

2020

DOKTORA TEZİ

Seda OCAKLI



T.C.

ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**UBİKÜTİN PROTEAZOM SİSTEMİ (UPS)
PROTEİNLERİNİN İNSAN SPERM KAPASİTASYON VE
AKROZOMAL REAKSİYONDAKİ ROLÜ VE
FERTİLİZASYONA ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Seda OCAKLI

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ PROGRAMI

Ankara, 2020

T.C.
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**UBİKÜTİN PROTEAZOM SİSTEMİ (UPS)
PROTEİNLERİNİN İNSAN SPERM KAPASİTASYON ve
AKROZOMAL REAKSİYONDAKİ ROLÜ ve
FERTİLİZASYONA ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Seda OCAKLI

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ PROGRAMI

**Bu araştırma; Tübitak Lisanüstü Araştırma Burs programı
kapsamında 2214-A Yurt dışı doktora sırası araştırma burs
programı ile desteklenmiştir.**

Ankara, 2020

T.C.
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ubikütün Proteazom Sistemi (UPS) Proteinlerinin İnsan Sperm Kapasitasyon ve
Akrozomal Reaksiyondaki Rolü ve Fertilizasyona Etkisinin Belirlenmesi

Seda OCAKLI

DOKTORA TEZİ

22.06.2020

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Sevil ÇAYLI

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Sevil ÇAYLI

Prof. Dr. H. Meltem ÖZGÜNER

Prof. Dr. A. Çevik TUFAN

Prof. Dr. Oya EVİRGİN

Prof. Dr. Mete KÖKSAL

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

Prof.Dr. Seyfullah Oktay ARSLAN

Enstitü Müdürü

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

BEYAN

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

22/06/2020

Seda OCAKLI



TEŞEKKÜR

Akademik hayata adım attığım ilk günden itibaren kendisi ile çalışma fırsatı bulduğum, hem yüksek lisans hem de doktora eğitimimde öğrencisi olma şansına sahip olduğum, beni her alanda özgür bırakarak engin bilgilerini ve derin bilimsel bakış açısını her fırsatta benimle paylaşan ve her fırsatta maddi ve manevi desteğini benden esirgemeyen gerçek bir bilim insanı olarak her zaman örnek aldığım, hayatıma kattıkları ile benim için danışman hocadan çok daha fazlasını ifade eden sayın hocam Prof.Dr. Sevil ÇAYLI'ya derin teşekkürlerim gönül ve vefa borcudur. Aynı zamanda laboratuvarında 1 yıl süre ile tezimin çalışmalarını yapma fırsatı bulduğum, tezimin konusunu ve çalışmalarında ki metodu belirlemede yardımlarını esirgemeyen Prof.Dr. Peter SUTOVSKY'e de teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Doktora eğitimim de kendisinden aldığım dersler ile akademik bilgime derin bilgiler kattığım, hayata yönelik pozitif bakış açısı ile örnek aldığım, akademik ve sosyal hayat için verdiği öğütleri hiçbir zaman unutmayacağım sevgili hocam Prof.Dr. Meltem ÖZGÜNER'e, kendisinden ders alma fırsatımın olduğu ve de özellikle embriyoloji derslerinde anlamakta güçlük çektiğim en karmaşık konuların bile sade ve anlaşılır anlatım diliyle hala kulağımda olduğu saygıdeğer hocam A. Çevik TUFAN'a da sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Amerika'daki deneysel çalışmalarında beni yönlendiren ve deneylerimi yapmamda bana yardımcı olan Karl KERNS'e, AYBÜ Histoloji ve Embriyoloji Anabilim dalında görevli tüm hoca, asistan ve öğrencilere ve de tezimin çalışmalarında bana her zaman destek olan doktora öğrencisi Gülben AKCAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Son olarak beni bu hayatta hiç yalnız bırakmayan, bu süreçte ki desteklerini hep gurur ile anacağım sevgili Annem ve Babam'a, Kızkardeşlerime, akademik hayatın dışında olmasına rağmen bana verdiği destekleri ile akademik hayat ve doktora sürecinin tüm kurallarını ve inceliklerini öğrenen eşime ve beni her zaman sabırla bekleyen oğlum Kerem, Aras ve doğmamış bebeğim Hazar'a sonsuz teşekkürler...

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	v
ABSTRACT	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Spermatogenez	5
2.1.1. Olgun Spermin Yapısı.....	10
2.2. Fertilizasyon Sürecinde Spermin Rolü.....	12
2.2.1. Sperm Kapasitasyonu	13
2.3. Ubikütin Proteazom Sistemi.....	18
2.3.1. Fertilizasyon ve Kapasitasyon Süresince UPS ve Proteazomun Rolü.....	19
2.4. Valosin İçeren Protein (p97/VCP)	25
2.4.1. p97/VCP ile İlişkide Olan Proteinler ve Fonksiyonları.....	26
2.5. NEDD4-like ubiquitin ligase 2 (NEDL2)	27
2.6. Postacrosomal sheath WW domain-binding proteini (PAWP)	27
3. MATERYAL VE YÖNTEM	29
3.1. Materyal	29
3.1.1. Kimyasallar ve ait olduğu kaynaklar	29
3.1.2. Antikorlar, Ait oldukları Kaynaklar ve Kullanım Oranları	31
3.1.3. İnhibitörler	31
3.1.4. Deney Aletleri ve Markaları	31
3.1.5. Deneylerde Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması	32
3.1.6. Etik Kurul	34

3.1.7. Deneylerde Kullanılan Örneklerin Elde Edilmesi.....	35
3.2. Metod	35
3.2.1. Deneylerde Kullanılan Teknikler	38
3.2.1.1. Sperm Analizi	39
3.2.1.2. Sperm Örneklerinin İmmünofloresan, Flow Sitometri ve Western Blot Yöntemleri için Hazırlanması.....	40
3.2.1.3. İmmünofloresan	41
3.2.1.4. Akım Sitometri	42
3.2.1.5. Görüntülemeli Akım Sitometri.....	42
3.2.1.6. Western Blotlama	44
3.2.2. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistik Analizler	46
4. BULGULAR	47
4.1. Ubikülin Proteazom Sistemi (UPS) Proteinlerinden p97/VCP, NEDL2 ve PAWP Proteinlerinin Sperm Kapasitasyonundaki Rollerini	50
4.1.1. p97/VCP'nin Kapasitasyonu İndüklenmiş ve Kapasitasyonu İndüklenmemiş Hücrelerdeki Ekspresyonu.....	52
4.1.1.1. p97/VCP'nin Kapasitasyon Sürecinden Önce ve Kapasitasyon Sürecinde İnsan Spermindeki Lokalizasyonunun Belirlenmesi	52
4.1.1.2. p97/VCP' nin Kapasitasyon Sürecinden Önce ve Kapasitasyon Sürecinde Sperm Hücresindeki Ekspresyonunun Flow Sitometrik Analizi	64
4.1.1.3. p97/VCP'nin Kapasitasyon Sürecinden Önce ve Kapasitasyon Sürecinde Sperm Hücresindeki Ekspresyonunun Western Blot Yöntemi ile Analizi	71
4.1.2. NEDL2'nun Kapasitasyonu İndüklenmiş ve Kapasitasyonu İndüklenmemiş Hücrelerdeki Ekspresyonu.....	72
4.1.2.1. NEDL2'nun Kapasitasyon Sürecinden Önce ve Kapasitasyon Sürecinde İnsan Spermindeki Lokalizasyonunun Belirlenmesi	72
4.1.2.2. NEDL2' nun Kapasitasyon Sürecinden Önce ve Kapasitasyon Sürecinde Sperm Hücresindeki Ekspresyonunun Flow Sitometrik Analizi	81

4.1.2.3. NEDL2'nun Kapasitasyon Sürecinden Önce ve Kapasitasyon Sürecinde Sperm Hücresindeki Ekspresyonunun Western Blot Yöntemi ile Analizi	86
4.1.3. PAWP'ın Kapasitasyonu İndüklenmiş ve Kapasitasyonu İndüklenmemiş Hücrelerdeki Ekspresyonu.....	87
4.1.3.1. PAWP'ın Kapasitasyon Sürecinden Önce ve Kapasitasyon Sürecinde İnsan Spermindeki Lokalizasyonunun Belirlenmesi.....	88
4.1.3.2. PAWP'ın Kapasitasyon Sürecinden Önce ve Kapasitasyon Sürecinde Sperm Hücresindeki Ekspresyonunun Flow Sitometrik Analizi	96
4.1.1.3. PAWP'ın Kapasitasyon Sürecinden Önce ve Kapasitasyon Sürecinde Sperm Hücresindeki Ekspresyonunun Western Blot Yöntemi ile Analizi	101
4.1.4. İnsan Sperm Kapasitasyonunda Akrozomal Reaksiyonun PSA ile Belirlenmesi.....	103
4.2. Ubikütün Proteazom Sistemi (UPS) Proteinlerinden p97/VCP ve NEDL2 Proteinlerinin Fertil ve İnfertil Bireylere Ait Sperm Hücrelerinde ki Ekspresyonları.....	105
4.2.1. Fertil ve İnfertil Bireylerin Spermlerinde Ubikütün Proteazom Sistemi (UPS) Proteinlerinden p97/VCP' nin Ekspresyonu	109
4.2.1.1. Fertil ve İnfertil Bireylerin Spermlerinde p97/VCP'nin Lokalizasyonu.....	109
4.2.1.2. Fertil ve İnfertil Bireylerin Spermlerinde p97/VCP Ekspresyonunun Akım Sitometrisi ve Görüntülü Akım Sitometrisi ile Değerlendirilmesi.....	118
4.2.1.3. Fertil ve İnfertil Bireylerin Spermlerinde p97/VCP Ekspresyonunun Western Blot ile Değerlendirilmesi.....	127
4.2.2. Fertil ve İnfertil Bireylerin Spermlerinde Ubikütün Proteazom Sistemi (UPS) Proteinlerinden NEDL2 Proteininin Ekspresyonu ...	128
4.2.2.1. Fertil ve İnfertil Bireylerin Spermlerinde NEDL2 Lokalizasyonu.....	129
4.2.2.2. Fertil ve İnfertil Bireylerin Spermlerinde NEDL2 Ekspresyonunun Akım Sitometrisi ile Değerlendirilmesi	136
4.2.2.3. Fertil ve İnfertil Bireylerin Spermlerinde NEDL2 Ekspresyonunun Western Blot ile Değerlendirilmesi.....	139

4.3. Ubikütün Proteazom Sistemi (UPS) Proteinlerinden p97/VCP ve NEDL2 Proteinlerinin Semen Parametreleri ile İlgili İlişkisi.....	140
4.4. Ubikütün Proteazom Sistemi (UPS) Proteinlerinden p97/VCP ve NEDL2 ve Agrezomlar Arasındaki İlişki	142
4.5. İnfertilite ve PSA Arasındaki İlişki	143
4.5.1. Fertil ve İnfertil Bireylerin Spermlerinde PSA İmmünlokalizasyonu	143
4.5.2. Fertil ve İnfertil Bireylerin Spermlerinde PSA Ekspresyonunun Akım Sitometrisi ile Değerlendirilmesi.....	145
5. TARTIŞMA	150
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	168
7. KAYNAKLAR.....	170
8. EKLER.....	187
EK-1: ETİK KURUL İZNİ	187
EK-2: ETİK KURUL İZNİ	188
EK-3: ETİK KURUL İZNİ	189
EK-4: TEZ İLE İLGİLİ YAYIN	190
EK-5: ÖZGEÇMİŞ.....	199

ÖZET

Ubikütün Proteazom Sistemi (UPS) Proteinlerinin İnsan Sperm Kapasitasyon ve Akrozomal Reaksiyondaki Rolü ve Fertilizasyona Etkisinin Belirlenmesi

UPS'in üreme sisteminde fertilizasyon, kapasitasyon, akrozomal reaksiyon ve ZP bağlanması gibi olaylarda rolü olduğuna dair son yıllarda çalışmalar yapılmıştır. Fakat UPS proteinlerinden p97/VCP (Valosin içeren protein) ve PAWP (Postakrozomal kılıf WW domain-bağlayıcı protein)'ın insan sperm kapasitasyonu, akrozomal reaksiyon ve infertilite sürecindeki fonksiyonlarına dair eksiklikler bulunmakta, NEDL2 (NEDD4-benzeri ubikütün ligaz 2)'nin ise üreme sistemi ile ilişkisini açıklayan bir çalışma bulunmamaktadır. Bu bilgiler ışığında tezimde p97/VCP, PAWP ve NEDL2'nin insan sperm kapasitasyonu, akrozomal reaksiyon ve infertilite sürecindeki rollerine açıklık getirmek amacı ile p97/VCP, PAWP ve NEDL2'nin ekspresyonları immünfloresan, akım sitometri, görüntülemeli akım sitometrisi ve Western blot yöntemleriyle analiz edilmiştir.

İn vitro insan sperm kapasitasyonu deneyleri ile ekspresyonunda anlamlı değişiklikler gözlenen p97/VCP ve NEDL2'nin kapasitasyon sürecinde aktif rol oynadığı, fakat PAWP'ın ekspresyonunda anlamlı değişiklikler olmaması sonucu kapasitasyonda direkt etkin bir molekül olamayacağı bulunmuştur. p97/VCP inhibitörü DBEQ varlığında yapılan kapasitasyon deneyleri sonucunda DBEQ' nun kapasitasyon süresince p97/VCP'nin ekspresyonunu azaltarak kapasitasyonu inhibe ettiği, 26S inhibitörleri ile yapılan inkübasyonlar sonucunda ise p97/VCP ve NEDL2'nin kapasitasyon süresince 26S proteazom ile etkileşime girerek kapasitasyon sürecini etkilediği, PAWP'ın ise 26S ile etkileşime girmediği bulunmuştur. Ayrıca p97/VCP'nin kapasitasyon ve akrozomal reaksiyon arasında köprü kurduğu da saptanmıştır. p97/VCP ve NEDL2'nin infertilite sürecinde ki rolünü aydınlatmak için yapılan deneylerde ise p97/VCP'nin ekspresyonunun infertil bireylerde fertil bireylere göre artış, NEDL2'nin ise azalma gösterdiği bulunmuştur. Fertil ve infertil bireylerin semen parametreleri ile p97/VCP negatif, NEDL2 ise pozitif korelasyon göstermiştir.

Sonuç olarak diyebiliriz ki; UPS proteinlerinden p97/VCP ve NEDL2 insan sperm kapasitasyon, akrozomal reaksiyon ve fertilizasyon sürecinde rol oynar.

Anahtar kelimeler: Fertilizasyon, insan spermi, kapasitasyon, NEDL2, PAWP, p97/VCP, Ubikütün proteazom sistemi (UPS)

ABSTRACT

Determination of The Role of Ubiquitin Proteasome System Proteins On Human Sperm Capatitation and Acrosomal Reaction and Effect On Fertilization

Ubiquitin proteasome system (UPS) have roles in sperm capacitation, acrosome reaction, binding of sperm to zona-pellucida (ZP) in mammalian reproductive system. In these processes, proteins and inhibitors associated with sperm proteasome affect fertilization; however, effects of UPS proteins p97/VCP (Valosine containing protein), PAWP (Postacrosomal Sheath WW Domain Binding Protein) and NEDL2 (Nedd4-like ligase 2) on sperm capacitation, acrosome reaction, and fertility process have not yet been investigated. We hypothesized p97/VCP, PAWP, and NEDL2 may have role in sperm capacitation, acrosomal reaction, and infertility process. Expression of these proteins were determined by immunofluorescence labelling, flow cytometry, image-based flow cytometry, and Western blotting.

The phosphorylation of p97/VCP increased in sperm tail and the expression of p97/VCP decreased by DBEQ during in vitro capacitation. While expression of NEDL2 decreased significantly, PAWP expression did not change during this process. p97/VCP and NEDL2 interacted with 26S proteasomes during capacitation and PAWP did not interact. Expression of PSA increased during capacitation and decreased by presence of inhibitors. While expression of p97/VCP was higher in infertile men when compared to fertile men, infertile men had lower expression level of NEDL2 than fertile men.

These results indicate that p97/VCP, NEDL2 and PAWP have roles in human sperm capacitation, acrosomal reaction. And p97/VCP and NEDL2 may allow the usage of these proteins at infertility evaluation.

Key words: Capacitation, human sperm, infertility, NEDL2, PAWP, p97/VCP, Ubiquitin proteasome system

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: Santigrat derece
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
ACRBP	: Akrozin bağlayıcı protein
ADAM20-like	: A-disintegrin ve metalloproteinaz domain 20-like
ADAM5	: A-disintegrin ve metalloproteinaz domain 5
ADRM1	: Adezyon düzenleyici molekül
AE	: Akrozomal ekzositoz
AKAP3	: A kinaz bağlayıcı protein 3
AKAPs	: A-Kinaz Bağlayıcı Protein Ailesi
AQN1	: Spermadhesin
AQN3	: Seminal plazma sperm motilite inhibitör A1
ATP	: Adenozin 3'-trifosfat,
AWN	: Spermadhesin
BSA	: Sığır serum albümini
BSP	: Sperm bağlayıcı protein
BSP3	: Sperm bağlayıcı protein 3
CaCL ₂	: Kalsiyum klorür
CaCl ₂ . H ₂ O	: Kalsiyum klorid dihidrat
cAMP	: Siklik adenozin monofosfat
CLBL	: clasto-Lactacystin β-Lactone
CM	: Kapasitasyon medyum
CRISP1	: Sistein bakımından zengin salgı proteini 1
DAPI	: 4',6-diamidino-2-phenylindole
DBEQ	: Dibenzylquinazoline-2,4-diamine
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksirübönükleik asit
ECL	: Kemilüminesans
FN	: Fibronektin
HCl	: Hidroklorik asit

HRP	: Streptavidin-yaban turpu peroksidaz
KCl	: Potasyum Klorür
KH ₂ PO ₄	: Potasyum dihidrojen fosfat
M	: Molar
mA	: Miliamper
MFGE8	: Laktadherin
MgCl ₂ .6H ₂ O	: Magnezyum klorid hekzahidrat
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
N/A	: Majör seminal plazma glikoprotein PSP-1 prekürsör
Na ₂ HPO ₄	: Disodyum hidrojen fosfat
NaCl	: Sodyum Klorür
NaH ₂ PO ₄	: Sodyum dihidrojen fosfat
NaHCO ₃	: Sodyum Bikarbonat
NaN ₃	: Sodyum azid
NaOH	: Sodyum hidroksit
NCM	: Kapasitasyonu indüklemeyen medyum
NEDL2	: NEDD4-benzeri ubikütin ligaz 2
NGS	: Normal keçi serumu
NMS	: Normal fare serumu
NP-40	: Nonidet P-40
NYD-SP27/PLCZ1	: Fosfolipaz C-zeta-1 (PLC-zeta-1) antikor
p97/VCP	: p97/Valosin içeren protein
PAWP	: Postakrozomal kılıf WW domain-bağlayıcı protein
PBS	: Fosfat Tamponlu Çözelti
PEP1	: Fosfatidil etanolamin bağlayıcı protein 1
pH	: Hidrojenin gücü
PKA	: Protein kinaz A
PMFAB	: Plazma membran yağ asidi bağlayıcı protein
PPP1CC	: Protein fosfataz 1
PPP2CB	: Kalsinerin/PP2B
PSA	: Pisum sativum agglutinin
PNA	: Peanut Agglutinin

PSMA1	: Proteazomal altünite alfa tip 6b
PSMB6	: Proteazom 20S Subunit Beta 6
PSMD1	: 26S proteazom düzenleyici altünite 1
PSMD14	: 26S proteazom düzenleyici altünite 14
PSMD4	: 26S proteazom düzenleyici altünite 4
PSMD6	: 26S proteazom düzenleyici altünite 6
PSMD7	: 26S proteazom düzenleyici altünite 7
PTK	: Protein Kinaz K
PVA	: Polivinil Alkol
ROPN1L	: Ropporin 1-like
SACY	: Sperm çözülebilir adenilil siklaz
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SERPINE2	: Serpin peptidaz inhibitör, Clade E, Member 2
SPINK2	: Akrozin infibitör
SPINK2bn	: Seminal plazma akrozin inhibitör A1
SPTRX	: Spermatid-specific thioredoxin-1
SUS2	: Seminal vezikül salgılayıcı protein2
TL-Hepes	: Tyrode Laktat-Hepes
UBA1	: Ubikütün aktive edici enzim E1
UBA1	: E-1 tip ubikütün aktive edici enzim
UBB	: Ubikütün
UBC	: Ubikütün C izoform X1
UBDT1	: Ubikütün domain içeren protein 1
UBR7	: Ubikütün ligaz UBR7
UPS	: Ubikütün proteazom sistemi
USP38	: Ubikütün özel proteaz 38
ZP3	: Zona pellusida sperm bağlayıcı protein 3
ZP4	: Zona pellusida sperm bağlayıcı protein 4
ZPC	: Zona pellusida 3 glikoprotein
kDA	: Kilodalton
IF	: İmmünfloresan
ERAD	: Endoplazmik Retikulum İlişkili Degredasyon

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Spermatogenezin şematik diyagramı	7
Şekil 2.2. Spermiyogenezin şematik gösterimi.....	9
Şekil 2.3. İnsan sperminin diyagramı	12
Şekil 2.4. Ubikütün Sinyali.....	19
Şekil 2.5. 26S proteazomun yapısı.....	20
Şekil 2.6. Sperm kapasitasyonunda 26S proteazom regülasyonunun özeti	21
Şekil 2.7. VCP'nin yapısal domainleri	25
Şekil 2.8. p97/VCP'nin çoklu fonksiyonları.....	26
Şekil 3.1. Birinci deney akış şeması	37
Şekil 3.2. İkinci deney akış şeması	38
Şekil 3.3. Görüntülemeli akım sitometri cihazının ve bu cihazda yapılan bir sperm çalışmasının görüntüleri	44
Şekil 4.1. Kapasitasyon sürecinde ubikütün proteazom sistemi proteinlerinin etkisini belirleyebilmek için oluşturulan deney grupları.....	49
Şekil 4.2. İnfertilite sürecinde ubikütün proteazom sistemi proteinlerinin etkisini belirleyebilmek için oluşturulan deney grupları.....	50
Şekil 4.3. Fertil bireylerde 0.saatte gözlenen p97/VCP boyanma paternleri	54
Şekil 4.4. Fertil bireylere ait sperm hücrelerinin NCM ile inkübasyon sonucu sperm hücrelerinde p97/VCP proteininin lokalizasyonun gösterilmesi.....	57
Şekil 4.5. Fertil bireylere ait sperm hücrelerinde CM ile 5 saat inkübasyon sonucu p97/VCP proteininin lokalizasyonun gösterilmesi:	59
Şekil 4.6. Fertil bireylere ait sperm hücrelerinde CM ile 18 saat inkübasyon sonucu p97/VCP proteininin lokalizasyonunun gösterilmesi.....	62
Şekil 4.7. p97/VCP proteininin 0. saat, NCM ile inkübasyon sürecinde 5. ve 18. saatlerde, CM ile inkübasyon sürecinde 5. ve 18. saatlerde göstermiş olduğu 1 .2. ve 3. boyanma paternlerine ait görülme yüzdesi.....	63
Şekil 4.8. Fertil bireylerde kapasitasyon sürecinden önce ve kapasitasyon süreci boyunca p97/VCP ekpresyonunun gösterilmesi.....	65
Şekil 4.9. p97/VCP ekspresyonunun 0. saat, 5. saat, 18. Saat ve NCM gruplarında akım sitometrik yöntemle karşılaştırmalı olarak değeri.....	66

