki-Kuroda K, Nakanishi H, Ohta H, et al. Nectin Couples Cell-Cell Adhesion and the Actin Scaffold at Heterotypic Testicular Junctions. Current Biology 2002; 12: 1145–1150.
69. Bouchard MJ, Dong Y, Brian M, et al. Defects in Nuclear and Cytoskeletal Morphology and Mitochondrial Localization in Spermatozoa of Mice Lacking Nectin-2, a Component of Cell-Cell Adherens Junctions. Molecular and Cellular Biology 2000; 20: 2865–2873.
70. Mueller S, Rosenquist TA, Takai Y, et al. Loss of Nectin-2 at Sertoli-Spermatid Junctions Leads to Male Infertility and Correlates with Severe Spermatozoan Head and Midpiece Malformation, Impaired Binding to the Zona Pellucida, and Oocyte Penetration. Biology of Reproduction 2003; 69: 1330–1340.
71. Inagaki M, Irie K, Ishizaki H, et al. Roles of cell-adhesion molecules nectin 1 and nectin 3 in ciliary body development. Development 2005; 132: 1525-1537.
72. Screpanti I, Modesti A, Gulino A. Heterogeneity of thymic stromal cells and thymocyte differentiation: a cell culture approach. Journal of Cell Science 1993; 105: 601-606.
73. Singer KH. Interactions Between Epithelial Cells and T Lymphocytes: Role of Adhesion Molecules. Journal of Leukocyte Biology 1990; 48: 367-374.
74. Schwarz BA, Bhandoola A. Trafficking from the bone marrow to the thymus: a prerequisite for thymopoiesis. Immunological Reviews 2006; 209: 47–57.
75. Savino W, Mendes-da-Cruz D, Smaniotto S, Silva-Monteiro E, Villa-Verde MS. Molecular mechanisms governing thymocyte migration: combined role of chemokines and extracellular matrix. J Leukoc Biol. 2004; 75: 951–961.
76. Kutlesa S, Wessels JT, Speiser A, et al. E-cadherin-mediated interactions of thymic epithelial cells with CD103+ thymocytes lead to enhanced thymocyte cell proliferation. Journal of Cell Science 2002; 115: 4505-4515.

77. Sonmez MF, Colakoglu N, Kukner A, Ozan E, Dabak DO. Immunolocalization of TGF- β 2 in the rat thymus during late stages of prenatal development. *Acta histochemica* 2009; 111: 68-73.
78. Jiang X, Rowitch DH, Soriano P, McMahon AP, Sucov HM. Fate of the mammalian cardiac neural crest. *Development* 2000; 127: 1607-1616.

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Gaziantep ili Şehitkamil ilçesinde doğdu. İlkokul, orta ve lise öğretimini Gaziantep’de tamamladı. 2003 yılında kazandığı Erciyes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden 2007 yılında mezun oldu. 2007 yılında Sağlık Bilimleri Enstitüsü’ne bağlı olarak Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim dalında lisansüstü öğretime başladı. 2007 yılında aynı bölümde biyolog olarak çalışmaya başladı. Halen aynı üniversitede çalışmakta ve lisansüstü öğretime devam etmektedir.