Şekil 4.10. Fertil bireylerde kapasitasyon sürecinde p97/VCP inhibitörü DBEQ ekspresyonunun gösterilmesi.....	67
Şekil 4.11. Fertil bireylerde kapasitasyon sürecinde UPS inhibitörlerinin p97/VCP ekspresyonuna olan etkisinin gösterilmesi	69
Şekil 4.12. Fertil bireylerde kapasitasyon sürecinde DMSO'nun p97/VCP ekspresyonuna olan etkisinin gösterilmesi	70
Şekil 4.13. p97/VCP ekspresyonunun DBEQ, 26S İnhibitörleri ve DMSO eklenen gruplarda akım sitometrik yöntemle karşılaştırmalı olarak değeri	70
Şekil 4.14. İnsan sperminin kapasitasyonuna p97/VCP inhibitörü (DBEQ) ve proteazom inhibitörlerinin (26S) etkisi (A ve B).	71
Şekil 4.15. Fertil bireylerde 0. Saatte görülen NEDL2 boyanma paterni:	74
Şekil 4.16. Fertil bireylerde NCM ile inkübe edilen grupta görülen NEDL2'ya ait 3. boyanma paterni	76
Şekil 4.17. CM ile 5 saat inkübe edilen gruplarda görülen NEDL2'ya ait boyanma paternleri	77
Şekil 4.18. CM ile 18 saat inkübe edilen gruplarda görülen NEDL2'ya ait boyanma paternleri	79
Şekil 4.19. NEDL2 proteininin 0. saat, NCM ile inkübasyon sürecinde 5. ve 18. saatlerde, CM ile inkübasyon sürecinde 5. ve 18. saatlerde göstermiş olduğu 1 .2. ve 3. boyanma paternlerine ait görülme yüzdesi.....	80
Şekil 4.20. Fertil bireylerde kapasitasyon sürecinden önce ve kapasitasyon süreci boyunca NEDL2 ekspresyonunun gösterilmesi.....	82
Şekil 4.21. NEDL2 ekspresyonunun 0. saat, 5. saat, 18. Saat ve NCM gruplarında akım sitometrik yöntemle karşılaştırmalı olarak değeri.....	83
Şekil 4.22. Fertil bireylerde kapasitasyon sürecinde UPS inhibitörlerinin NEDL2 ekspresyonuna olan etkisinin gösterilmesi	84
Şekil 4.23. Fertil bireylerde kapasitasyon sürecinde DMSO'nun NEDL2 ekspresyonuna olan etkisinin gösterilmesi	85
Şekil 4.24. NEDL2 ekspresyonunun 26S İnhibitörleri ve DMSO eklenen gruplarda 18. saat grubuna göre akım sitometrik yöntemle karşılaştırmalı olarak değeri	86
Şekil 4.25. İnsan sperminin kapasitasyonuna p97/VCP inhibitörü (DBEQ) ve proteazom inhibitörlerinin (26S) etkisi (A ve B)	87
Şekil 4.26. Fertil bireylere ait sperm yayma preparatlarında 0. saatte görülen iki farklı PAWP boyanma paterninin immünfloresan yöntemle görüntülenmesi	90

Şekil 4.27. NCM grubuna ait sperm yayma preparatlarında görülen PAWP boyanma paterninin immünfloresan yöntemle görüntülenmesi.....	92
Şekil 4.28. Fertil bireylerde 5. saatte PAWP boyanma paterninin immünfloresan yöntemle görüntülenmesi.....	93
Şekil 4.29. Fertil bireylere ait sperm yayma preparatlarında 18. saatte PAWP boyanma paterninin immünfloresan yöntemle görüntülenmesi.....	94
Şekil 4.30. PAWP proteininin 0. saat, NCM ile inkübasyon sürecinde 5. ve 18. saatlerde, CM ile inkübasyon sürecinde 5. ve 18. saatlerde göstermiş olduğu 1 .2. ve 3. boyanma paternlerine ait görülme yüzdesi.....	95
Şekil 4.31. Fertil bireylerde kapasitasyon sürecinden önce ve kapasitasyon süreci boyunca PAWP ekspresyonunun gösterilmesi	97
Şekil 4.32. PAWP ekspresyonunun 0. saat, 5. saat, 18. Saat ve NCM gruplarında akım sitometrik yöntemle karşılaştırmalı olarak değeri.....	98
Şekil 4.33. Fertil bireylerde kapasitasyon sürecinde UPS inhibitörlerinin PAWP ekspresyonuna olan etkisinin gösterilmesi	99
Şekil 4.34. Fertil bireylerde kapasitasyon sürecinde DMSO'nun PAWP ekspresyonuna olan etkisinin gösterilmesi	100
Şekil 4.35. PAWP ekspresyonunun 26S İnhibitörleri ve DMSO eklenen gruplarda 18. Saat grubuna göre akım sitometrik yöntemle karşılaştırmalı olarak değeri.....	101
Şekil 4.36. İnsan sperminin kapasitasyonuna p97/VCP inhibitörü (DBeQ) ve proteazom inhibitörlerinin (26S) etkisi (A ve B)	102
Şekil 4.37. Kapasite edilen ve inhibitör uygulanan deney gruplarında PSA ekspresyonunun gruplar arasında karşılaştırmalı gösterilmesi	103
Şekil 4.38. Kapasite edilen ve inhibitör uygulanan deney gruplarında PSA ekspresyonunun gruplar arasında istatistiksel analizi	104
Şekil 4.39. Fertil bireylere ait sperm hücrelerinde görülen birinci boyanma paterninde p97/VCP (A), PSA (B), DAPI (C) ve p97/VCP + PSA + DAPI (D) lokalizasyonları	111
Şekil 4.40. Fertil bireylere ait sperm hücrelerinde görülen ikinci boyanma paterninde p97/VCP (A), PSA (B), DAPI (C) ve p97/VCP + PSA + DAPI (D) lokalizasyonları	112
Şekil 4.41. Fertil bireylere ait sperm hücrelerinde görülen üçüncü boyanma paterninde p97/VCP (A), PSA (B), DAPI (C) ve p97/VCP + PSA + DAPI (D) lokalizasyonları	113
Şekil 4.42. Amorf baş anomalisi olan sperm hücresinde p97/VCP (A), PSA (B), DAPI (C) ve p97/VCP + PSA + DAPI (D) lokalizasyonları	114

Şekil 4.43. Çift kuyruk anomalisi olan infertil bireye ait sperm hücresinde p97/VCP (A), PSA (B), DAPI (C) ve p97/VCP + PSA + DAPI (D) lokalizasyonları.....	115
Şekil 4.44. İnfertil bireye ait akrozomal anomalisi olan sperm hücresinde p97/VCP (A), PSA (B), DAPI (C) ve p97/VCP + PSA + DAPI (D) lokalizasyonları.....	116
Şekil 4.45. İnfertil bireyin aglütinasyon gösteren sperm hücrelerinde p97/VCP (A), PSA (B), DAPI (C) ve p97/VCP + PSA + DAPI (D) lokalizasyonları	117
Şekil 4.46. Fertil (n:10) ve infertil (n:10) bireylere ait sperm hücrelerinde p97/VCP immunoreaktivitesinin dağılımı	118
Şekil 4.47. Fertil bireylerde akım sitometrik analizler ile p97/VCP ekpresyonunun gösterilmesi.....	119
Şekil 4.48. İnfertil bireylerde akım sitometrik analizler ile p97/VCP ekpresyonunun gösterilmesi	120
Şekil 4.49. p97/VCP ekspresyonunun fertil ve infertil bireylerde akım sitometrik yöntemle karşılaştırmalı olarak değeri	121
Şekil 4.50. 11052 kodlu fertil bireye ait sperm hücrelerinin baş ve kuyruk bölümlerindeki p97/VCP ve PNA ekspresyonları	122
Şekil 4.51. 11060 kodlu fertil bireye ait sperm hücrelerinin baş ve kuyruk bölümlerindeki p97/VCP ve PNA ekspresyonları	123
Şekil 4.52. 11052 kodlu fertil bireye ait sperm hücrelerinin baş ve kuyruk bölümlerindeki p97/VCP ve PNA ekspresyonları	124
Şekil 4.53. 11045 kodlu infertil bireye ait sperm hücrelerinin baş ve kuyruk bölümlerindeki p97/VCP ve PNA ekspresyonları	125
Şekil 4.54. 11045 kodlu infertil bireye ait sperm hücrelerinin baş ve kuyruk bölümlerindeki p97/VCP ve PNA ekspresyonları	126
Şekil 4.55. 11018 kodlu infertil bireye ait sperm hücrelerinin baş ve kuyruk bölümlerindeki p97/VCP ve PNA ekspresyonları	127
Şekil 4.56. p97/VCP ekspresyonunun Western blot yöntemi ile gösterilmesi	128
Şekil 4.57. p97/VCP ekspresyonunun fertil (n:10) ve infertil (n:10) bireylerde Western blot analizi ile değerlendirilmesi.....	128
Şekil 4.58. Fertil bireye ait normal morfolojiye sahip sperm hücresinde birinci boyanma paternine göre NEDL2 (A), PSA (B), DAPI (C) ve p97/VCP + PSA + DAPI (D) lokalizasyonları	130
Şekil 4.59. Fertil bireye ait normal morfolojiye sahip sperm hücresinde ikinci boyanma paternine göre NEDL2 (A), PSA (B), DAPI (C) ve p97/VCP + PSA + DAPI (D) lokalizasyonları	131

Şekil 4.60. Baş anomalisi olan sperm hücresinde NEDL2 (A), PSA (B), DAPI (C) ve p97/VCP + PSA + DAPI (D) lokalizasyonları.....	132
Şekil 4.61. Akrozomal anomalisi olan sperm hücresinde NEDL2 (A), PSA (B), DAPI (C) ve NEDL2 + PSA + DAPI (D) lokalizasyonları	133
Şekil 4.62. Aglütinasyon gösteren sperm hücrelerinde NEDL2 (A), PSA (B), DAPI (C) ve NEDL2 + PSA + DAPI (D) lokalizasyonları.....	134
Şekil 4.63. Fertil (n:10) ve infertil (n:10) bireylere ait sperm hücrelerinde NEDL2 immunoreaktivitesinin dağılımı:	136
Şekil 4.64. Fertil bireylerde akım sitometrik analizler ile NEDL2 ekpresyonunun gösterilmesi	137
Şekil 4.65. İnfertil bireylerde akım sitometrik analizler ile NEDL2 ekpresyonunun gösterilmesi	138
Şekil 4.66. NEDL2 ekspresyonunun fertil ve infertil bireylerde akım sitometrik yöntemle karşılaştırmalı olarak değeri	139
Şekil 4.67. NEDL2 ekspresyonunun western blot yöntemi ile gösterilmesi	139
Şekil 4.68. NEDL2 ekspresyonunun fertil (n:10) ve infertil (n:10) bireylerde western blot analizi ile karşılaştırmalı olarak değeri.....	140
Şekil 4.69. p97/VCP ve NEDL2'nun insan sperm konsantrasyonu, motilitesi ve morfolojisi ile olan ilişkisi	141
Şekil 4.70. Agrezom belirleme yöntemi ile agrezomların (kırmızı) gösterilmesi ..	142
Şekil 4.71. Fertil ve infertil bireylere ait sperm hücrelerinin PSA ile boyanması ...	144
Şekil 4.72. Fertil bireylerde akım sitometri yöntemi ile PSA ekspresyonunun belirlenmesi.....	146
Şekil 4.73. İnfertil bireylerde akım sitometrik analizler ile PSA ekpresyonunun gösterilmesi	147
Şekil 4.74. PSAekspresyonunun fertil ve infertil bireylerde akım sitometrik yöntemle karşılaştırmalı olarak değeri	148
Şekil 4.75. Çift kuyruk anomalisi olan sperm hücresinde PSA+NEDL2+DAPI boyaması sonucunda kuyrukta PSA lokalizasyonunun gösterilmesi	149

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Sperm kapasitasyonu ve fertilizasyonu sırasında proteazomla etkileşen proteinler	24
Tablo 3.1. Normal Spermiyogram Parametreleri	40
Tablo 4.1. Fertil bireylere ait standart semen analizi ve Kruger morfoloji sonuçları	53
Tablo 4.2. Fertil bireylere ait sperm yayma preparatlarında 0. saatte görülen üç farklı p97/VCP boyanma paternlerinin tüm spermier içindeki görölme yüzdesi	56
Tablo 4.3. Fertil bireylere ait sperm yayma preparatlarında NCM ile inkübasyon sonucu p97/VCP boyanma paternlerinin tüm spermier içindeki görölme yüzdesi....	56
Tablo 4.4. 5 saatlik inkübasyon grubuna ait p97/VCP boyanma paternlerinin tüm spermier içindeki görölme yüzdesi.	60
Tablo 4.5. CM ile 18 saat inkübasyon sonucunda görülen dört farklı p97/VCP boyanma paterninin tüm spermier içindeki görölme yüzdesi	63
Tablo 4.6. Fertil bireylere ait sperm yayma preparatlarında 0. saatte görülen iki farklı NEDL2 boyanma paternlerinin tüm spermier içindeki yüzde gösterimi	75
Tablo 4.7. NCM grubuna ait p97/VCP boyanma paternlerinin tüm spermier içindeki görölme yüzdesi.	78
Tablo 4.8. 5 saatlik inkübasyon grubuna ait NEDL2 boyanma paternlerinin tüm spermier içindeki görölme yüzdesi	78
Tablo 4.9. 18 saatlik inkübasyon grubuna ait NEDL2 boyanma paternlerinin tüm spermier içindeki görölme yüzdesi	80
Tablo 4.10. Fertil bireylere ait sperm yayma preparatlarında 0. saatte görülen iki farklı PAWP boyanma paterninin tüm spermier içindeki görölme yüzdesi	89
Tablo 4.11. NCM ile inkübe edilen gruba ait sperm hücrelerinde görülen üç farklı PAWP boyanma paterninin tüm spermier içindeki görölme yüzdesi.	91
Tablo 4.12. Fertil bireylere ait sperm yayma preparatlarında 18. saatte görülen üç farklı PAWP boyanma paternlerinin tüm spermier içindeki görölme yüzdesi	98
Tablo 4.13. Fertil bireylere ait standart semen analizi ve Kruger morfoloji sonuçları	107
Tablo 4.14. İnfertil bireylere ait standart semen analizi ve Kruger morfoloji sonuçları.	108
Tablo 4.15. Fertil ve infertil bireylere ait semen parametrelerinin karşılaştırılması..	109

Tablo 4.16. Fertil insan sperminde p97/VCP lokalizasyonu.....	110
Tablo 4.17. Fertil bireylere ait sperm yayma preparatlarında görülen üç farklı p97/VCP boyanma paternlerinin tüm spermier içindeki yüzde gösterimi.....	110
Tablo 4.18. İnfertil insan sperminde p97/VCP lokalizasyonu.	113
Tablo 4.19. Fertil insan sperminde NEDL2 lokalizasyonu	129
Tablo 4.20. Fertil bireylere ait sperm yayma preparatlarında görülen iki farklı NEDL2 boyanma paternlerinin tüm spermier içindeki yüzde gösterimi	131
Tablo 4.21. İnfertil bireylere ait sperm hücrelerinde NEDL2 lokalizasyonu.....	135
Tablo 0.22. Fertil ve infertil bireylere ait semen analizi ve Kruger morfoloji analizi sonuçları	141



1. GİRİŞ

Ubikütün proteazom sistemi (UPS) antijen sunumu, işlenmesi, hücre siklusu, apoptoz, hücrel savunma, hücre sinyalizasyonu ve transkripsiyonu gibi hücre içi birçok biyolojik olayın gerçekleşmesinde rol oynamaktadır (1,2). Bütün bu önemli hücre içi mekanizmaların yanında, son yıllarda bu sistemin aynı zamanda üreme sisteminde fertilizasyon, kapasitasyon, akrozomal reaksiyon ve ZP bağlanması gibi birçok önemli basamağın işlevsel hale gelmesinde rolleri olduğu açığa çıkarılmıştır. İnsan ve diğer memelilerle yapılan çalışmalar, UPS'in, sperm-zona pellucida (ZP) bağlanması, spermin fertilizasyon yeteneğini kazanabilmesi için gerekli olan sperm plazma membranının ve akrozomunun yeniden şekilllenmesi gibi erken kapasitasyon evrelerinde görev aldığını ortaya koymuştur (3-10).

Tezimde UPS'de çalışan özellikle de proteazomla ilişkili üç proteinin sperm kapasitasyonundaki ve infertilite sürecindeki rolü araştırılmıştır. Bu amaçla kullandığımız ilk protein yaban domuzu sperm kapasitasyonunda görev yaptığı bilinen (11) ve çalışma grubumuzun da birçok makalesine kaynaklık eden UPS proteini olan *p97/VCP (Valosin içeren protein)*'dir. İkinci protein Sutovsky ve arkadaşlarının yıllardır çalıştıkları, insan ve diğer memelilerde sperme özgü *PAWP (postakrozomal kılıfta WW domainine bağlanan protein)* olarak bilinen ve de oosit aktivasyonu ve fertilizasyonda önemli fonksiyonları olan proteindir (12,13). Üçüncü protein ise PAWP'nin etkileştiği ve PAWP'ye bağlandığı düşünülen UPS proteinlerinden *NEDL2 (NEDD4-benzeri ubikütün ligaz)*'dir. Ubikütünlenme birçok hücrel işlemin gerçekleşmesinde kritik role sahip post-translasyonel bir protein modifikasyonu olup 8 kDa'luk küçük bir protein olan ubikütünün substrat proteindeki bir ya da daha fazla lizine kovalent bağlanması içeren ve proteinin degradasyonunu, hücre trafiğini ve yer değiştirmesini kontrol eden bir olaydır. Ubikütünlenme E1 aktive edici enzim, E2 ubikütün konjuge edici enzim ve E3 ubikütün ligaz sayesinde 3 basamakta gerçekleşir. E3 ubikütün ligazın RING (really interesting new gene) finger tip and HECT (homologous to E6AP carboxyl terminus) domain tip ligaz olmak üzere 2 tipi vardır. NEDL2, HECT tipi ubikütün ligazdır (14). Sutovsky ve arkadaşlarının yayınlanmamış

alışmalarından yola çıkarak NEDL2'nin gametogenez ve fertilizasyonda PAWP ile etkileşip beraber çalıştığı düşünölmektedir. p97/VCP ve PAWP literatürde çok geniş çalışılmış proteinler olmasına rağmen, bu proteinlerin insan sperm kapasitasyonuna katkıları bilinmemektedir. NEDL2'nin ise üreme sistemindeki ekspresyonu ve fonksiyonu literatürde açık değildir.

Ubikötin proteazom sistemi (UPS)'in keşfi ve bu sistemle ilgili çalışmalar seksenli yıllarda başlamasına rağmen, UPS'in kapasitasyona olan katkısı son yıllarda yapılan çalışmalarla ortaya konulmaya başlanılmıştır. Son alışmalar, 26S proteazomun spermin oositi döleyebilme yeteneği kazandığı kadın üreme tüplerinde gerçekleşen kapasitasyon işleminde rol aldığını göstermektedir. MG-132 ve epoksimisin gibi proteazom inhibitörleri kullanılarak, proteazomun aktivitesi durdurulduğunda sperm kapasitasyonu ve akrozomal reaksiyonunda önemli ölçüde değışiklikler saptanmıştır (15). Yapılan bu çalışmalarda, sperm-zona pellusida bağlanmasından kapasitasyon sürecini de içeren fertilizasyon basamaklarına kadar moleküler düzeyde belli bazı UPS proteinleriyle çalışılmıştır (15). Fakat UPS'de görev yaptığı bilinen ve sperm kapasitasyonu ve infertilite süreci ile ilişkileri olabileceği düşünölen p97/VCP, PAWP ve NEDL2 proteinlerinin bu sistemdeki fonksiyonları henüz açıklığa kavuşturulmamıştır.

İnsan sperm kapasitasyonu ve ubikötin protezom sistemi ile ilgili çalışmaların yanı sıra bugüne kadar sperm hücresinde fertilite ile ilişkili biyobelirteçlerin bulunması adına birçok çalışma yapılmıştır (11,12,14,16-18). Fakat erkek fertilitésinin prognoz ve diagnozunda (tanı ve teşhisinde) daha kesin, doğru ve tutarlı sonuçlar verecek tekniklerle belirlenmiş biyobelirteçlere ihtiyaç vardır. Tüm dünyada üreme başarısını artırabilmek için yapılan çalışmalarda erkek fertilitésinin prognozu ve tanısının çok önemli olduğu bilinmektedir. Spermin fertilitésini değerdendirebilmek için semen analizi, sperm morfoloji testi, motilite testi, eozin testi ve penetrasyon assay gibi birçok çalışma yapılmaktadır ve özellikle geleneksel semen analizi insan infertilitesindeki erkek faktörü değerdendirebilmek için kullanılmaktadır. Fakat spermin sübjektif değerdendirilmesinde kullanılan bu geleneksel yöntemler yardımcı üreme tekniklerinin sonuçlarının yorumlanmasında sınırlı derecede prognostik değeri taşımaktadır. Semen hakkında kantitatif bilgiler veren bu testlerin klinik değeri hala tartışılmaktadır ve bu konuda zıt görüşler yer almaktadır. Dahası, erkek infertilitesinin bazı vakalarında

sperm abnormalitesi moleküler düzeyde olmaktadır ve bu vakaların sperm örneklerinde morfolojik hiçbir bozukluk saptanamamaktadır. Bu probleme çözüm olarak defektif insan sperminin yapısal ve moleküler düzeydeki anomalilerinin sperm biyobelirteçleri kullanılarak ortaya çıkarılması hedeflenmiştir.

Tezimin ilk aşamasında tüm bu bilgiler ışığında kapasitasyon sürecinde sperm proteinlerinde meydana gelen değişikliklerin saptanması ile kapasitasyon sürecinin daha iyi anlaşılmasını sağlayacağını düşünerek bu üç proteinin sperm kapasitasyonu sürecinde rollerinin olup olmadığı ve eğer varsa bu fonksiyonlarını hangi süreçte veya basamakta gerçekleştirdiklerini saptayabilmek amaçlanmıştır. Fertilizasyon için en temel olaylardan biri olan spermin kapasitasyon sürecinde de spermin protein içeriğinde değişiklikler olmaktadır. Bu nedenle kapasitasyon süresince sperm proteinlerinde meydana gelen değişikliklerin saptanması kapasitasyon ve fertilizasyon süreçlerinin daha iyi anlaşılmasını sağlayacağını düşünerek UPS proteinlerinden p97/VCP, PAWP ve NEDL2'nin kapasitasyonu indüklenmiş ve indüklenmemiş insan sperminde ekspresyonları ve lokalizasyonları ilk defa tezimin çalışmaları ile belirlenmiştir.

Bu çalışmalara ek olarak UPS'de çalışan ve sperm proteazomuyla ilişkili olduğunu düşündüğümüz p97/VCP, PAWP ve NEDL2 gibi proteinlerin insan sperm kapasitasyonu sürecinde kapasitasyon ve ubikülin proteazom sistemi ile ilgili ilişkisini daha net olarak ortaya çıkarabilmek amacı ile de proteazom inhibitörleri olan MG-132, Epoxsimisin ve CLBL kullanılmıştır. Tezimde bu üç proteazom sistemi inhibitörlerine ek olarak bir p97/VCP inhibitörü olan DBEQ da kullanılarak p97/VCP kapasitasyon sürecindeki rolü ve kapasitasyon sürecinde proteazom ile ilişkisi daha net bir şekilde açıklanmaya çalışılmıştır.

Tezimin ikinci aşamasında ise androloji kliniğine infertilite nedeniyle müracat eden infertil donörler ve gönüllü fertil donörlerden alınan sperm örneklerinde bu proteinlerden p97/VCP ve NEDL2'nin (PAWP için bu uygulanmıştır, 12.referans) ekspresyonları ve ekspresyonlarının semen parametreleri (konsantrasyon, motilite, morfoloji) ile ilişkisinin olup olmadıklarının araştırılması amaçlanmıştır.

Tezimin çalışmaları için laboratuvarına 1 yıl süre ile gitiğim Prof. Dr. Sutovsky ve arkadaşları sperm hücrelerindeki biyobelirteçleri analiz etmek amacıyla,

konvansiyonel akım sitometrisinin (flowsitometri) daha geliştirilmiş versiyonu olan *görüntülemeli akım sitometrisi (ImageStream high speed quantitative imaging cytometer, Amnis Corp., Seattle, WA)*'nin kullanımını ilk defa göstermişlerdir. Böylelikle yeterli sayıda örnekleme ile sperm morfolojisi ve biyobelirteçlerin yoğunlukları arasında direk bir ilişki bu alet sayesinde kurulmaktadır. Nitekim Buckman ve Sutovsky, yaptıkları çalışmalarda, PAWP ve SPTRX3 biyobelirteçlerinin bu yöntemle çalışarak erkek infertilitesinin tanısı için kullanılabilecek biyobelirteçler olduğunu göstermişlerdir (12,17). Tezimin ikinci aşamasında ki çalışmalarda görüntülü akım sitometrisi de kullanılmıştır. Bu teknik şu anda Türkiye'de olmayan ve bu çalışmanın ortak yürüteceği laboratuarda Sutovsky ve arkadaşları tarafından 2009 yılında sperm hücrelerindeki biyobelirteçleri analiz etmek amacıyla kullanılan bir teknolojidir.

Tüm bu veriler ışığında diyebiliriz ki fertil ve infertil spermleri belirleyebilmek için spermatozoda protein belirteçler araştırılmaktadır ve tezimin bu ikinci aşamasında hedeflerimizden ikincisi olan erkek fertilitasını belirleyebilmek amacıyla spermatozoada yeni yöntemlerle daha hassas belirteçler keşfedebilmek amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda klinik veriler ile p97/VCP ve NEDL2'nin ekspresyonları arasında bir ilişkinin açıklanması ile infertilite teşhis ve tedavisinde bu yeni biyobelirteçlerin kullanılmasını önerebilecektir.

Sonuç olarak hem çalışılacak proteinlerin sperm kapasitasyonu ve infertiliteye etkisinin araştırılmamış olması hem de tekniğin Türkiye'de de tanıtılması ve kullanıma geçmesi açısından bu tez özgün değer taşımaktadır.

Bu amaca yönelik ve literatür bilgileri ışığında tezimin hipotezi şöyledir: UPS proteinlerinden p97/VCP, PAWP ve NEDL2 insan sperm kapasitasyonu ve fertilizasyon sürecinde görev yaparlar.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Spermatogenez

Gebeliğin 4. haftasında yolk kesesi endoderminden gelişen primordiyal germ hücrelerinden köken alan erkek gametler, gonadlarda bir dizi mitotik bölünme geçirerek sayılarını artırır. Puberteden hemen önce seminiferöz tübüllere dönüşen seks kordonlarının yanısıra primordiyal germ hücreleri de seminiferöz tübül bazal membranı üzerinde ki spermatogonyumlara dönüşürler. Puberte sürecine kadar bölünmeden kalan spermatogonyumlar, puberteden kısa bir süre önce hipofiz kökenli gonadotropinlerin artışı ile başlayan ve yaşam boyu devam eden spermatogenez ile aktif hale gelirler (19-22). Spermatogenez, spermatogonyumlardan spermatozoon (sperm) oluşum sürecidir ve üç farklı evreye ayrılır;

- Spermatogonyal faz
- Spermatosit (mayoz) fazı
- Spermatid fazı (spermiyogenezis).

1.Spermatogonyal faz, spermatogonyumların bir seri mitotik bölünmeye uğrayarak hem kök hücre popülasyonunun devamlılığını sağlandığı hem de primer spermatositlere farklılaşacak olan adanmış spermatogonyumların oluşturulduğu fazdır. İnsanlarda spermatogonyumlar nukleuslarının görünümü ve de hematoksilen ile boyanma özellikleri temel alınarak 3 sınıfa ayrılır;

Tip A koyu spermatogonyumlar (A_{koyu}), inaktif, rezerv hücreler olarak kabul edilirler, koyu boyanan oval nukleuslara sahip olan hücrelerdir ve kromatinleri ince granüllüdür. Bölünerek kök hücre olarak kalan bir çift tip A koyu spermatogonyumları ya da bir çift tip A açık spermatogonyumları oluştururlar.

Tip A açık spermatogonyumlar ($A_{açık}$), açık boyanan oval nukleuslara sahiptir ve bu hücreler spermi üretecek, farklılaşma sürecine yönlendirilmiş olan hücrelerdir. İnsanlarda doğumdan 2-3 ay sonra Tip A koyu spermatogonyumlar ve Tip A açık spermatogonyumlar farklılaşır.

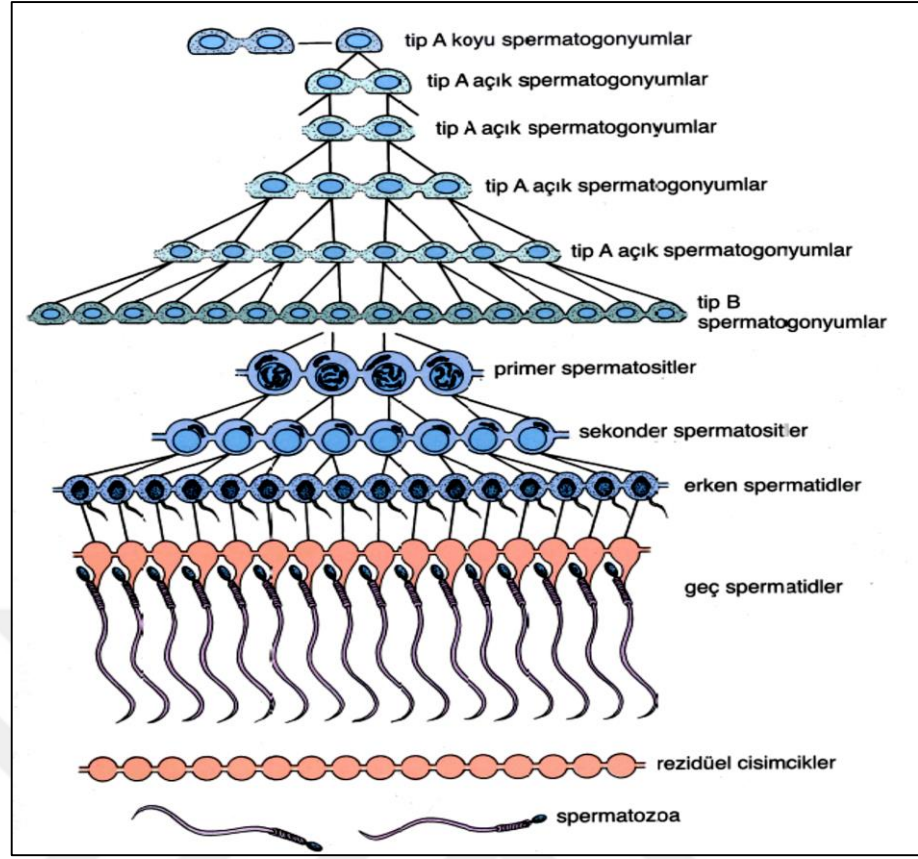
Tip B spermatogonyumlar, puberte ile Tip A açık spermatogonyumlardan oluşur. Yuvarlak nukleusa sahip olan ve çekirdek zarfı boyunca ve nukleolus

evresinde boyanmış yoğun kromatin alanları ile karakterize olan Tip B spermatogonyumlar, mitozu girerek primer spermatositleri ve spermi oluşturacak olan öncül hücrelerdir (20-22).

2. Spermatosit fazı, (mayoz) primer spermatositlerin iki mayoz bölünme geçirerek kromozom sayıları ve DNA miktarlarını azalttığı ve haploid spermatidleri oluşturduğu fazdır. Tip B spermatogonyumlar mitotik bölünme geçirerek primer spermatositleri oluştururlar. Seminifer tübüllerin en büyük germ hücreleri olan *primer spermatositler* oluştuktan kısa bir süre sonra DNA'larını replike ederler ve sonuçta normal sayıda kromozom (2n) ve iki katı kadar DNA (4d) içerirler.

Primer spermatositler yaklaşık 22 gün kadar süren 1. mayotik bölünmenin sonunda kromozom sayılarını (n) ve DNA miktarını (2d) yarıya indirirler. 1. mayozun profaz evresinde kromatin görülebilen kromozomları oluşturacak şekilde leptoten, pakiten, diptoten ve diakenez safhalarını tamamladıktan sonra kromozom ayrılması ve crossing-over olaylarının gerçekleştiği metefaza girerler. Crossing-over tamamlandıktan sonra homolog kromozomlar ayrılır ve mayoz mekiğinin zıt kutuplarına hareket ederler.

Birinci mayotik bölünmeyi tamamlayan primer spermatositler sonuç olarak diploid DNA miktarına sahip (2d) iki adet *sekonder spermatosit* oluştururlar. Bu hücreler hemen ikinci mayotik bölünmenin profaz safhasına girerler. Sonuç olarak her sekonder spermatosit kromozom sayısını azaltmıştır (1n) ve bu kromozomlar iki kardeş kromatidden oluşmuştur. İkinci mayozun metefaz safhasında metefaz plağında dizilen kromozomların kardeş kromatidleri ayrılır ve mekiğin zıt kutuplarına hareket ederler. İkinci mayozun sonunda her bir sekonder spermatositten (1n) kromozom ve (1d) DNA içeren iki haploid *spermatid* oluşur. Sertoli hücre kntlerine yerleşmiş spermatidler, haploid kromozomlu olup kromatinleri yoğunlaşmış çekirdeklere sahiptirler (19-22).



Şekil 2.1. Spermatogenezin şematik diyagramı (21).

3. Spermatid faz (spermiyogenezis) ise spermatogonyumlardan spermatidlerin oluşmasıyla tamamlanan spermatogenezin son evresi olan spermiyogenezde spermatidler yeniden şekillenmeye uğrayarak spermatozoaya farklılaşırlar. Bu süreç 4 evre ile tanımlanır. Bu fazlar esnasında spermatidler Sertoli hücresinin plazma membranına tutunmuş haldedirler.

1. *Golgi fazı*: Bu evrede spermatid sitoplazması çekirdeğe yakın konumlu bir Golgi kompleksi, mitokondriyumlar, serbest ribozomlar, düz endoplazmik retikulum tübülleri ve bir çift sentriyol içerir. Bu evrenin en belirgin özelliği, proakrozomal granüller olarak adlandırılan periyodik-asit-Schiff (PAS)-pozitif olan küçük granüllerin Golgi kompleksinde birikmesi ve glikoproteinden zengin olan bu granüllerin çekirdek zarfına komşu membran ile sarılı akrozom vezikülünü meydana getirmesidir. Bu evrede gelişmekte olan spermin ön kutbunu akrozomal vezikülün pozisyonu belirler. Bu fazda, sentriyoller, oluşan akrozom vezikülünün karşı tarafı olan spermatidin arka kutbuna doğru göç ederler ve sperm kuyruk aksoneminin oluşumunu başlatırlar. Sentriyollerden bir tanesi plazma membranına dik açı ile

hizalanır ve flagellumun dokuz çift periferde, iki tane merkezde mikrotübülüs yapısı içeren kuyruk iskeletini içeren aksonemini oluşturmak üzere akrozomal bölgenin karşı kutbunda konumlanır.

2. *Kep fazı*: Bu faz akrozom vezikülünün, içeriği yoğunlaşan çekirdeğin ön yarısını kaplaması ile karakterizedir. Yeniden şekillenmiş olan yapı akrozomal kep olarak adlandırılır. Akrozomal kepin altındaki çekirdek zarfı porlarını kaybeder. Son büyüklüğüne ulaşan akrozomal vezikül hidrolitik enzimleri içeren akrozom adını alır.

3. *Akrozom fazı*: Bu fazda spermatid yeniden oryante olur ve seminifer tübüllerin tabanına doğru yönelir. Gelişmekte olan flagellum ise seminifer tübülün lümenine doğru uzanır. Spermatidin yoğunlaşan çekirdeği yassılaşır ve uzar. Çekirdek ve onu çevreleyen akrozom, plazma membranının ön kısmı komşuluğunda bir pozisyon alırken, sitoplazma arka kısma doğru yer değiştirir. “Manşet” adı verilen silindirik şekilde spermatidin arka kutbuna doğru uzanan geçici kılıf sitoplazmadaki mikrotübüllerin organizasyonu ile oluşur. Çekirdeğe tutunan sentriyollerden dokuz kalın fiber gelişir ve aksonem mikrotübüllerinin periferinde dış kalın fiberler olarak kuyruğa uzanır. Koyu renkli, küçük, armut şekilli çekirdeğin, distalindeki sentriolden çıkan mikrotübüller, flagellumu oluşturacak olan aksonemi meydana getirir.

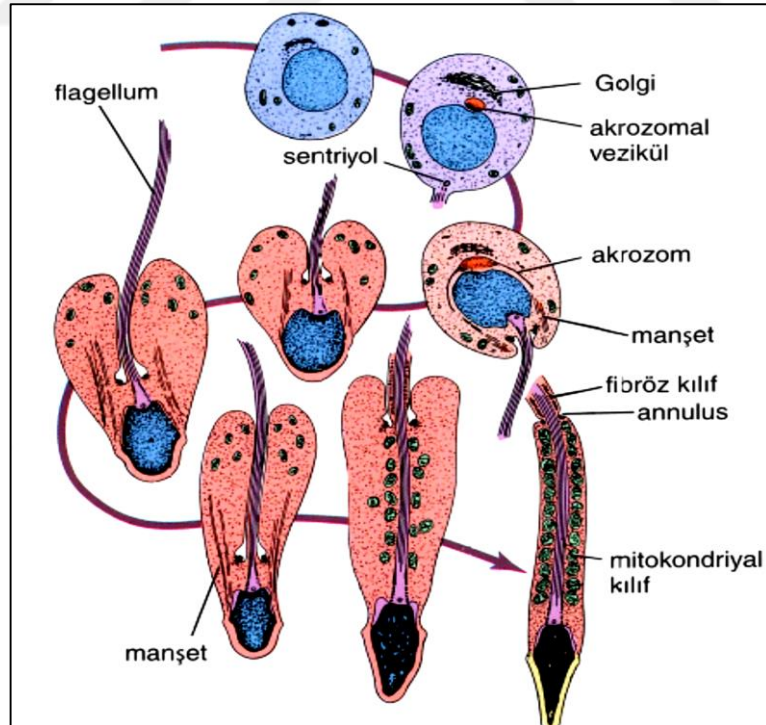
Flagellumun gelişimini önceden başlatmış olan sentriyoller nükleusun arka yüzeyine taşınırlar. Burada ki immatür sentriyoller spermin bağlantı parçasını oluşturmak üzere değişim geçirirler. Bu sentriyollerden dokuz kalın fibril gelişir ve aksonemin mikrotübüllerinin çevresinde yer alan dış yoğun fiberler olarak kuyruğa uzanırlar ve nükleusu flagellum ile birleştirirler ki bu nedenle “bağlantı parçası” adını almışlardır.

Büyümekte olan flagellumu sarmak üzere posteriyora yönelen plazma membranının hareketine paralel olarak manşet kaybolur. Flagellumun proksimal kısmında mitokondriyumlar boyun bölgesinde yer alan kaba fibrillerin etrafında ve boyun bölgesinin arkasında sıkı, heliks bir yapı oluşturmak üzere sitoplazmadan göç ederler ve toplanıp yoğunlaşırlar ve böylece kuyruğun “orta parçası” şekillenir. Bu bölge, spermatozoon hareketleri için enerji kaynağını oluşturur.

Orta parçanın distalinde, fibröz kılıf dış kalın fiberleri sarar ve flagellumun yaklaşık olarak sonuna kadar uzanır. “Esas parça” olarak adlandırılan dokuz uzunlamasına fiberi çevreler ve uzunluğu en fazla olan parçadır. Flagellumun, fibröz kılıfının distalinde kalan bölgesi kısa segment “son parça” olarak isimlendirilmektedir.

Hyalüronidaz, akrozin, nöraminidaz, asit fosfataz ve tripsin benzeri proteazlar gibi hidrolitik enzimler içeren akrozom özel bir tip lizozom olarak kabul edilir. Sperm dış akrozomal membranı ile oosit plazma membranının birleşmesiyle ekzositoz sonucu hidrolitik veziküller dış ortama salınır. Spermin, korona radiata tabakasını geçmesine hyalüronidaz yol açarken, akrozom reaksiyonu olarak bilinen fertilizasyonun ilk basamağının gerçekleşmesini ise akrozin ve tripsin benzeri proteazlar zona pellusidayı eriterek sağlarlar.

4. *Olgunlaşma (maturasyon fazı)*: Flagellumun etrafındaki fazla sitoplazma atılır. Spermatidler artık intersellüler köprülerle bağlı değildir. Rezidüel cisim olarak adlandırılan fazla sitoplazma ve intersellüler köprüler Sertoli hücreleri tarafından fagosit edilir.



Şekil 2.2. Spermiyogenezin şematik gösterimi (21).

Gelişmekte olan gametleri karakterize eden intersellüler köprüler rezidüel cisimlerde kalırlar. Sonuç olarak spermatidler birbirine bağlı değildirler ve sertoli hücrelerinden salıverilirler. Spermiyasyon adı verilen bu süreçte sertoli-spermatid bağlantılarında β 1-integrinlerin bulunmasının yanında spermiyasyon sırasında integrin bağlı kinazların aktivasyonlarında ki artış spermatidlerin salınmasında enzimatik bir kontrol olduğunu düşündürür. Testisteki spermiyasyon hızı ejakülattaki sperm hücrelerinin sayısını belirler (19-23).

2.1.1. Olgun Spermin Yapısı

Olgun insan spermi yaklaşık 60 μ m uzunluğunda olup ana olarak *baş*, *kuyruk* ve *bağlantı parçası* olmak üzere 3 yapıdan oluşur;

1. Baş: Spermin baş kısmı yassı ve sivridir. 4.5 μ m uzunluğunda, 3 μ m genişliğinde ve 1 μ m kalınlığındadır. Spermin başı ana olarak 3 kısımdan oluşur;

1)Kondanse çekirdek: Çekirdek yassılaştırmış yoğun bir yapıdadır. Anterior yarısını akrozomun örttüğü çekirdek bazik protoaminlerle kaplı genomik DNA'yı içerir. Protaminler somatik histonların yerini aldığı için nükleozomları yoktur (20, 21, 23-25).

2)Akrozomal Kese: Bu kısım dış akrozomal membran, iç akrozomal membran ve hidrolitik enzimler olmak üzere üç ana bölgeden oluşur. Başın anterior üçte ikilik bölümünü saran akrozomal kep lizozomlarda bulunan hidrolitik enzimler (tripsin benzeri proteazlar, asit fosfatazlar, hyaluronidaz, nöraminidazlar) içerir.

Bu enzimler, spermin korono radyata ve zona pellusidaya girişini kolaylaştırmak için döllenme anında salınır ki bu enzimlerin salıverilmesi akrozom reaksiyonunun ilk basamağını oluşturur. Akrozomun başın son kısmına doğru inceleterek uzaması sonucu ekvatoryal segment olarak adlandırılan kısım meydana gelir. Akrozom reaksiyonu olarak bilinen bu süreç, spermin penetrasyonunu ve fertilizasyonunu kolaylaştırırken, aynı zamanda başka spermilerin oosite girmesini de engeller (20, 21, 23-25).

3) *Plazma membranı*: Sperm membranı protein, lipid ve karbohidrat yapısındadır. Plazma membranı spermin zona pellusidaya güçlü bir şekilde bağlanmasına yol açan sperm reseptörlerini ve fertilin reseptörünü içerir. Disintegrin protein ailesi içinde yer alan fertilin heterodimerik bir proteindir ve plazma membranının akrozomun ekvatoryal bölgesine karşılık gelen kısmında bulunur. Lipidlerin görevi ise membran yapısını oluşturarak stabilizasyonunu sağlamak, kapasitasyon, akrozom reaksiyonu ve oosit-sperm füzyonunda rol almaktır. İnsan spermi yüksek oranda fosfotidil kolin, fosfotidil etonolamin ve sfingomiyelin içerir (26-28). Kolesterol fosfolipidlerle birlikte kolesterol sperm membranının bütünlüğünü ve geçirgenliğe olan direncini sağlar. Ayrıca mannoz ve glukoz gibi monosakkaridler ile disakkaridlerde spermin membranında yer almaktadır. Esas aminoasit yapısını ise tirozin, triptofan ve histidin oluşturur.

Tirozin kinaz sp 95, proakrozin, PH-20, PH-30, sp 56, galaktozilt galoktaziltransferaz, spermadezinler, progesteron reseptörü gibi spesifik antijenler dışında hücre-hücre ya da hücre matriks etkileşimini yürüten nonspesifik proteinler, kollajen, fibronektin, laminin, adezyon molekülleri gibi matriks proteinleri ve immünoglobülinler, kaderinler, selektinler ve integrinler gibi adezyon moleküllerinin de spermatozoonların membranında yer aldığı gösterilmiştir (29, 30).

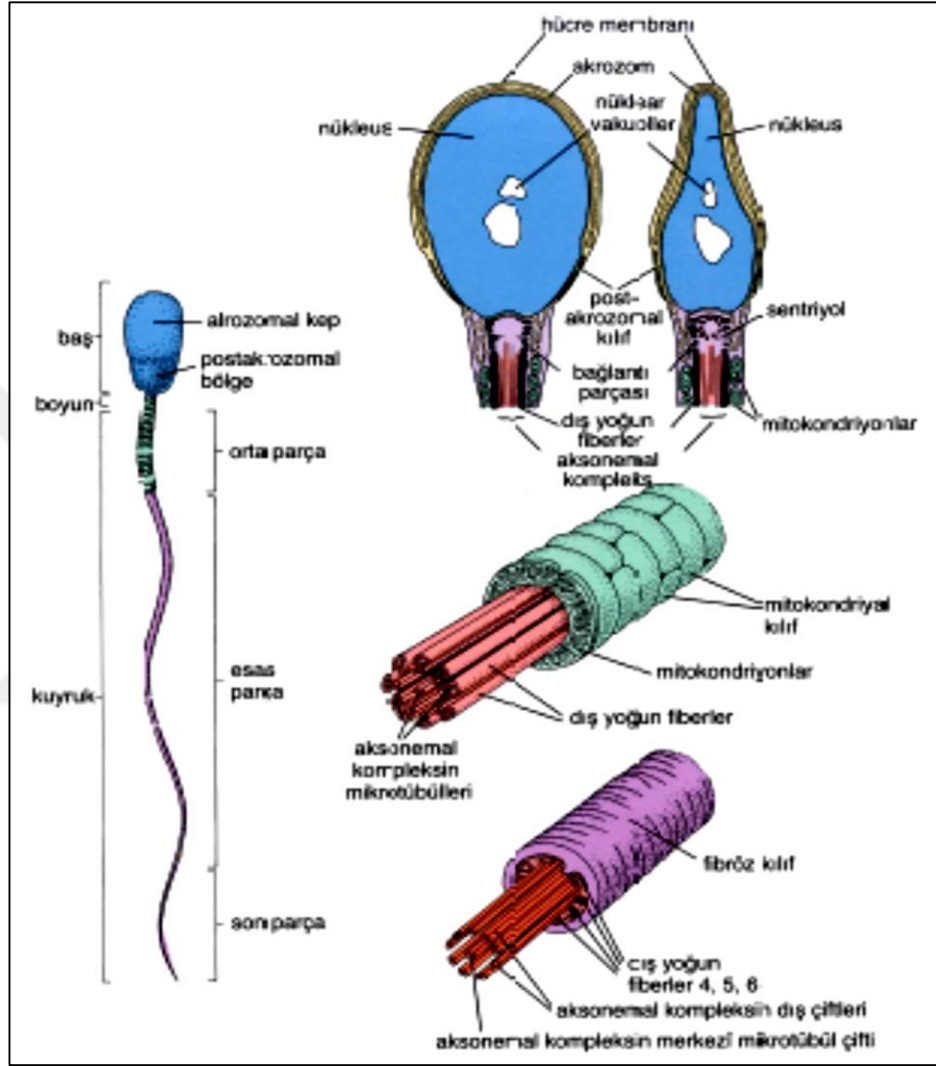
2. Bağlantı parçası: Baş ve kuyruk bölümünü birbirine bağlamıştır. Dar bir parça olan bağlantı parçasında bir çift sentriyol bulunur ve bu kısımdaki distal sentriyol spermin kuyruk bölgesinin merkezinde olan ve spermin hareketi için motor görevini yapan aksoneme kaynaklık yapar (25).

3. Sperm kuyruğu: Orta parça, esas parça ve son parça olmak üzere üç kısımdan oluşur. *Orta parça*: Yaklaşık 7 um uzunluğunda olan orta parça 9+2 mikrotübüler aksonem ve dış yoğun liflerden oluşan uzunlamasına seyreden dokuz kolon ve onu çevreleyen sarmal olarak dizilmiş mitokondriyonlardan oluşur. Kuyruğun hareketi için gerekli enerjiyi sağlamadan sorumlu olan mitokondriyonlar bir mitokondriyal kılıf ile sarılıdır. Mitokondriyal sarmalın son halkası olarak adlandırılan annulus orta parçanın sonlandığı yerdir.

Esas parça: Kuyruğun en uzun parçası esas parçadır ve merkezi aksonem, onu saran dış yoğun fiberler ve en dışta bir fibröz kılıftan oluşur. Dış yoğun lifler ve fibröz kılıf,

spermin öne hareketi sırasında mikrotübüler kayma ve kıvrılma için gerekli olan sağlam bir iskeleti oluşturan keratin proteinini içerir.

Son parça: Kuyruğun son parçası olgun bir spermde yaklaşık 5 µm kadardır ve sadece aksonemal kompleksi içerir.



Şekil 2.3. İnsan sperminin diyagramı (21).

2.2. Fertilizasyon Sürecinde Spermin Rolü

Dişi yumurtalık tüplerinde sperm oositi döllemeden önce sperm iki önemli değişikliğe uğrar. Bunlardan ilki spermin epididimislerdeki maturasyonu olup ikincisi ise dişi üreme kanallarında sperm kapasitasyonudur.

Testiste üretildikten sonra epididimisin kanalına salınan sperm sadece sirküler harekete sahiptir. Daha sonra epididimisin kuyruk bölgesinde yaklaşık iki hafta süren olgunlaşma sürecinden sonra spermler ferilizasyon için gerekli ileri hareket edebilme kabiliyeti kazanırlar. Ejakülasyonu takiben spermler uterusu ve daha sonrada ovidukt kanalına girerler ki sperm burada ikinci önemli değişim olan kapasitasyon sürecine girer.

2.2.1. Sperm Kapasitasyonu

Fertilizasyon olayına daha detaylı bir açıklama getirmek amacı ile yapılan ilk çalışmalarda bazı türlerin sperm ve oositinin in vitro koşullarda bir araya getirilmesi sonucunda dölleme gözlenirken, memelilerde aynı koşullarda fertilizasyonun gerçekleşmediği gözlenmiştir. Araştırmalar sonucu bütün memeli türlerinde spermatozoonların oositi dölleyebilecek kadar hareketli olmadığı hipotezine ulaşılmıştır. Bu çalışmalar araştırmacılara memeli fertilizasyonunda spermin fertilizasyon öncesi bir takım değişiklikler geçirdiğini düşündürmüş ve kapasitasyonun keşfine yol açan araştırmalara yönlendirmiştir (31, 32).

Nihayetinde Austin ve Chang adlı araştırmacılar tarafından 1951-1955 yılları arasında spermin oositi fertilize edebilme yeteneği kazanabilmesi için dişi ovidukt kanallarında geçirdiği moleküler ve fizyolojik olaylardan oluşan özel değişiklikler bütünü olan kapasitasyon olayı keşfedilmiştir (31-34). Kapasitasyon olayının ardından hiperaktivasyon, akrozom reaksiyonu ve oosit-sperm füzyon olayları gerçekleşmektedir (31, 32).

Sperm Rezervi ve Kapasitasyon Arasındaki İlişki

Fertil bir erkekte her ejakülasyon sonucu yaklaşık 60-500 milyon sperm atılır fakat hepsi tuba uterinaya ulaşmaz. Spermler kendi hareketleri ve uterus kas hareketi ile dakikada 3 mm kadar yol alarak, vagina üst kısmında depolanır ve bu spermlerden ancak 500 kadarı tuba uterinaya ulaşır. Spermlerin ejakülasyon sonucu fornikse boşaltılmasını takiben, serviks ve uterus yolu ile ampullaya ulaşmaları 1-1,5 saat içinde gerçekleşir. Spermler canlılığını koruduğu 24-48 saat içinde dişi üreme sistemi içerisinde ovum ile karşılaşır, tuba uterinanın ampulla bölümünde fertilizasyon

gerçekleşir. Ejakülasyondan sonra semenin pH'sı 7-7,4 civarındadır ve tamponlama özelliği ile normal vagina asidik pH'ı olan 4-4,5'a karşı spermli, vaginanın antibakteriyal asiditesinden korumaktadır (1, 19, 35, 36).

Spermli ejakulasyonu takiben dişi genital sistemine girdiğinde hareketlidirler fakat dekapasitasyon faktörleri olarak adlandırılan kapasitasyon önleyici faktörler dişi genital kanallarında spermli kapasite olmasını engeller. Seminal vezikül ve epididimisten salınarak, ejakulasyon sırasında semene katılan dekapasitan faktörler sperm etrafında 2000'den daha küçük molekül ağırlıklı karbonhidratlardır ve serviks, uterus ya da tubalar içerisinde spermden uzaklaştırılırlar (37-39).

Spermli dişi yumurtalık kanalına girdikten sonra ovulasyona kadar yaşayabilecekleri, yeteneklerini koruyabilecekleri sperm depoları oluşturmaları gerekmektedir. Bu nedenle oviduktun kaudal istmus bölgesinde sperm depoları oluşturulmaktadır. Oviduktal sperm rezervi polispermliyi azaltmaya ve kapasite olmuş spermli ardışık bir şekilde salınmasına yardım eder. Spermatozoa sperm rezervinin içinde olduğu istmusun oviduktal epitelyal hücrelerine bağlanır. Oviduktal hücrelerin içindeki karbohidrat rezidüleri ve seminal plazma proteinleri -spermadezinler ve sperm bağlayıcı protein (BSP)- bu bağlanmaya aracılık eder ve onların salınması ile ovulasyon için en uygun zaman ayarlanır.

Dişi genital kanalında lokalize olan glukozaminoglikanlar, kondroitin sülfatlar, heparin benzeri ve henüz tanımlanmamış bazı maddelerin kapasitasyon sırasında spermatozoonların plazma membranındaki değişikliklerden sorumlu olduğu bilinmektedir.

Spermli bağlanması ve rezervden salınması mekanizması çok iyi bilinmemektedir fakat sperm kapasitasyonu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (40). İlişkili hipotezler öne sürer ki; sperm salınımı sperm yüzey proteinlerinin proteoliz ya da plazma membranından dökülmesi ile koordine edilir ya da sperm hareketliliğindeki artış hiperaktif olmuş spermliye yol açar ki hiperaktif olmuş sperm salınım için gereklidir (41, 42). Bir başka hipotez ise; epitelyal hücre yüzeyindeki karbohidrat rezidüleri glikosidaz enzimleri tarafından yıkılır ve bu enzimlerin ovulasyon zamanında ortaya çıktığı şeklindedir (43). Yine bir başka hipotez ise sperm adezinler

ve oviduktun salgıladığı diğer enzimler oviduktal karbohidratların sperm bağlanması ile rekabet ettiği yönündedir (44).

Sperm ovidukt kanalına girdikten sonra ampullaya ulaşana dek dekapasitasyon faktörleri spermden uzaklaştırılır ve nihai olarak sperm ampullada oosit ile karşılaştığında onu fertilize edebilme yeteneği kazanmış yani kapasite olmuş duruma gelir. Sperm hareketliliğini azaltarak kapasitasyonun gerçekleşmesine engel olan kolesterolün sperm membranından dışarı atılması ile kapasitasyon olayı başlamış olur.

Sperm kapasitasyonu sperm rezervinden spermlerin salınmasıdır ki spermatozoanın fertilizasyon yeteneğini kazanması epididimiste kazanılır, fakat gerçek fertilize etme yeteneği fonksiyonel olarak kapasitasyona kadar baskılanır. Kapasitasyon spermatozoanın geçirdiği birtakım biyokimyasal ve biyofiziksel değişimlerdir ve dekapasitasyon faktörlerinin çıkarılması ile başlar. Aday dekapasitasyon faktörleri domuzda spermadezin AQN ve AWN, farede DF glisol protein, fosfatidiletanolamin bağlayıcı protein 1 (PEB 1), sperm antijen 36, CRISP1, plazma membran yağ asidi bağlayıcı protein (PMFAB), seminal vezikül salgılayıcı protein 2 (SVS2) , SERPINE2 olup insan ve farede NYD-SP27/PLCZ1'dir (45).

Bu proteinlerden bazıları semenin seminal plazma parçasının komponentidir, diğerleri ise testiküler kökenlidir ve akrozomal membranın dışında yerleşiktir. Dekapasitasyon faktörlerinin çıkarılması sperm plazma membranından kolesterol çıkması ile başlayan olaylar kapasitasyon sürecini oluşturur. Ayrıca kapasitasyon için serum albumin, kalsiyum (Ca^{+2}), bikarbonat (HCO_3^-) ve enerji kaynakları da gereklidir. Spermatozoonlar enerji kaynaklarını glikolizden, daha az olarak da mitokondriyonlardaki oksidatif fosforilizasyondan sağlar.

Spermin kolesterol bakımından zengin akrozomundan ve kuyruğun üzerini örten membran yapısından, kolesterolün bağlanarak dışarı alınması ile kapasitasyon başlatılır (32, 39, 46-51). Sperm membranının kaveolaları içerisinde ve inaktif durumdaki kaveolin adı verilen proteinlere bağlı halde kolesterol bulunur (47, 49). Özellikle folliküler sıvıda olmak üzere dişi genital sistemine ait sıvılarda bulunan albumin, sperm membranındaki kolesterolü kendisine bağlayarak membrandan uzaklaştırır. Sperm membranından kolesterolün ayrılması sonucu membran akışkanlığı artar ve bir sinyal oluşumu başlar ve sonuç olarakta aktif halde olmayan

protein kinazlar, G-proteinleri ve fosfofruktokinaz gibi aracı moleküller aktifleşerek kalsiyumun hücre içine girmesini neden olarak kapasitasyonu başlatırlar (32, 39, 46-52).

Kolesterolün çıkması bikorbonat ve kalsiyumun çıkışını modüle eder ve bu durum sperm-çözülebilir adenilil siklaz (SACY) aktivitesini ve hücre içi cAMP artışını düzenler. cAMP artışı protein kinaz A (PKA)'yı aktive eder ve bu proteinde protein tirozin kinaz (PTK)'ı aktif bir duruma getirir. Bu durum sperm başı ve kuyruğundaki protein tirozin fosforilasyonunun sperm kapasitasyonu için ayırt edici bir özellik olduğunu doğrulamaktadır (53, 54).

HCO_3^- kapasitasyon sürecinde hücre içi pH artışından sorumludur ve epididimiste düşük olan HCO_3^- konsantrasyonu seminal plasma ve tuba uterinalarda yüksektir (39, 50-52). Kalsiyum kanalları, K^+ kanalları ve voltaja duyarlı Na^+/H^+ değiştirici kanallar ve membran hiperpolarizasyonu ile aktive olmaktadır. Bikarbonat geçirgenliğinin artışı ve H^+ kanallarının aktifleşmesiyle gerçekleşen intraselüler alkalinizasyon dinein kollarında aktivasyonu tetikler. Kapasitasyonun yanısıra motiliteyi de intraselüler H^+ , Na^+ ve K^+ varlığı indüklemektedir.

Adenil siklaz, fosfataz, fosfodiesteraz gibi hücre içi enzim aktivasyonları hiperpolarizasyona bağlı intraselüler Ca^{+2} artışı sonucu olmaktadır. Adenil siklaz aktive olduktan sonra ATP'dan fosfat aktararak cAMP üretimini uyarır (39, 52, 55-57). Protein kinaz-A adenil siklaz aktivitesi ve cAMP sentezi ile uyarılır ve takiben protein kinaz-A hücre içi proteinlerin aminoasit terminallerine, ATP'dan fosfat aktararak tirozin fosforilasyonunu gerçekleştiren tirozin kinazın aktivasyonunu sağlar.

Sperm hücresinde kapasitasyon boyunca fosfolipid metilasyonundaki artışın yanısıra fosfotidiletolaminden fosfotidilkolin sentezi de gerçekleşmektedir (57, 58). Tirozin fosforilasyonu sonucu fosfotirozin oluşur ve kalsiyuma bağlıdır. Fosfotirozin fosfolipaz-C' yi aktive eder ve fosfolipaz-C inozitol trifosfat (IP3) ve diaçilgliserol (DAG) olmak üzere fosfoinozitol bifosfatı (PIP2) iki parçaya ayırır (59). İnozitol trifosfat (IP3), endoplazmik retikulum veya akrozom reseptörlerine bağlanarak Ca^{+2} açığa çıkarır ve açığa çıkan Ca^{+2} kalmoduline bağlanarak taşınır. Diaçilgliserol (DAG) ile stimüle olan protein kinaz C (PKC), aktivasyonu için inozitol trifosfatın (IP3) açığa çıkardığı Ca^{+2} 'a da ihtiyaç duyulmaktadır (57, 60). Kapasitasyon sırasında her ne kadar

hücre dışında kalsiyum bulunması gerekli olsa da, hücre içi kalsiyum deposu olarak akrozom da kullanılmaktadır (60).

Bu süreçte hücre içi pH artar, hücre membranlarının akıcılığı artar, hareketlilik ve genlik artar, karmaşık bir transdüksiyon yolağı başlar ve etkili bir şekilde tirozin fosforilasyonu artar. Yapısal ve fonksiyonel olarak gerekli bu yeniden yapılanma spermatozoayı kümülüs-oosit kompleksi ile etkileşime girebilmesi için hazırlar ve bir akrozomal ekzositoz (AE) gerçekleşir. Kapasitasyon geciktirilebilir fakat tamamen geri dönüştürülemez ve bir kez başladığında, spermler oosite ulaşmadıkça spermin hücre ölümüne doğru gideceğini belirler.

Akrozomal reaksiyon

Proteazomal aktivite birçok memeli türünde AE için gerekli görünmektedir. Proteazomal inhibitör epoksimisin kapasite olmuş boğa spermatozoasının progesteron indüklü akrozomal reaksiyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (61). Fertilizasyondan önce 30 dk. inhibitör inkübasyonu fertilizasyonu %60'dan daha fazla azaltırken, 60 dk. maruziyet ise %85 azalmaya yol açar (61). İnsanlarda spermatozoanın zona pellusidaya bağlanmasıyla ilgili çalışmalar kontrol spermatozoa (proteazomal inhibitör almayan) ile bir proteazomal inhibitör olan laktasitin ile muamele edilmiş spermatozoaların AE oranları arasında dikkat çekici bir fark ortaya çıkarmıştır. Kontrol spermatozoasında AE yüzdesi % 265 artarken; laktasitin ile muamele edilmiş spermatozolarla ise %137 oranında AE azalması görülmüştür (62). AE rekombinant insan zona proteinleri ZP3 ve ZP4 ile indüklendiğinde de benzer sonuçlar görülmüştür. Aynı zamanda laktasitin spermatozoaya progesteron indüklü kalsiyum girişine de müdahale eder.

Tüm bunlar öne sürer ki AE' da protezomun rolü ile bir kalsiyum istilası gerçekleşir. Proteazomal inhibitörler olan epoksimisin ya da laktasitin ile uyarılmış fare spermatozoaları ile yapılan in vitro fertilizasyon sonuçlarında önemli ölçüde azalma görülmüştür (63) çünkü proteazomal inhibitörler progesteron indüklü AE'yi azaltır. Proteazomal inhibitörleri ile muamele edilmiş spermatozoanın insan zona pellusidasına bağlanması ya da ZP proteinleri ile etkileşimi olumsuz etkilenmemektedir (62, 64). Benzer bir gözlem ise domuz modelinde yapılmıştır (5).

Bu sonuçlar Redgrove ve arkadaşlarının proteazom altünite antikorları ile yaptıkları ve insan sperm inkübasyonundan sonra spermin zona pellusidaya bağlanmasının inhibe olduğunu söyledikleri çalışmanın sonuçlarından farklıdır. Bu farklılıklar şu şekilde açıklanabilir; sperm proteazomunun katalitik bölgesi zona bağlanması için gerekli değildir fakat zona penetrasyonu ya da yıkımı için gereklidir ya da türler arasında farklılıklar olabilir.

Tüm bu bilgiler ışığında söylenebilir ki proteazomal proteolizin akrozomal ekzozitoza katılmasıyla kapasitasyon boyunca akrozom yeniden şekillenir ve akrozomal vezikülasyon ve akrozomun kaplanması AE boyunca gerçekleşir (65, 66).

2.3. Ubikütün Proteazom Sistemi

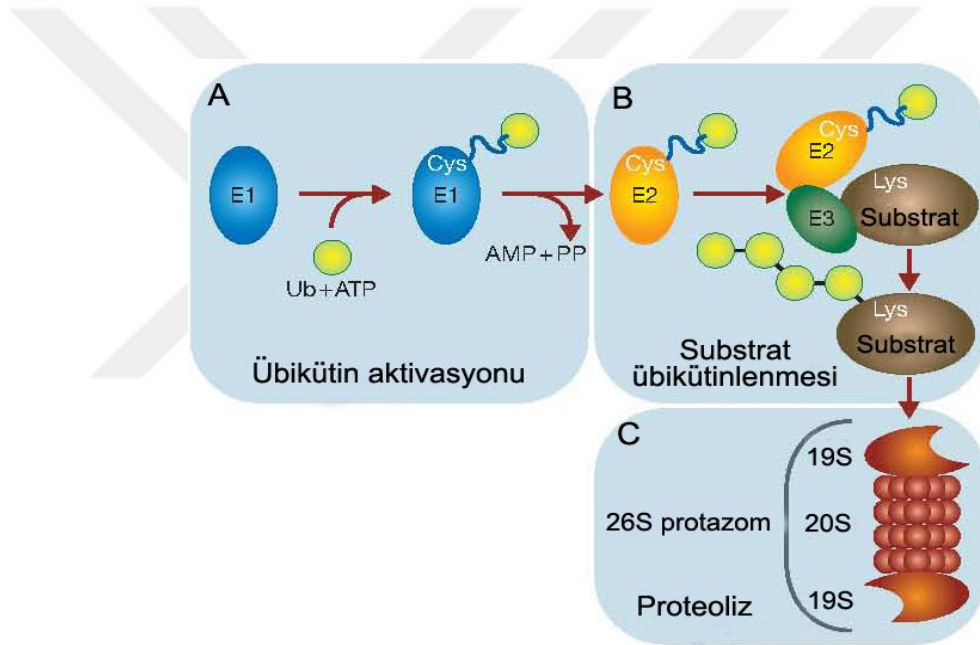
Antijen sunumu, işlenmesi, hücre siklusu, apoptoz, hücrel savunma, hücre sinyalizasyonu ve transkripsiyonu gibi hücre içi birçok biyolojik olayın gerçekleşmesinde rol oynayan Ubikütün proteazom sistemi (UPS) hücre içi düzenleyici proteinlerin seviyelerini kontrol etmede önemli bir fonksiyona sahiptir (1,2). Bütün bu önemli hücre içi mekanizmaların yanında, son yıllarda bu sistemin aynı zamanda üreme sisteminde fertilizasyon, kapasitasyon, akrozomal reaksiyon ve ZP bağlanması gibi birçok önemli basamağın işlevsel hale gelmesinde rolleri olduğu açığa çıkarılmıştır.

UPS'in iki temel fazı vardır;

1) Ubikütünleme: Ubikütünlemenin ilk aşamasında Ubikütün (Ub) ATP yardımıyla ubikütün aktive edici enzimin (E1) sistein kuyruğuna eklenir. Bu aşamayı takiben bağlayıcı enzimin (E2) sistein kuyruğuna transfer edilen ubikütün son olarak ise protein ligaz (E3) aracılığı ile substratın lizin kuyruğuna transfer edilir. Substrata izopeptid bağı ile bağlanan ubikütünün aktivasyonu ve ligasyonu, Ub'nin son aminoasidinin (G76) karboksil grubunda gerçekleşir (Şekil 2. 4) (67, 68).

Monoubikütünlenme tek bir ubikütün molekülünün substrata eklenmesi olayıdır. Monoubikütünlenme gen ekspresyonu, lizozomal sınıflandırma ve endositoz gibi substratın farklı görevlerde iş yapmasına neden olmaktadır (69).

2) Ubikütinlenmiş proteinlerin yıkımı: Ubikütün Proteazom Sistemi siklusunun ikinci fazında subsrat proteazom poliubikütün zincirleri sayesinde tanınır. Takiben küçük peptidlerine yıkılan subsrat ve ubikütün özgün deubikütünleyici enzimi sayesinde geri elde edilir. Ubikütünin proteazomal yıkımı da subsrata konjugasyonu gibi ATP bağımlıdır. 26S proteazomun, hem ubikütünlenmiş proteinlerin ubikütinden ayrılması hem de onların yıkımlarının katalizlenmesinde önemli bir görevi vardır. Proteazom, birbirine bağlı iki farklı bölümden oluşmuştur (Şekil 2.4 C). Proteolitik aktivite görevine sahip 20S silindirik temel bölüm ve 19S'lik proteazom kapakları poliubikütünlenmiş subsratın tanınması ve proteoliz görevine sahiptir ve silindirik bölümün alt ve üst kısımlarına yerleşmiştir. 19S kompleksinin herbiri, altı tanesi ATP az aktivitesine sahip 15-20 subuniteden oluşmuştur (70, 71).

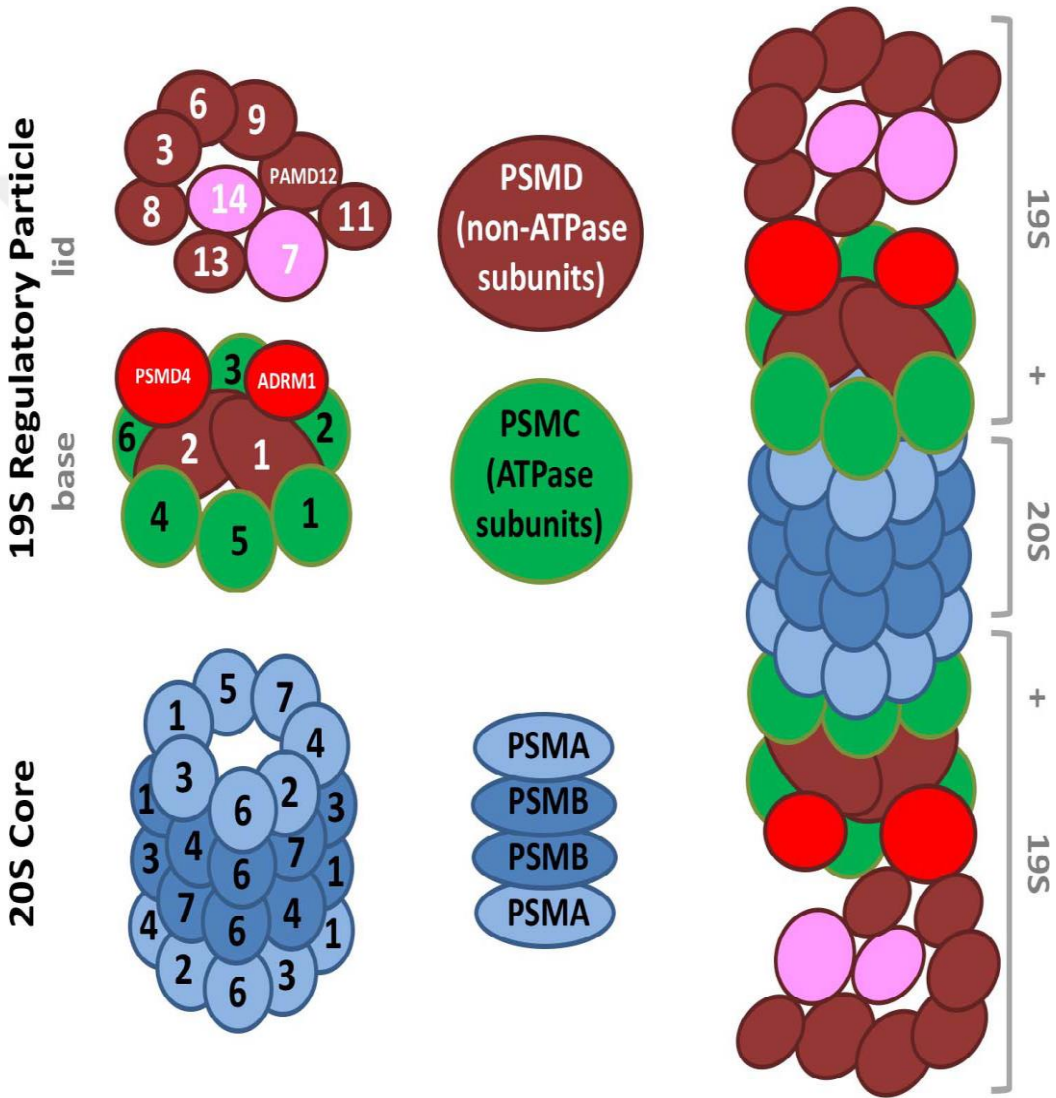


Şekil 2.4. Ubikütün Sinyali A: Ubikütün aktive edici enzim (E1) ile aktive edilen ubikütün, daha sonra ubikütün bağlayıcı enzime (E2) transfer edilir. Subsrata (mavi kutu) ve E2 enzimi özgün olarak ubikütün protein ligaza bağlanabilirler ve de aktive olmuş ubikütün subsrata transfer olur. B: Subsrata ve E2'ye farklı alanlarda E3 bağlanır. Subsrata ubikütünlenme sinyali ile tanınır. C: 26S proteazom 19S kapak kısmı ve esas proteolitik aktiviteye sahip 20S kısmından oluşur ve proteolizin gerçekleştiği kısımdır. Proteoliz öncesi 19S kapakla bağlantılı deubikütünleyici enzimler ile subsratdan ubikütün zincirlerinin uzaklaştırılır (72).

2.3.1. Fertilizasyon ve Kapasitasyon Süresince Ubikütün Proteazom Sisteminin ve Proteazomun Rolü

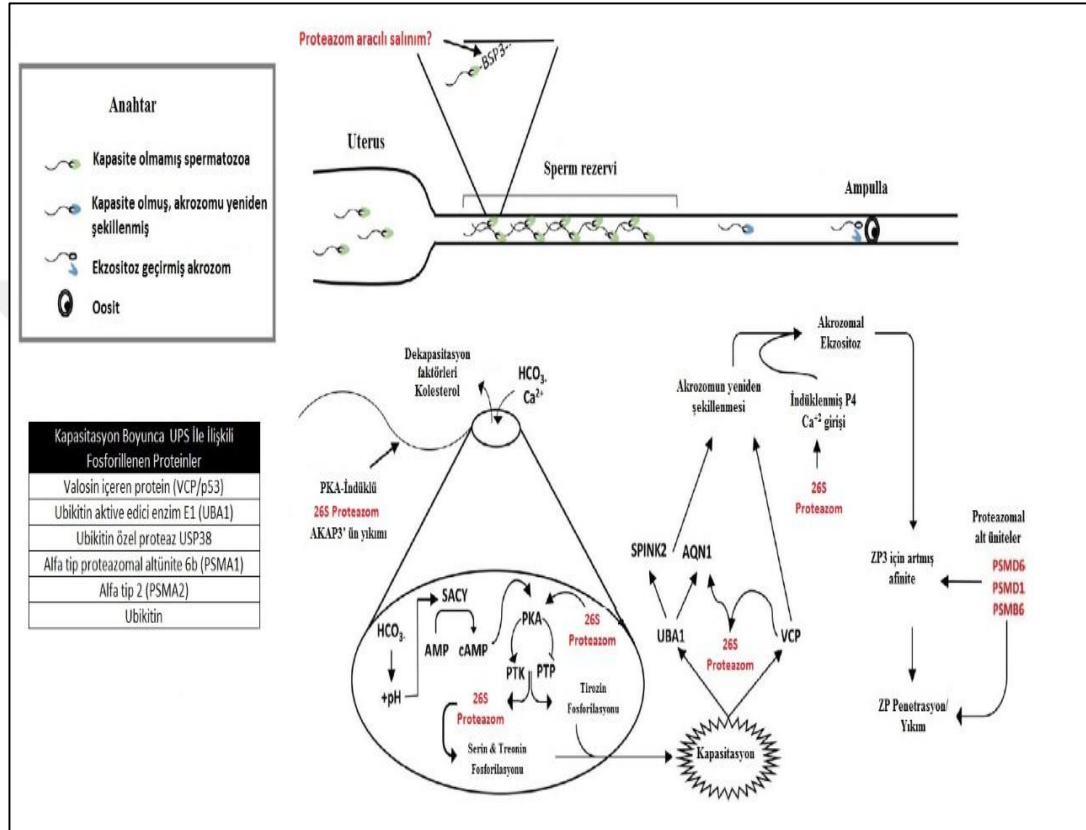
Geleneksel UPS subsrat proteinleri çoklu ubikütün zincirleri ile kovalent olarak modifiye eder ve proteinleri 19S düzenleyici kompleks ve 20S merkez komplekse

sahip bir holoenzim olan 26 S proteazoma yıkım için hedefler (Şekil 2.5). Proteazomun 19 S düzenleyici kompleksi hem ATP bağımlı hem de ATP bağımlı olmayan altünitelerden oluşmuştur. ATP bağımlı olmayan olmayan altünitenin elemanları arasında olan PSMD4 ve ADRM1 ubikütinlenmiş proteinleri tanır, ATP bağımlı alt ünite ise proteini 20S öz kısma girişi için düzenler. ATP bağımlı olmayan altünite arasındaki deubikütinlenmiş PSMD7 ve PSMD14 ise ubikütün moleküllerini protein 20S öz bölüme girdikten sonra salar ve daha sonra degrade olur (73).



Şekil 2.5. 26S proteazomun yapısı: Solda: altünite 19S düzenleyici (kapak+taban) kısımdan ve 20S öz kısımdan oluşur. 19S düzenleyici kısım ATPaz (yeşil renkli) PSMC altünitesi ve ATPaz olmayan (kahverengi renkli) PSMD altüniteleri içerir. Öz kısım ise 2 adet alfa altüniteden (PSMA1-7, açık mavi renkli) ve iki adet beta altüniteden (PSMB1-7) oluşur. Sağda: 26S proteazom ortada 20S özkısının ve her iki tarafında 19S düzenleyici kısmın yer aldığı bir yapıdır. PSMD4 ve ADRM1 (kırmızı renkli) ubikütün reseptör altüniteleridir. PSMD7 ve PSMD14 ise (pembe renkli) ubikütünün direkt olarak bağlandığı altünitelerdir (15).

Sperm protezomu üzerinde başlangıçta ascidian, ekinoderm, insan ve domuz modellerinde çalışılmıştır ancak 2000'den beri diğer memelilerde de birçok çalışma yapılmıştır. Orijinal ascidian çalışmaları göstermiştir ki sperm proteazının tripsin benzeri ve kemotripsin benzeri aktiviteleri fertilizasyon için gereklidir (74) çünkü bu aktiviteler inhibe edildiğinde spermatozoa oositin vitellin örtüsüne penetre olamaz.



Şekil 2.6. Sperm kapasitasyonunun 26S proteazom regülasyonunun özeti: Dekapasitasyon faktörlerinin çıkarılması ile sperm plazma membranından bir kolesterol çıkışı ve bikarbonat ve kalsiyum girişi başlar ve durum hücre içi pH artmasıyla sonuçlanır. Sonuçta hücre içi cAMP artışından sorumlu sperm adenilil siklaz (SACY) aktive olur. Camp artışı protein kinaz A (PKA) aktivasyonuna neden olur. PKA protein tirozin kinaz (PTK)'yı aktif bir duruma, protein tirozin fosfataz (PTP)'yi ise inhibe edilmiş bir duruma fosforiller. PKA bir kez aktive olduğunda 26S proteazom direkt ya da indirekt olarak substrat protein fosforilasyonunu modüle eder. Protein tirozin fosforilasyonu sperm kapasitasyonu için belirleyici bir faktördür. Kapasitasyon boyunca A-kinaz bağlayıcı protein 3 (AKAP3) proteazom tarafından yıkılır. E-1 tip ubikütin aktive edici enzim (UBA1) kapasitasyon boyunca akrozomun yeniden şekillenmesinde rol alan akrozin inhibitör serin peptidaz inhibitör Kazal tip 2 (SPINK2) ve spermadhesin (AQN1) gibi akrozomal proteinleri modifiye etmede anahtar bir rol oynar. Sperm proteazomu sperm bağlayıcı protein 3 (BSP3) gibi akrozomal yüzey proteinlerinin kapasitasyon indüklü salınımında rol oynar. Valosin içeren protein (VCP) ubikütinlenmiş membran proteinlerini proteazoma taşır. VCP kapasitasyon boyunca tirozin fosforilasyonu geçirir ve VCP 'nin akrozomun yeniden şekillenmesinde önemli bir rol oynadığı görülmektedir. Sperm proteazomu aynı zamanda akrozomal ekzositoz (AE) olayına da önderlik eder. AE'yi takiben proteazomal alt üniteler PSMD6, PSMD1 ve PSMB6 zona pellusida 3 glikoproteine (ZP3) karşı yüksek afinite gösterir (15).

Memeli gametlerindeki UPS üzerine olan çalışmalar proteazomların epididimisteki sperm kalite kontrol mekanizmalarından sperm kapasitasyon olaylarına kadar çeşitlilik gösteren birçok adımda önemli bir role sahip olduğunu göstermiştir (Şekil 2.6) ve UPS sperm-zona pellusida (ZP) penetrasyonuna yardım eder (5, 73).

Sperm kapasitasyonunda 20S proteazom

Proteazomal inhibitörlerden MG-132 ve epoksomisin geri döndürülebilir bir şekilde insan sperm proteazomunun kemotripsin benzeri aktivitesini bloke eder ve in vitro bir şekilde sperm proteazomunu değiştirir. Sperm proteazomunun kemotripsin benzeri aktiviteleri aynı zamanda protein kinaz A ve protein tirozin kinaz inhibitörleri varlığında da azalırken PKA aktivatörleri sperm proteazomunun kemotripsin benzeri aktivitelerini önemli ölçüde artırır. Bu çalışmalar göstermiştir ki sperm kapasitasyonuna güçlü bir serin/treonin ve tirozin rezidülerinin fosforilasyonu eşlik eder. Bu bulgular sperm proteazomunun kapasitasyon sürecine katıldığını vurgular. Aynı zamanda sperm PKA aktivitesi ve proteazomal proteoliz arasındaki ilişkide vurgulanmaktadır. Proteazom bir kez PKA tarafından aktive edildiğinde direkt ya da indirekt olarak serin ve treonin rezidülerinin fosforilasyonunu modüle eder ve bu mekanizma hala araştırılmaktadır. Çalışmalar aynı zamanda göstermiştir ki proteazom kapasitasyon boyunca treonin kinaz rezidülerinin yıkımına katılır ve birçok protein treonin rezidülerinde fosforilasyona uğrar (75).

Sperm PKA aktivitesinin düzenlenmesi sonucu sperm kuyruk yapısında A-kinaz bağlayıcı protein (AKAPs) ailesinden olan ve de proteazom içeren AKAP3'ün Mg-132 tarafından proteazomunun inhibe edilmesi ile sperm kapasitasyonu boyunca AKAP3'ün PKA- indüklü proteazomal yıkımı engellenir. Fakat ilişkili bir protein olan AKAP8 yıkılmaz ve bu sonuç AKAP3'ün yıkımının kapasitasyonda özel bir fizyolojik öneme sahip olduğunu gösterir (76). Bu bulgular aynı zamanda AKAPs yönündeki proteazomal aktivitenin sperm kuyruğunda ve proteazomdan zengin akrozomal bölgenin bulunduğu sperm başında çeşitli mekanizmalar ile düzenlendiğini ve bu proteinlerin bu bölgelerde lokalize olduğunu gösterir (77). Şu anda AKAP3 ve diğer proteazomal hedefli AKAP'ların kapasitasyondan önce ubikütilenmesi ve kapasitasyon boyunca spermatozoanın UPS'i ile ubikütilendiği ya da ubikütilenmediği açık değildir.

Sperm kapasitasyonu boyunca fosforlanan proteinler

Daha öncede anlatıldığı gibi, protein fosforilasyonu sperm kapasitasyonu ile ilişkili anahtar bir adımdır. Spermatozoa c-AMP bağımlı yolların aktivasyonu ile fosforilasyon geçirir. Valosin içeren protein (VCP ya da p97), 26S protezoma ubikütilenmiş proteinlerini götürür ve c-AMP bağımlı ilaçların varlığında tirozin fosforilasyonu geçirir (11).

VCP çeşitli hücresel fonksiyonlara katılır ve muhtemelen rolü membran kaynaşması ve ubikütilenmiş proteinlerin proteazoma sunulması ile ilişkilidir. Kapasite olmuş domuz spermatozoasında özellikle kuyruk-bağlantı parçası bölgesinde tirozin fosforilasyonu geçirmiş VCP yoğun bir immüno Floresan lokalizasyonu gösterirken fosforile olmamış VCP ise distal ekvatoryal bölgede, postakrozomal kılıfta, başın ön bölgesinde ve flagellumda lokalize olmuştur (11).

Sperm kapasitasyonu ve fertilizasyonda VCP'nin rolü ile ilgili birtakım çalışmalar olsa da tam olarak bilinmemektedir ancak akrozomun yeniden şekillenmesindeki olaylara öncülük edecek bir rolü olabileceğinin düşünüldüğü çalışmalar vardır. Kapasitasyon boyunca UPS ile ilişkili diğer proteinlerden olan ubikütilen aktive edici enzim E1(UBA 1), ubikütilen özel proteaz 38, alfa tip proteazomal altünite 6b/PSMA1 like, alfa tip 2/PSMA2 ve ubikütilenin kendisi fosforillenir (81).

Tablo 2.1. Sperm kapasitasyonu ve fertilizasyonu sırasında proteazomla etkileşen proteinler (15).

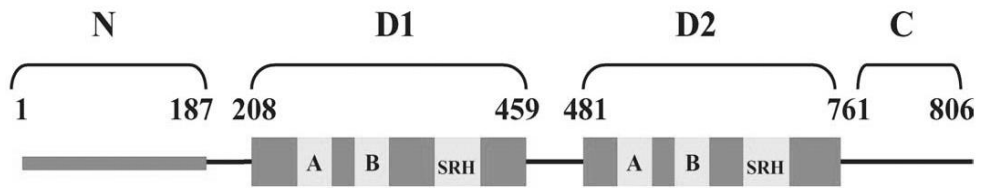
Protein Adı	HUGO Sembol	Lokalizasyon
Valosin-içeren protein/p93	VCP	Fosforillenmiş: bağlantı parçası Fosforillenmemiş: ekvatoryal segment, postakrozomal kılıf, başın ön kısmı, kamçı
Ubikütün aktive edici enzim E1	UBA1	Akrozom
Ubikütün özel proteaz 38	USP38	Lokalizasyon belirlenemedi
Proteazomal altünite alfa tip 6b	PSMA1	Akrozom
Fibronektin	FN	Ön baş plazma membranı
Spermadhesin	AQN1	Akrozom
Akrozin inhibitör	SPINK2	Akrozom
Spermadhesin	AWN	Akrozom
Majör seminal plazma glikoprotein PSP-1 prekürsör	N/A	Ön baş plazma membranı
Seminal plazma sperm motilite inhibitör A1	AQN3	Lokalizasyon belirlenemedi
Seminal plazma protein Pb1 prekürsör	N/A	Lokalizasyon belirlenemedi
Akrozin bağlayıcı protein	ACRBP	Lokalizasyon belirlenemedi
Seminal plazma akrozin inhibitör A1	SPINK2	Ön baş plazma membranı
A-disintegrin ve metalloproteinaz domain5	ADAM5	Postakrozomal kılıf
A-disintegrin ve metalloproteinaz domain20-like	ADAM20-like	Ön baş plazma membranı
Laktadherin	MFGE8	Akrozom
Ropporin 1-like	ROPN1L	Lokalizasyon belirlenemedi
Ubikütün ligaz UBR7	UBR7	Akrozom
Ubikütün C izoform X1	UBC	Akrozom
Ubikütün	UBB	Akrozom/Ön baş plazma membranı
Ubikütün domain içeren protein 1	UBDT1	Ön baş plazma membranı
26S proteazom düzenleyici altünite 7	PSMD7	Ön baş plazma membranı
Zona pellusida 3 glikoprotein	ZPC	Ön baş plazma membranına bağlanır
A kinaz bağlayıcı protein 3	AKAP3	Sperm kuyruğu esas parça
Protein kinaz A	PKA	Esas parça ve akrozom
Kalsinerün/PP2B	PPP2CB	Kamçı boyunca, başın alt kısmı
Protein fosfataz 1	PPP1CC	Postakrozomal ve bağlantı parçası

2.4. Valosin İçeren Protein (p97/VCP)

Ubikütün-protazom sistemine bağlı proteolizde önemli fonksiyonlara sahip olan 97-kDa'luk Valosin-içeren protein p97, VCP ve ya p97/VCP olarak adlandırılır. UPS bağımlı proteolizde VCP'nin ubikütün ve kofaktörleri ile ilişkisi önemlidir. UPS'de şaperon protein olarak görev yapmakta olan p97/VCP genel olarak hücresel proteinin 1% den fazlasını oluşturur.

Tip II AAA (ATPases Associated with a variety of Activities: Birçok aktivitesi bulunan ATPazlar) ATPaz ailesine ait bir protein olan p97/VCP, AAA domaini olarak adlandırılan iki ATPaz domainine sahiptir (79-82). p97/VCP dört domainden oluşur; N-terminal domain (N), iki tane ATPaz domaini (D1 ve D2) ve de C-terminal domaini (C). VCP'nin şaperon aktivitesinden sorumlu D1 ve D2 domainlerinin yanısıra N terminal domaini de poliubikütün zincirlerine bağlanma ve substrat tanınmasından sorumludur (Şekil 7). VCP'nin yapısı hakkında yapılan elektron mikroskopi çalışmaları ile silindirik şekilli homo hekzamerik yapıda olduğu kanıtlanmıştır (83).

p97/VCP'nin hücre içerisinde mitoz sonrası membran kaynaşması ve iç ipliklerinin ayrılması (84-86), proteazomda poliubikütünlenmiş proteinlerin degrade edilmesi (87, 88), transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu (89, 90), hücre siklusu gelişimi (91), ve yanlış katlanmış proteinlerin ER'dan geri atılımı (92-94) gibi birçok görevi vardır.



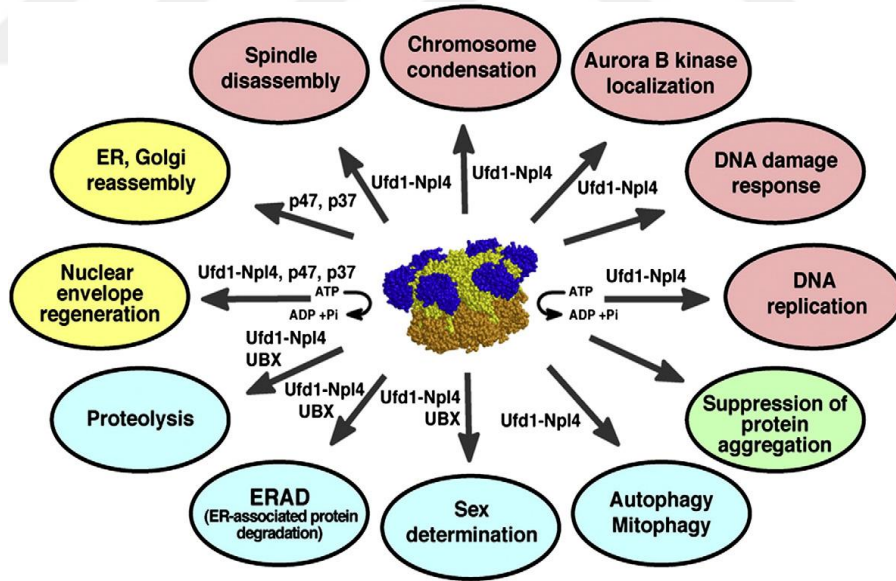
Şekil 2.7. VCP'nin yapısal domainleri: A: Walker A, B: Walker B ve SRH: VCP'nin D1 ve D2 domainlerindeki ikinci bölge homoloji motifleri. (95).

Kofaktörlerinin de yardımıyla ubikütünlenmiş proteinlere özgün olarak bağlanan p97/VCP ve 26S protazomda degrade olmadan önce bu proteinlere şaperonluk yaparak onlara yol gösterir. Substrat ubikütünlenmesini takiben protein komplekslerini birbirinden ayırmak için ATP'yi kullanan p97/VCP proteinlerin protazoma yönlendirilmesini sağlar.

Bu yolağa verilebilecek en iyi örneklerden biri şu şekilde açıklanabilir; NF- κ B sitoplazmada inaktif formda inhibitör I κ B proteini ile herhangi bir şekilde stimüle edilmeyen hücrelerde etkileşim halindedir (96, 97) . NF- κ B uyarıya cevap olarak aktive olur ve I κ B α hızlıca fosforile olup, poliubikütinlenir (96). p97/VCP, poliubikütinlenmiş I κ B α 'ya bağlanarak onu NF- κ B kompleksinden ayırır. NF- κ B'dan I κ B α 'nın ayrılmasını takiben, NF- κ B hedef genin regülasyonu nedeniyle nükleusa transfer edilir. p97/VCP aynı zamanda poliubikütinlenmiş I κ B α 'ya şaperonluk yaparak, onun 26S proteazomda yıkımı için yol gösterir (98).

2.4.1. p97/VCP ile İlişkide Olan Proteinler ve Fonksiyonları

p97/VCP hücrede çok çeşitli aktiviteler göstermesi nedeni ile çeşitli proteinlerle ilişki halindedir (Şekil 2.8). Bu aktiviteler arasında protein degradasyonu, hücre siklusu kontrolü, otofaji, proteoliz, cinsiyet belirlenmesi, DNA replikasyonu gibi birçok önemli fonksiyonu yerine getirdiği özetlenmiştir (99).



Şekil 2.8. p97/VCP'nin çoklu fonksiyonları. p97/VCP ve kofaktörleri birçok biyolojik fonksiyonun yerine getirilmesinde görev alırlar. Sarı yuvarlak içindekiler: membran oluşumu ile ilgili fonksiyonları. Mavi ve yeşil yuvarlak içindekiler: Protein yıkımı ile ilgili fonksiyonları, Pembe daire içindekiler: Hücre siklusu ve DNA'nın işlenmesi ile ilgili fonksiyonları göstermektedir (99).

2.5. NEDD4-like ubiquitin ligase 2 (NEDL2)

UPS proteinlerinden NEDD4-like ubikütün ligaz 2 (NEDL2) bir HECT tipi ubikütün ligazdır. Ubikütünlenme E1 aktive edici enzim, E2 ubikütün konjuge edici enzim ve E3 ubikütün ligaz sayesinde 3 basamakta gerçekleşir. E3 ubikütün ligazın RING (really interesting new gene) finger tip and HECT (homologous to E6AP carboxyl terminus) domain tip ligaz olmak üzere 2 tipi vardır. NEDL2, HECT tipi ubikütün ligazdır (14). NEDL2 NH₂ terminalinde bir tane C2 domaini, iki tane WW domaini ve COOH terminalinde HECT domaini içerir (100).

Memelilerde dokuz üyesi bulunan NEDD4 ligaz ailesine ait ligazların hepsi C2-WW-HECT yapısını içerirler ve tipik bir ubikitin ligaz gibi hareket ederler. NEDL2 birçok fizyolojik ve patolojik olayda önemli rol oynar. Memelilerde hücre büyümesi ve apoptozu düzenleyen bir p53 aile üyesi olan p73'ün ekspresyonunu aktive ettiğini gösteren çalışmalar vardır (100). NEDL2'nin enterik nöroenezis (ENS) boyunca GDNF/Ret sinyalinin pozitif bir düzenleyicisi olduğu bilinmektedir (101). Literatürdeki bir başka çalışmada ise NEDL2'nin enterik nöroenezin yanında böbrek gelişiminde de rol oynadığı bildirilmiştir (102).

Lu ve ark. yaptıkları çalışma sonucunda NEDL2'nin mitotik çıkış olayı boyunca APC/C-Cdh1 geni tarafından yıkıldığını ve ubikütilendiğini vurgulamışlardır (103, 104). Sutovsky ve ekibinin yaptıkları henüz yayınlanmamış çalışmalarında ise NEDL2'nin gametogenez ve fertilizasyonda rol oynayabileceği ve de sperm/oosit proteinlerinin bağlanmasında PAWP gibi ya da PAWP ile birlikte rol oynayabileceği söylenmiştir. Literatürde üreme sistemi ve NEDL2 arasında ki ilişkiyi açıklayabilecek herhangi bir çalışma yoktur.

2.6. Postacrosomal sheath WW domain-binding proteini (PAWP)

İnsan ve diğer memelilerde sperme özgü postakrozomal kılıfta WW domainine bağlanan protein (Postacrosomal sheath WW domain-binding proteini, PAWP) olarak bilinen ve de oosit aktivasyonu ve fertilizasyonda önemli fonksiyonları olan bir proteindir. Literatürde sperm morfolojisi ve sperm hareketliliğinin PAWP ile korelasyonunu gösteren (105), fertilizasyon ve PAWP ilişkisini araştıran (106), oosit

aktivasyonu ve PAWP ilişkisini aydınlatan (107) ve infertilite ile olan ilişkisini açıklayan çalışmalar (108) mevcuttur.

PAWP ilk olarak Sutovsky ve Oko tarafından spermatidlerin uzaması olayında spermatidlerde gösterilmiştir. Literatürdeki çalışmalarda spermdeki lokalizasyonu post-akrozomal kılıf olarak bildirilmiştir. Fertilizasyon süresince post akrozomal kılıftan oosit içerisine salınır ve oosit aktivasyonunda anahtar bir rol oynar.

Yine Sutovsky ve ekibinde PAWP proteini ile ilgili PAWP'ın fertilizasyon boyunca mayotik dağılım ve pronükleer gelişimde rol oynadığını gösteren (13), fertilizasyon ve yardımcı üreme teknikleri ile ilişkisini gösteren (12), kalsiyum osilasyonu ve oosit aktivasyonu ile ilişkisini açıklayan (109), spermiyogenez sürecinde PAWP'ın rolünü gösteren (110), sperm kalitesi ve artisifiyel inseminasyon arasındaki ilişkiyi gösteren (111) ve de testiküler gelişimdeki rolünü gösteren (112) birçok çalışma mevcuttur.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Tezimin bu bölümünde yaptığımız deneyler kapsamında kullandığımız materyaller ve bu materyalleri kullanarak izlediğimiz deney yöntemleri başlıklar halinde verilmiştir.

3.1. Materyal

Tezimin deneylerinde kullanılan sarf malzemeler, deney aletleri ve ait oldukları kaynaklar aşağıdaki gibi başlıklar halinde ayrıntılı bir şekilde verilmiştir.

3.1.1. Kimyasallar ve ait olduğu kaynaklar

NaCl	Carlo Erba
KCl	Merck
Sodyum Laktat	Sigma-Aldrich
MgCl ₂ .6H ₂ O	Sigma-Aldrich
HEPES	Sigma-Aldrich
Sodyum Pirüvat	Sigma-Aldrich
Sorbitol	Sigma-Aldrich
Gentamisin	Sigma-Aldrich
Penisilin	Sigma-Aldrich
D- Glukoz	Sigma-Aldrich
Pirüvik Asit	Sigma-Aldrich
BSA	Sigma-Aldrich
NaHCO ₃	Sigma-Aldrich
CaCl ₂	Sigma-Aldrich
PVA	Sigma-Aldrich
Na ₂ HPO ₄	Merck
KH ₂ PO ₄	Merck
Normal Fare Serumu	Abcam
Normal Keçi Serumu	Abcam
Triton-X	Sigma-Aldrich

Formaldehit	Merck
Methanol	Sigma-Aldrich
Yağsız Süttozu	Bio-Rad
Tris	Carl-Roth
NP-40	Sigma-Aldrich
Proteinaz İnhibitör Coctail	Sigma-Aldrich
Glisin	Merck
Tween 20	Carl-Roth
Ponceu S	Carl-Roth
Glasiyal Asetik Asit	Merck
B-Merkaptoethanol	AppliChem
Sodyum Dodesil Sülfat	Merck
Bromfenol Mavisi	Sigma-Aldrich
NaOH	Merck
HCl	Merck
NaN ₃	Merck
KCl	Merck
NaH ₂ PO ₄	Merck
Sperm Ayrıştırma Solüsyonu	Sil-Silect Plus
Agrezom Belirleme Kiti	Enzo
Protein Ladder	GenScript
Su bazlı kapatma medyumu	Thermo Fischer
Floresan kapatma medyumu	Abcam
MES yürütme solüsyonu	Nupage
ECL	Abcam
Etanol	Sigma-Aldrich
Super block	Abcam
Entellan	Sigma-Aldrich
Polilizin Solüsyonu	Sigma-Aldrich

3.1.2. Antikorlar, Ait oldukları Kaynaklar ve Kullanım Oranları

<u>Primer antikorlar</u>	<u>Firması</u>	<u>Dilüsyon oranı (IF/Flow)</u>	<u>Dilüsyon oranı (Western)</u>
Anti- Rabbit VCP	Abcam (ab109240)	1:200	1:2000
Anti- Rabbit NEDL2	Abcam (ab92711)	1:200	1:500
Anti-Rabbit PAWP	Abcam (ab170115)	1:500	1:1000
Anti-Rabbit Beta aktin	İnvitrogen		1:1000

<u>Sekonder antikorlar</u>	<u>Firması</u>	<u>Dilüsyon oranı</u>
Anti- Rabbit Texas Red	ABM	1:300
Pisum Sativum Agglutinin (PSA)	Sigma	1:500
Goat anti rabbit HRP	Abcam	1:1500

3.1.3. İnhibitörler

MG-132	Enzo
Epoximisin	Enzo
CLBL	Enzo
DBEQ	Cayman Chemical

3.1.4. Deney Aletleri ve Markaları

Mini santrifüj	Biosan
Vorteks	Thermo Scientific
Soğutmalı santrifüj	Hettich
Floresan Mikroskobu	Olympus
Western blot seti	İnvitrogen
Orbital karıştırıcı	Sigma
Etüv	Nüve, EN500
Akım Sitometri Cihazı	ACEA Biosciences, Novocyte
Görüntülemeli Akım Sitometri Cihazı	Amnis, Flow Sight
Isıtıcı	Nüve

Sonikatör	Bandelin
Çeker ocak	Hedlab
Buzdolabı	Arçelik
-80 °C derin dondurucu	Thermo Scientific
Ph metre	Hanna
Hassas terazi	Ragwag
Manyetik karıştırıcı	Thermo Scientific
Semidry blotlama cihazı	Scie-Plas
UVP görüntüleme cihazı	Kutay Lab Cihazları
Distile su arıtma cihazı	Alga
Mikropipet seti	Brand
Su banyosu	JSR

3.1.5. Deneylerde Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması

PBS Hazırlama

NaCl	8g
KCl	0.2 g
KH ₂ PO ₄	0.26 g
Na ₂ HPO ₄	1.1 g

Kimyasallar 1 lt distile su içinde çözündürülmüştür ve ph=7.2 olarak ayarlanmıştır.

PBS-Tween Solüsyonu Hazırlama

1 ml Tween 1 lt PBS içerisinde çözündürülmüştür.

%2'lik Formaldehit Solüsyonu Hazırlama

% 10 Formaldehit	20 ml
PBS	80 ml

Kimyasallar manyetik karıştırıcı yardımı ile karıştırılmıştır.

Sperm Yıkama Medyumu (Modifiye TL-HEPES) Hazırlama

<u>Kimyasal</u>	<u>Konsantrasyon</u>
NaCl	114 mM
KCl	3,2 mM
NaH ₂ PO ₄	0,34 mM
Na-Laktat	20 mM
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,5 mM
HEPES	10 mM
Sodyum Pirüvat	0,2 mM
Sorbitol	12 mM
Gentamisin	21 mM
Penisilin	0,174 mM
Kimyasallar 1 lt distile su içerisinde çözündürülmüştür.	

NCM (Kapasitasyonu İndükleyici Özelliği Olmayan Medyum) Hazırlanması

11 mM D-Glukoz 1 lt TL-HEPES içerisinde çözündürülmüştür ve pH=7,2- 7,3 arası olarak hazırlanmıştır.

CM (Kapasitasyonu İndükleyen Medyum) Hazırlanması

2 mM CaCl₂.H₂O, 25 mM NaHCO₃, 5 mM Pirüvik Asit, 0,01 mM PVA 50 ml NCM içerisinde çözündürülmüştür ve son olarak yoğunluğu %3 olacak şekilde BSA katılmıştır. pH=7,3-7,4 arası ayarlanmıştır.

Lizis Solüsyonu

Tris	50 mM
NaCl	150 mM
NP-40	%1
Proteinaz İnhibitör Kokteyl	%1

Kimyasallar 100 ml distile suda çözündürülmüştür. pH=7,3-7,4 arası ayarlanmıştır.

%3'lük Bloklama Solüsyonu Hazırlama

100 ml PBS-Tween 3 g süttozu ile karıştırılmıştır.

Blotlama Solüsyonu Hazırlama

Tris	3,025 g
Glisin	14,4 g
Methanol	200 ml

Kimyasallar 1 lt distile su içerisinde çözündürülmüştür.

Ponceu S Solüsyonu

Ponceu S	0,2 g
Glasiyal Asetik Asit	3 ml

3.1.6. Etik Kurul

“Ubikütün proteazom sistemi (UPS) proteinlerinin insan sperm kapasitasyon ve akrozomal reaksiyondaki rolü ve fertilizasyona etkisinin belirlenmesi” başlıklı tez çalışmam Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığınca, etik kurallara uygun bir çalışma olarak kabul edilmiştir (Ek-1). Ayrıca Missouri Üniversitesi/ABD Prof. Dr. Peter Sutovsky laboratuvarında yapılan çalışmalar da insan spermi ile çalışmalar yapabilmem için CITI sertifikasını aldıktan sonra ile çalışmalar yapılmıştır (Ek-2). Amerika'daki 1 yıllık eğitimimin ardından Türkiye'ye döndükten sonra Missouri Üniversitesinde edindiğim deneyimlerle yapılan deneyler için araştırma görevlisi olarak çalışmakta olduğum Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim dalına bağlı olan Androloji laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan onaylı etik belgemiz Ek-3'de yer almaktadır.

3.1.7. Deneylerde Kullanılan Örneklerin Elde Edilmesi

Tezimin çalışmalarını yapmak üzere insan sperm örnekleri kullanılmıştır. Yapılan çalışmalar için insan etik kurulunun onayı sonrasında rutin semen analizi için başvuran infertil ve çocuk sahibi fertil gönüllü donörlerden aydınlatılmış onam formu imzalatılarak elde edilen ejakülatlar kullanılmıştır.

Fertil bireyler 18-45 yaş arasında, herhangi bir sistemik rahatsızlığı olmayan ve son 12 ay ya da daha kısa süre içerisinde çocuğu olan babalar arasından seçilmiştir. İnfertil bireyler ise yine 18-45 yaş arasında, herhangi bir sistemik rahatsızlığı olmayan ve son bir yıl içerisinde düzenli korunmasız cinsel ilişkiye rağmen çocuk sahibi olamayan üroloji bölümüne başvurmuş ve de Üroloji bölümünden infertilite tanısı alarak Androloji laboratuvarına sperm analizi için gönderilen bireyler arasından seçilmiştir. Araştırmaya genital sistemlerinde anatomik anormallik olan, varikozel tanısı konmuş, genital enfeksiyon geçirmiş, skrotal cerrahi öyküsü olan, sistemik hastalıklara sahip ve kadın faktöründen kaynaklanan infertilite problemi olan erkekler dahil edilmemiştir. Ayrıca, semen örneğinde lökosit, eritrosit bulunan, semen likefikasyonunda sorun yaşanan, 18 yaş altı ve 60 yaş üstü olan bireyler de dahil edilmemiştir.

Doktora tezimi hakkında araştırma yapmak üzere Tübitak 2214-A bursu ile gitmiş olduğum Missouri üniversitesinde yapmış olduğum çalışmalar için ise tüm sperm örnekleri ise Missouri University, Internal Review Board (MU IRB) protokolüne uyularak alınmıştır. Missouri üniversitesinden yapılan ilan ile yeni baba olmuş donörler seçilmiş ve semen örnekleri Missouri Üniversitesi Üreme Tıbbı ve Fertilite Kliniğinde toplandıktan sonra tez konumda araştırma yapmak üzere gitmiş olduğum Missouri Üniversitesinde görevli Prof. Dr. Peter Sutovsky'nin üreme fizyolojisi laboratuvarına getirilmiştir.

3.2. Metod

Tezimde ubiquitin proteazom sistemi proteinlerinden olan p97/VCP, NEDL2 ve PAWP proteinlerinin insan sperm kapasitasyonu ve infertilite sürecindeki rolünü araştırmak üzere immünofloresan, Western blot, akım sitometri ve görüntülemeli akım sitometri yöntemleri kullanılarak iki ana deney akış şeması oluşturulmuştur.

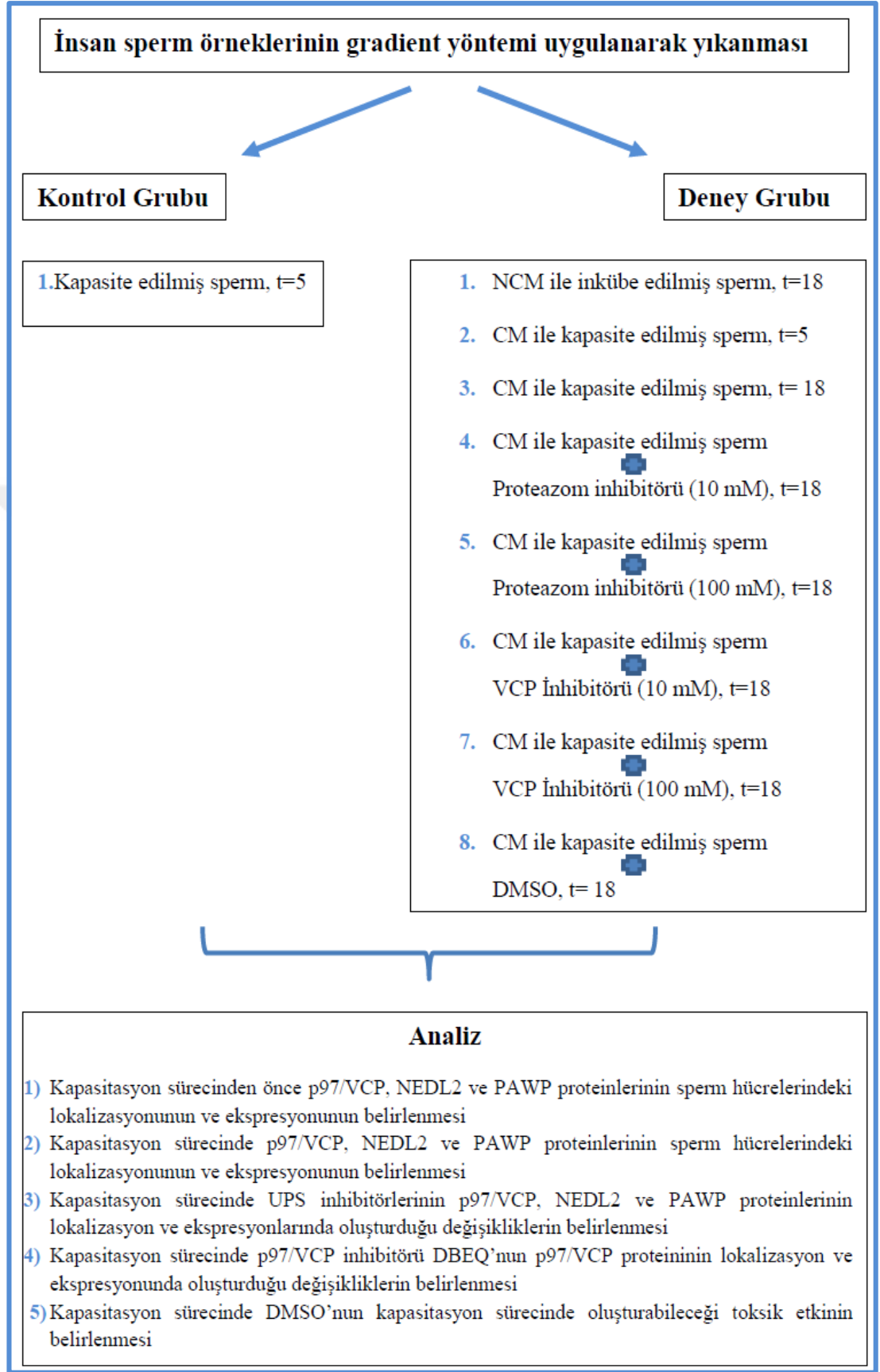
Birinci deney akış şeması UPS protetinlerinden p97/VCP, NEDL2 ve PAWP proteinlerinin insan sperm kapasitasyon sürecindeki rolünü saptayabilmek için kapasitasyonu indüklenmiş ve indüklenmemiş sperm hücrelerinden elde edilen gruplar ile oluşturulmuştur.

Bu amaçla kontrol grubu olarak gradient yöntemi ile yıkandıktan sonra 0.saatte inkübe edilmeden kullanılan sperm örnekleri seçilmiştir.

Deney grubunu oluşturan sekiz gruptan ilkini kapasitasyonu indükleyici özelliği olmayan medyum ile 18 saat inkübe edilen grup, ikincisini kapasitasyon medyumu ile 5 saat inkübe edilen grup, üçüncüsünü kapasitasyon medyumu ile 18 saat inkübe edilen grup oluşturmaktadır.

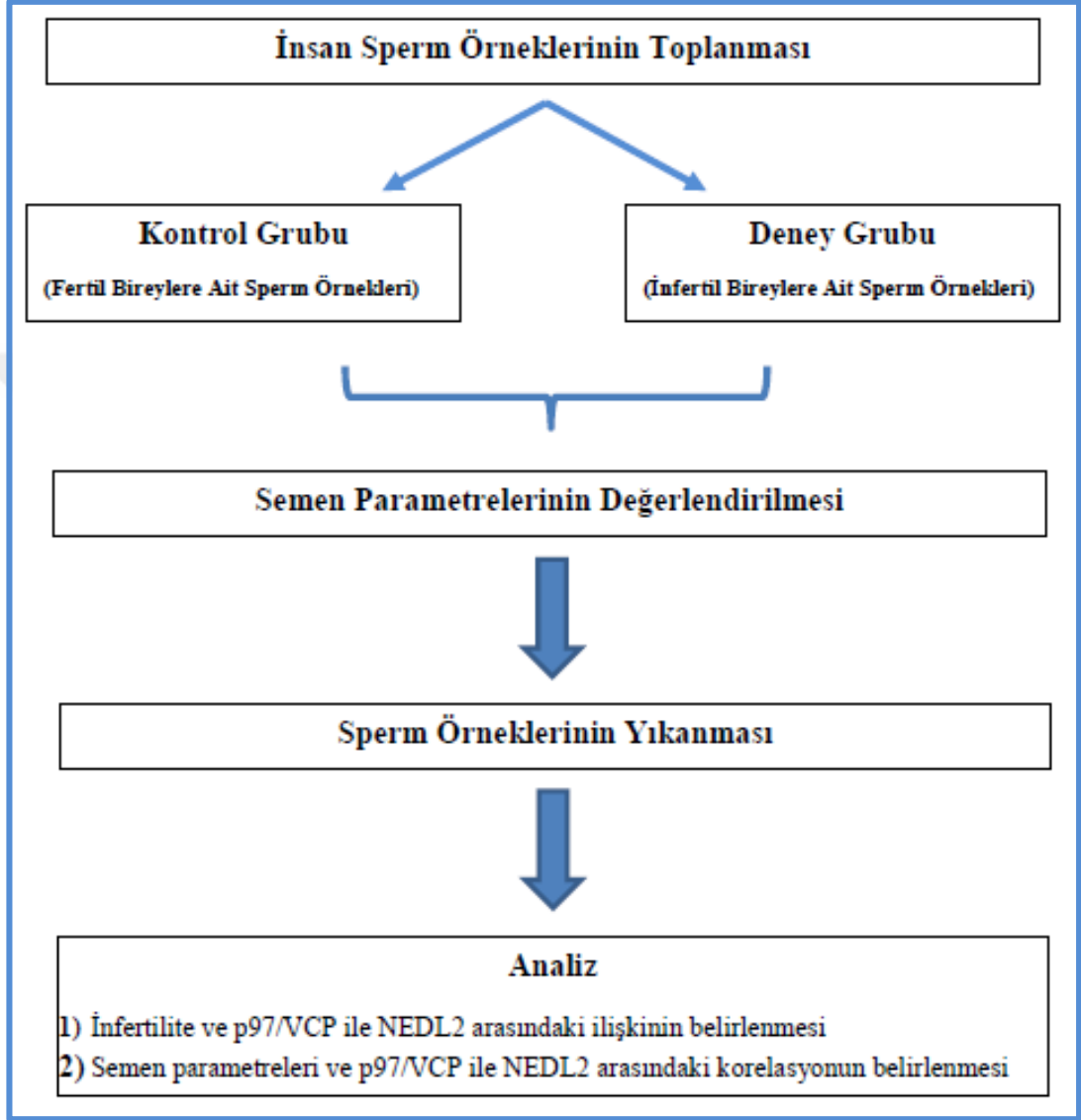
Dördüncü grubu ise UPS inhibitörlerinden MG-132, Epokmisin ve CLBL'in kapasitasyon sürecine düşük konsantrasyondaki etkisini gözlemleyebilmek için bu inhibitörlerin 10 mM konsantrasyon oranında içeren kapasitasyon medyumu ile 18 saat inkübe edilen grup, beşincisini UPS inhibitörlerinden MG-132, Epokmisin ve CLBL'in kapasitasyon sürecine yüksek konsantrasyondaki etkisini gözlemleyebilmek için bu inhibitörlerin 100 mM konsantrasyon oranında içeren kapasitasyon medyumu ile 18 saat inkübe edilen grup, altıncısını bir p97/VCP inhibitörü olan DBEQ'nun kapasitasyon sürecinde p97/VCP'ye düşük konsantrasyonunun etkisini saptayabilmek için bu inhibitörü 10 mM oranında içeren kapasitasyon medyumu ile 18 saat inkübe edilen grup oluşturmaktadır.

Yedinci grubu DBEQ'nun kapasitasyon sürecinde p97/VCP'ye yüksek konsantrasyonunun etkisini saptayabilmek için bu inhibitörü 100 mM oranında içeren kapasitasyon medyumu ile 18 saat inkübe edilen grup ve son olarakda sekizinci grubu inhibitörleri çözdürmek için kullandığımız DMSO'nun kapasitasyon sürecine olan toksik etkisini saptayabilmek için ise 100 mM oranında DMSO içeren kapasitasyon medyumu ile 18 saat inkübe edilen grup oluşturmıştır (Şekil 3.1)



Şekil 3.1. Birinci deney akış şeması: Oluşturulan tüm gruplarda immünofloresan, akım sitometri ve Western blot yöntemleri kullanılarak deneyler yapılmıştır.

İkinci deney akış şeması ise infertiliteye p97/VCP ve NEDL2 proteinlerinin etkisini araştırabilmek için kontrol grubu olarak fertil bireylere ait sperm örnekleri ve deney grubunu oluşturmak için ise androloji laboratuvarına infertilite tanısı alarak başvuran bireylerin sperm örnekleri kullanılarak oluşturulmuştur (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. İkinci deney akış şeması: Oluşturulan tüm gruplarda immüno Floresan, akım sitometri ve Western blot yöntemleri kullanılarak deneyler yapılmıştır.

3.2.1. Deneylerde Kullanılan Teknikler

Tezimde öncelikle laboratuvara gelen sperm örnekleri rutin semen analizine tabii tutulmuş, takiben sperm örnekleri immüno Floresan, akım sitometri, görüntülemeli akım sitometri ve Western blot teknikleri ile incelenmiştir.

3.2.1.1. Sperm Analizi

Rutin semen analizi için androloji laboratuvarına başvuran donörlerden cinsel perhiz süresi 2-7 gün ile uyumlu olan bireylere ait sperm örnekleri ile çalışılmıştır. Mastürbasyon tekniği ile elde edilen semen örnekleri steril idrar kabında toplanmış takiben 37 °C sıcaklıktaki etüv içine alınmıştır. 15 dakikalık aralıklarla kontrol edilen örneklerin likefikasyon süresi belirlenmiş ve likefiye olan semen örnekleri öncelikle makroskopik takiben ise mikroskopik değerlendirmeye tabii tutulmuştur. WHO (2010) kriterlerine göre semen analizine tabii tutulan spermier hazır gradient medyumu (Sperm yıkama medyumu, %45-%90, Gynemed) kullanılarak yapılan yıkama işleminden sonra analiz edilmişlerdir.

Makroskopik olarak hacmi, rengi, vizkozitesi ve likefikasyon süresi değerlendirilen sperm örnekleri daha sonra mikroskopik değerlendirmeye tabii tutulmuştur.

Mikroskopik inceleme için değerlendirme amacıyla örneklem alınmadan önce numune iyice karıştırılmıştır ve Makler sperm sayım kamerasına 1 damla (yaklaşık 10 ul) semen örneğinden konularak mikroskop altında inceleme yapılmıştır. Mikroskop altında öncelikle sperm örnekleri aglütinasyon ve epitel hücreleri ya da lökosit, eritrosit gibi hücreler olma potansiyeli taşıyan “yuvarlak hücreler” açısından incelenmiştir. Daha sonra hareketlilik açısından değerlendirmeye tabii tutulan sperm hücreleri her spermatozoanın hareketliliği WHO (2010) kriterleri gözönüne alınarak aşağıdaki gibi derecelendirilmiştir;

- İleri hareket: Hızdan bağımsız olarak doğrusal veya geniş bir daire içinde aktif olarak hareket eden spermatozoaları içerir.
- Yerinde hareket: Bu sınıftaki sperm hücrelerinde ileriye doğru hareketin yoktur fakat küçük daireler halinde yüzmeye, başı yerinden güçlölle oynatan kamçısall hareket veya yalnızca kuyruğun kamçısall hareketi gibi örnekler gözlenebilir.
- Hareketsizlik: sperm hücrelerinin tamamen hareketsiz olduğu sınıftır.

Deneylerimizde baz aldığımız normal spermiyogram parametreleri WHO (2010) kriterlerine göre aşağıdaki tabloda (Tablo 2) olduğu gibidir.

Tablo 3.1. Normal Spermiyogram Parametreleri.

Semen volümü (ml)	1.5
Total sperm sayısı (milyon)	39
Sperm konsantrasyonu	15 (milyon/mL)
Total motilite	40 (%)
Progressive motilite	32 (%)
Vitalite	58 (canlı sperm, %)
Sperm morfolojisi	4 (normal formlar, %)
pH	>7.2
Yuvarlak hücre	ml'de 1 milyondan az
Likifikasyon süresi	≤60 dk

3.2.1.2. Sperm Örneklerinin İmmüno Floresan, Flow Sitometri ve Western Blot Yöntemleri için Hazırlanması

Sperm örnekleri rutin semen analizine tabii tutulduktan sonra fertil ve infertil gruplar oluşturulmuştur. Takiben kapasitasyon deneyleri ve infertilite deneyleri için iki farklı yöntem kullanılarak yıkama işlemi yapılmıştır.

Sperm örnekleri kapasitasyon deneyleri için gradient yöntemi uygulanarak yıkama işlemine tabii tutulmuştur. Bu işlem için Sil-Select Plus Gradient Kiti kullanılmıştır. Kit içerisinde bulunan % 90'lık birinci fazdan 2,5 ml alınarak falkon tüpüne konulmuş ve üzerine 2,5 ml % 45'lik ikinci faz iki fazın birbiri içerisine karışmasını önlemek amacıyla yavaşça damlatılarak konulmuştur. Likefiye olan sperm örneği hazırladığımız gradient fazlarının üzerine yavaşça damlatılarak faz solüsyonları ile karışmaması sağlanmış ve 1800 RPMI'da 15 dakika santrifüj edilmiştir. Gradient metodu sonucu tüpün alt kısmına çöken hareketli spermler alınarak Tyrode-Lactate sperm yıkama solüsyonu ile yıkanmış ve spermler 2100 RPMI' da 10 dakika tekrar santrifüj edilmiştir. Yıkama sonrası elde edilen pelletler kapasitasyon deneylerine tabii tutulduktan sonra immüno floresan ve flow sitometri deneyleri için %2 formaldehit içeren PBS solüsyonunda 40 dk. boyunca fikse edilmiştir. Fiksasyonu takiben hücreler 3 kez PBS ile yıkanarak her seferinde 5 dk boyunca 2100 RPMI'da santrifüj edilmiştir. Santrifüjü takiben hücreler PBS içinde +4' °C'de flow sitometri ve immüno floresan deneyleri için hazır bir şekilde bekletilmiştir.

İnfertilite deneyleri için ise sperm örnekleri PBS solüsyonu kullanılarak yıkama işlemine tabii tutulmuştur. Bu işlem içine likefiye olan sperm örnekleri falkon

tüpüne alınmış ve üzerine 37 °C' de ısıtılmış PBS solüsyonu total hacim 10 ml olacak şekilde eklenmiştir. Sperm örneği ile PBS'in tamamen karışması için pipetaj yaptıktan sonra 1800 RPMI'da 15 dakika santrifüj edilmiştir. Tüpün alt kısmına çöken spermier alınarak Tyrode-Lactate sperm yıkama solüsyonu ile yıkanmış ve sonrasında tekrar santrifüj edildikten sonra %2 formaldehit içeren PBS solüsyonunda 40 dk. boyunca fikse edilmiştir. Fiksasyonu takiben hücreler PBS içinde +4 °C'de flow sitometri ve immünofloresan deneyleri için hazır bir şekilde bekletilmiştir.

Western Blot için ise yıkama işleminden geçirilen hücreler kapasitasyon deneyleri için inkübasyona tabii tutulduktan sonra, infertilite deneyleri için ise yıkama işlemini takiben sperm yıkama solüsyonu ile 3 kez 5 dakika yıkanmış ve sonrasında hemen -80 °C' ye konulmuştur.

3.2.1.3. İmmünofloresan

PBS içerisinde fikse olmuş halde saklanan sperm örneklerinden immünofloresan yapmak için öncelikle polilizinli bir lam üzerine sınırları pap pen ile çizilmiş bir kare oluşturularak bu bölge içerisine yaklaşık 400 µl PBS konulmuştur. PBS üzerine yaklaşık 10 µl sperm örneği konularak 5 dakika bekletilmiş ve 5 dakika sonra lam üzerindeki solüsyonu alınıp yerine permeabilizasyon için 200 µl % 0.1 Triton-X 100 içeren 0,1 M PBS konularak 40 dakika bekletilmiştir. Daha sonra permeabilizasyon solüsyonunu döküp yerine bloklama solüsyonu olarak kullandığımız 0.1 M Triton-X 100 ve % 5 NGS içeren 0,1 M PBS ile 25 dakika bloklama yapılmıştır. Daha sonra bloklama solüsyonunu lam üzerinden alıp yerine etiketleme solüsyonu içerisinde hazırladığımız antikorlarımız konulmuş ve +4 °C'de bir gece inkübe edilmiştir. Anti-VCP antikorı için 1:100, Anti-NEDL2 antikorı için 1:100 ve Anti-PAWP antikorı için ise 1:200 dilüsyon oranı kullanılmıştır. Ertesi gün aynı zamanda etiketleme solüsyonu olarak kullandığımız yıkama solüsyonunda lamlar yıkanıp hücreler 40 dakika boyunca oda sıcaklığında sekonder antikor ile inkübe edilmiştir. Takiben lamlar iki kez 5 dakika boyunca yıkanmıştır. Daha sonra lamlar florasan uyumlu DAPI içeren kapatma solüsyonu ile kapatılmış ve hücreler Amerika'da yapılan deneylerde Nikon Eclipse 800 mikroskop (Nikon Inc.) ve Cool Snap kamera (Roper scientific, Tuscon, AZ, ABD) kullanılmıştır. Türkiye'de yapılan

deneylerde ise Olympus BX 53 mikroskobu ve Zeiss Axio Imager M2 ile kullanılmıştır.

3.2.1.4. Akım Sitometri

PBS içerisinde fikse olmuş halde saklanan sperm örneklerinden flow sitometri yapmak için öncelikle her grupta eşit sayıda hücre olabilmesi için ependorf tüplerine 1 milyon/ml olacak şekilde hücre konulmuştur. 2100 RPMI'da 5 dakika santrifüj edilen numunelerin süpernatant kısmı atılmış ve kalan pelletin üzerine 100 µl permeabilizasyon solüsyonu olan % 0.1 Triton-X 100 içeren 0,1 M PBS eklenmiştir. Daha sonra 2100 RPMI'da 5 dakika santrifüj edilen numunelerin süpernatant kısmı atılmış ve kalan pelletin üzerine bloklama solüsyonu olan 0.1 M Triton-X 100 ve % 5 NGS içeren 0,1 M PBS ile 25 dakika bloklama yapılmıştır. Takiben ependorf tüplere Anti-VCP antikoru için 1:100, Anti-NEDL2 antikoru için 1:100 ve Anti-PAWP antikoru için ise 1:200 dilüsyon oranı kullanılarak primer antikorlar eklendi. Ertesi gün 2100 RPMI'da 5 dakika. santrifüj edilen numunelerin süpernatant kısmı atılmış ve kalan pelletin üzerine yıkama solüsyonu olan 0.1 M Triton-X 100 ve % 1 NGS içeren 0,1 M PBS eklenerek hücrelerin yıkanması sağlanmıştır. Daha sonra hücrelerin üzerine etiketleme solüsyonundan 100 µl bırakılarak üzerlerine Anti- Rabbit Texas Red Sekonder antikor eklenmiş ve 40 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben hücreler santrifüj edilmiş ve PBS içerisine alınarak Akım sitometri cihazında okutulmuştur. Türkiye'de yapılan çalışmalarda Akım sitometri olarak (ACEA Biosciences, NovoExpress kullanılmıştır.

3.2.1.5. Görüntülemeli Akım Sitometri

Amerika'da yapılan akım sitometri çalışmalarında henüz Türkiye'de bulunmayan fakat özellikle baş, kuyruk gibi farklı hücresel bölümlerinde farklı morfolojik özellikler sunan sperm hücresinde önemli datalar toplamamızı sağlayan görüntülemeli akım sitometri cihazı Amnis FlowSight Imaging Flow Cytometer (EMD Millipore Corp., Seattle, WA, ABD) kullanılmıştır.

Görüntülemeli Akım Sitometri cihazı, saniyede 4.000 olaya kadar 12 floresan kanalda hücresel görüntü elde etmek için tasarlanmış bir tezgah üstü, çok spektrumlu

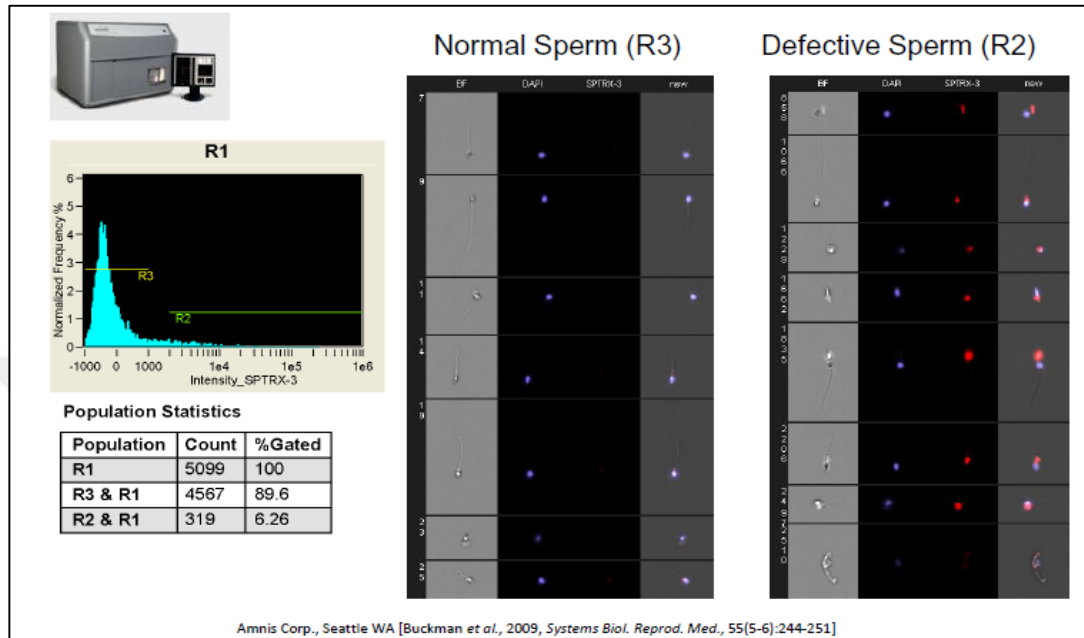
akım sitometresidir. On iki standart algılama kanalı sayesinde aynı anda her hücrenin aydınlık, karanlık alan ve on adede kadar floresan görüntüsünü üretir. Hücre başına çok sayıda dijital görüntü toplayarak ve görüntü tabanlı özelliklerin sayısal bir gösterimini sağlayarak standart mikroskopinin sağladığı hücre başına bilgi içeriğini standart akım sitometrisinde ortak olan büyük örnek boyutlarının sağladığı istatistiksel önem ile birleştirir. Bu sistem ile floresans yoğunluk ölçümleri geleneksel bir akım sitometresinde olduğu gibi elde edilir; bununla birlikte sistemin görüntüleme kapasitesinin avantajlarını kullanarak hücrelerin içindeki veya arasındaki sinyallerin dağılımını bulur ve nicelleştirir.

Görüntülemeli Akım Sitometri cihazı, CCD kamerası sayesinde, tüm kanallarda geleneksel akım sitometrelerinin en az on katı olan floresan duyarlılığı sağlar. Yüksek çözünürlüklü mikroskopi ve akım sitometrisini birleştiren görüntülemeli akım sitometri cihazı akım sitometrisinin hız, hassasiyet ve fenotipleme yeteneklerini, ayrıntılı görüntüler ve mikroskopinin işlevsel bilgileri ile birleştirir. Bu benzersiz kombinasyon ile sadece her iki tekniği kullanarak geniş bir uygulama ve bilgi toplama yelpazesine olanak tanır.

Sutovsky ve arkadaşları sperm hücrelerindeki biyobelirteçleri analiz etmek amacıyla, görüntülemeli akım sitometrisi (ImageStream high speed quantitative imaging cytometer, Amnis Corp., Seattle, WA)'nin kullanımını ilk defa göstermişlerdir. Akım sitometriden geçen her bir sperm hücresi için yüksek resolusyonda 6 farklı foto (bright field, side scatter, ve up to 4 kanal floresan) çeken ve prob yoğunluğu, büyüklüğü, şekli, yapısı ve lokalizasyonu ile ilgili parametreleri de detaylandıran bu cihaz sayesinde yeterli sayıda örnekleme ile sperm morfolojisi ile biyobelirteçlerin yoğunlukları arasında direk bir ilişki bu alet sayesinde kurulmaktadır. Nitekim Buckman ve Sutovsky, yaptıkları çalışmalarda, PAWP ve SPTRX3 biyobelirteçlerinin bu yöntemle çalışarak erkek infertilitesinin tanısı için kullanılabilecek biyobelirteçler olduğunu göstermişlerdir (17).

Tezimde IVF merkezlerinde ve androloji laboratuvarlarında kullanılan test ve tekniklere ek olarak Türkiye’de daha önce hiç kullanılmamış bir tekniğin tanıtılması sağlanacaktır. Bu tekniğin öğrenilmesi ile kazanılan deneyim ve tecrübelerin Türkiye’deki meslektaşlarımıza aktarılması ve bu alanda bilgi ve tecrübe

edinilmesinin Türkiye için de katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Bu deneyimlerden yararlanılarak Türkiye’de yapılacak olan ileri çalışmalar ile ülkemizde ilgili araştırma konusunda büyük bir adım atılmış olacaktır.



Şekil 3.3. Görüntülemeli akım sitometri cihazının ve bu cihazda yapılan bir sperm çalışmasının görüntüleri

3.2.1.6. Western Blotlama

Hücre Ekstraktının Hazırlanması

-80 °C’de saklanan sperm örneklerinin homojenizasyonu proteinaz inhibitörü içeren lizis solüsyonu ile muamele sonucu sonikatör kullanılması ile gerçekleşmiştir. Aynı gün hazırlanarak soğutulmuş liziz solüsyonu içerisine alınan sperm örnekleri ultrasonik homojenizatör (sonikatör) ile 15-30 saniye kadar muamele edilerek homojenize olmaları sağlanmış ve de takiben 21’lik insülin iğneleri ile tam olarak süspanse olup olmadıkları kontrol edilerek takiben 10 dakika +4 °C’de 13,000 x g ‘de santrifüj edilmişlerdir. Santrifüj sonrası oluşan pelletin üzerindeki süpernatant hücre sitoplazmik ekstraktı ayrı bir ependorf tüpüne alınarak kullanılırken pellet kısmı atılmıştır. Elde edilen hücreler SDS jel yükleme solüsyonu ile 1/10 (yükleme solüsyonu/lizat) oranında karıştırılmış ve 96 °C’de 10 dakika kaynatılarak proteinlerin denatüre olması sağlanmıştır. Kaynatma sırasında buharlaşarak ependorf tüpünün

kapağında toplanan bir kısım örneğin de ependorfun alt kısmında olması için tüpler santrifüj edilerek jele yüklemeye hazır hale getirilmiştir.

1D-SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi

SDS Jel elektroforez ünitesine %4-12'lik Bis- Tris Jel (1.0 mmX10 well) yerleştirilmiş ve jel yerleştirildikten sonra tankın içerisinde oluşan orta bölüme 1X MES elektroforez solüsyonu dökülmüştür. Jelin içerisindeki kuyucuklara yerleştirilmiş olan tarak jelden nazikçe uzaklaştırılıp, kuyucuklar insülin iğnesi kullanılarak elektroforez solüsyonu ile yıkanmıştır. Tankın ön ve arka bölümlerine orta bölümden bir sızma olmadığından emin olunduktan sonra ön ve arka bölümlerde 1X MES elektroforez solüsyonu ile doldurulmuştur. Takiben örnekler hızlı bir şekilde jele yüklendikten sonra proteinlerin jel içerisinde elektrik akımı etkisi ile ilerleyebilmeleri için jel elektroforez ünitesi güç kaynağına bağlanmış ve 120 Volt, 300 miliamper ve 250 Watt ayarında yaklaşık 1 saat 40 dakika yürütülerek proteinlerin jelde ayrıştırılmaları sağlanmıştır.

İmmünoblotlama

Yürütme bitmeden önce membran ve iki adet filtre kağıdı blotlama solüsyonu içinde bekletilmiştir. Yürütme bittikten sonra jel elektroforez ünitesinden çıkartılmış ve jel üzerindeki elektrik iletken bölge kesilmiştir. Jeli kasetten blotlama solüsyonu içerisine nazikçe bırakılmış ve solüsyon içerisinde iyice yıkanması sağlanmıştır. Islanan filtre kağıdı transfer ünitesine yerleştirip üzerine membran, onun üzerinede jel, en üste ise tekrar filtre kâğıdını yerleştirip transfer cihazı 200 mA, 120 Volt ve 250 Watt ayarında 1 saat 20 dakika boyunca jelden membrana proteinlerin transfer olması için çalıştırılmıştır. Transfer süresi bittikten sonra ilk olarak jelden membrana proteinlerin geçip geçmediğini anlamak için membran Ponceu S boyası ile 1-2 dk boyanmış proteinlerin membrana geçtiğinden emin olduktan sonra membran önce distile su sonra ise tween içeren PBS ile boya tamamen gidene kadar yıkanmıştır. Bu işlemden sonra membrana uygulayacağımız antikor ile membran arasındaki nonspesifik bağlanmaları en aza indirmek için % 3'lük süttozu ile oda ısısında 1 saat rotator üzerinde bloklama yapılmıştır. Süttozu solüsyonundaki proteinler mebran üzerinde hedef proteinden yoksun olan tüm bölgeyi kaplar. Böylece kullanacağımız

primer antikorların sadece hedef proteinlere bağlanması sağlanır. Sonuç olarak zemin kirliliğinden kaynaklanan pozitif sonuçlar önlenir. Daha sonra membranı süt tozundan arındırmak için membran yıkanmış ve takiben membran primer antikorlar ile geceboyu +4' °C'de inkübe edilmiştir. Anti-VCP antikoruna için 1:1500, Anti-NEDL2 antikoruna için 1:500 ve Anti-PAWP antikoruna için ise 1:200 dilüsyon oranı kullanılmıştır. Membran ertesi gün üç kez PBS-Tween ile yıkanmış ve takiben HRP-konjuge-sekonder antikor içerisinde 1 saat bekletilmiştir. Sekonder inkübasyonun ardından üç kez PBS Tween ile yıkanan membran ECL Detection Ajanı ile 2-5 dakika inkübe edilmiş ve görüntüleme cihazı kullanılarak membran üzerindeki proteinler görüntülenmiştir. Sekonder antikor üzerinde bulunan HRP enzimi, ECL içerisinde bulunan Lumigen-PS3 substratını katalizler ve açığa çıkan luminol ışımaya yol açar ve bu ışımaya UVP cihazı ile toplanarak ölçülür. Membran üzerindeki bantların dansitesi Image J programı kullanılarak değerlendirilmiştir.

3.2.2. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistik Analizler

İstatistiksel değerlendirmeler Sigma Plot versiyon 10 (Jandel Scientific Corp. San Rafael, CA) ve SPSS istatistik programı (SPSS for Windows vers. 22) kullanılarak değerlendirilmiş ve anlamlılık $p < 0.05$ olarak değerlendirilmiştir. Farklı gruplar arasındaki ortaya çıkabilecek muhtemel farklılıklar karşılaştırmalı testler (t-test, ANOVA) ile değerlendirilmiştir.

Western blot çalışmaları sonrası band yoğunlukları Image J analiz programında okutulmuştur.

Akım sitometri çalışmalarından elde edilen data'lar ise ACEA Biosciences NovoExpress yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir.

4. BULGULAR

Tezimde ubikütün proteazom sistemi proteinlerinden olan p97/VCP, NEDL2 ve PAWP proteinlerinin insan sperm kapasitasyonu ve infertilite sürecindeki rolü araştırılmıştır.

İnsan sperm kapasitasyonunda p97/VCP, NEDL2 ve PAWP proteinlerinin rolünü saptayabilmek amacı ile kapasitasyonu indüklenmiş ve indüklenmemiş sperm örneklerinde p97/VCP, PAWP ve NEDL2 proteinlerinin lokalizasyon ve ekspresyonlarındaki değişiklikler karşılaştırmalı olarak belirlenmiştir. Bu amaçla öncelikle kapasitasyon öncesi süreçte sperm hücrelerinde p97/VCP, PAWP ve NEDL2 proteinlerinin lokalizasyonunu ve ekspresyonunu değerlendirmek için gradient yöntemi ile yıkanan sperm örneklerine 0. saatte bu proteinlerin lokalizasyonlarını belirlemek için immünofloresan tekniği, proteinlerin ekspresyon yoğunluğunu saptamak için akım sitometrisi ve de bu proteinlerin sperm hücresindeki miktarını kantitatif olarak saptamak için ise Western blot tekniği uygulanmıştır.

Kapasitasyon sürecinden önce (0. saatte) ve kapasitasyon sürecinde (5. ve 18. saat) p97/VCP, PAWP ve NEDL2 proteinlerinin nasıl bir değişiklik geçirdiklerini gözlemleyebilmek adına farklı süreler kullanılarak sperm hücreleri inkübasyona tabii tutulmuştur. Bu inkübasyon süreleri içerisinde inkübasyon medyumuna kapasitasyonu indükleyici ajanlar eklenmemiş, spermin sadece medyum içindeki kapasitasyonu değerlendirilmiştir. Bu gruplara ek olarak da sperm hücrelerinin spontan olarak kapasitasyona doğru gidip gitmeyeceğini araştırabilmek amacı ile sperm hücreleri gradient yöntemi ile yıkanıp, yıkama sonrası kapasitasyonu indüklemeyen medyumda (Non Capacitation Medyum: NCM: $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, NaHCO_3 , Pirüvik Asit ve PVA gibi sperm kapasitasyonunu indükleyen ajan içermeyen medyum) 18 saat inkübasyona tabii tutulmuştur.

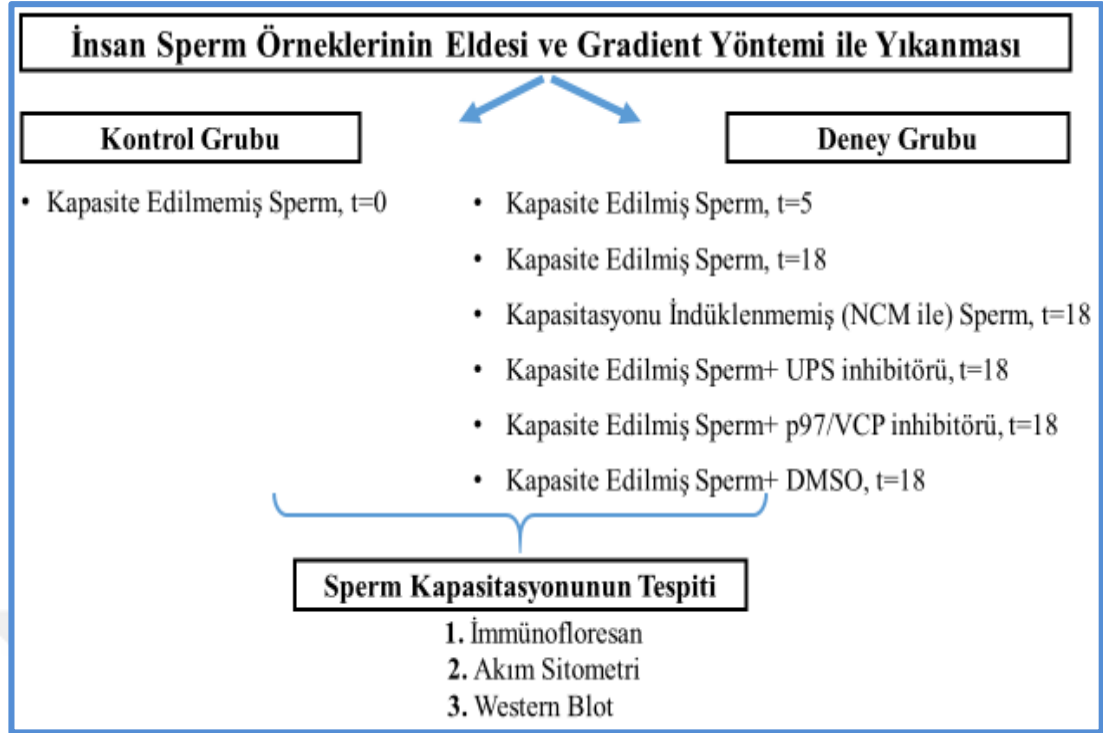
Kapasitasyon deneyleri ile p97/VCP, PAWP ve NEDL2 proteinlerinin bu süreçteki lokalizasyon ve ekspresyon değişimlerini belirlemeye ek olarak ubikütün proteazom sistemi inhibitörleri ve de VCP inhibitörünün de bu sürece olan etkisi kapasitasyon deneylerinin ikinci basamağında araştırılmıştır. UPS inhibitörü olarak NF- κ B ile etkileşip aktivasyonunu inhibe ederek proteazomun tripsin aktivitesini

engelleyen MG-132, proteazomun kemotripsin benzeri aktivitesini inhibe eden Epoksimisin ve kaspaz aktivasyonunu inhibe eden CLBL kullanılmıştır. p97/VCP inhibitörü olarak ise ticari olarak birçok formu olan fakat hücre kültüründe toksik etkisinin en az olduğu kanıtlanmış olan DBEQ kullanılmıştır.

Kapasitasyon sonrasında uygulanan bu inhibitörlerin kapasitasyon sürecine etkileri ve ekspresyonlarında değişiklik olup olmadığı western blot ve akım sitometrisi yöntemleriyle belirlenmiştir. Bu gruplara ait örnekler ile yapılan immüno Floresan çalışmaları sonucu 200 hücre ile yapılan sayımlar sonucunda (n=3) elde edilen verilerin 18 saatlik inkübasyon grubuna ait immüno Floresan sonuçları ile karşılaştırıldığında karakteristik bir farkı gösteren görüntüler alınamamıştır. Ayrıca literatür tarması yapıldığında ise inhibitörlerin etkisinin genellikle akım sitometrik yöntemlerle incelendiği görülmüştür. Yine literatürle uyumlu olarak tezimize ilgili araştırmalar yapmak üzere laboratuvarına gitmiş olduğum Prof. Dr. Peter Sutovsky ve ekibinin yaptığı çalışmalarda da insan sperm kapasitasyonunda inhibitörlerin etkisine akım sitometrik yöntemle bakılmıştır. Tüm bu edinimler sonucunda tezimde inhibitörlerin etkisine akım sitometrik ve Western Blot yöntemleri ile bakılmıştır.

Bu aşamada inhibitörlerin kapasitasyon sürecindeki etkisini tam olarak saptayabilmek için her iki inhibitör de düşük ve yüksek olmak üzere iki farklı konsantrasyonda (10 mM ve 100 mM) kapasitasyon medyumuna ile birlikte 18 saat inkübe edilmiştir (*Sutovsky lab. referans*). İnhibitörleri çözdürmek için kullandığımız DMSO kimyasalının kapasitasyon sürecine olan etkisini saptayabilmek için de hücreler kapasitasyon medyumuna sadece DMSO eklenerek de 18 saat süre inkübasyona tabii tutulmuştur.

Kapasitasyon deneylerinde üç farklı donöre ait sperm hücreleri kullanılmış (n=3) ve bu deneylerde kullanılan sperm örnekleri gradient yöntemi ile yıkama yapıldıktan sonra elde edilmiştir. Gradient yöntemi ile yıkama yapıldıktan sonra, sadece elde edilen hareketli spermier kullandığı için kapasitasyon deneylerinde belirlediğimiz dokuz gruba ait immüno Floresan, flow sitometri ve Western blot deneyleri için yeterli miktarda sperm hücresi elde edebilmek için sadece sperm konsantrasyonu en az 100 mil/ml olan donörler kapasitasyon deneylerinde kullanılmıştır. Özet olarak tez çalışmamın ilk aşamasındaki kapasitasyon deneyleri için aşağıdaki deney akış şeması izlenmiştir (Şekil 4.1).

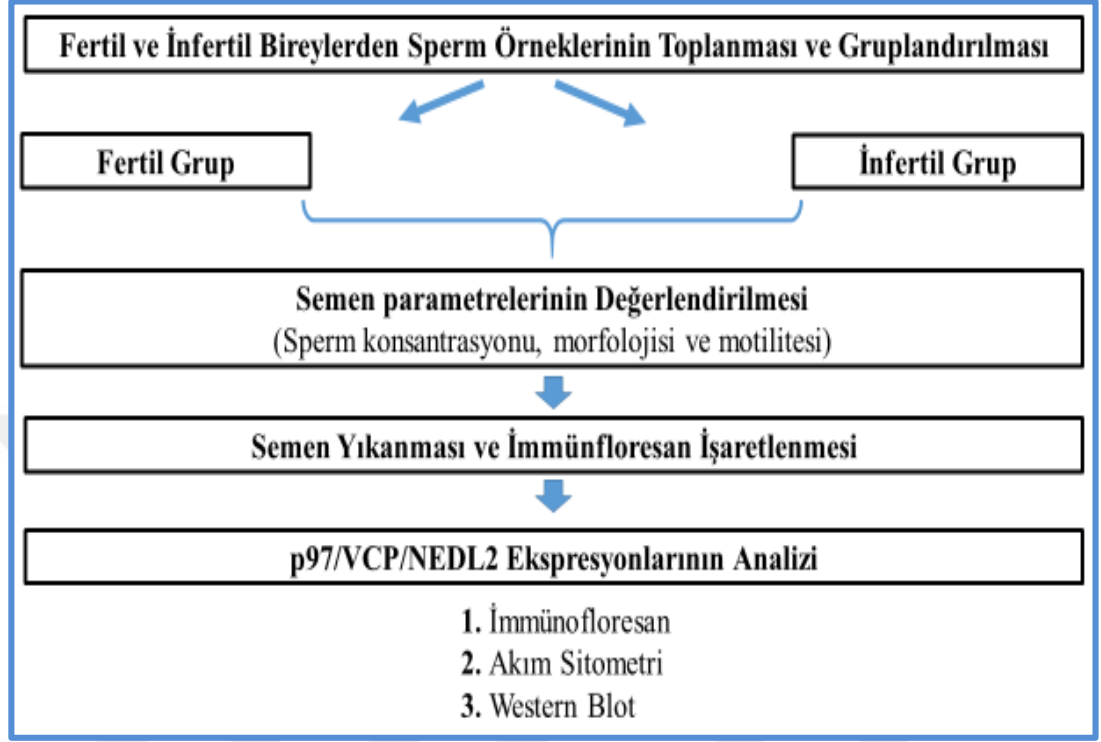


Şekil 4.1. Kapasitasyon sürecinde ubikülin proteazom sistemi proteinlerinin etkisini belirleyebilmek için oluşturulan deney grupları: Kontrol grubuna ait sperm hücreleri hiç inkübe edilmeden yıkama işlemini takiben incelenmiş, deney gruplarında ise farklı medyumlar, farklı inkübasyon süreleri ve de inhibitörler kullanılarak yapılan inkübasyonlar sonucunda sperm hücreleri incelenmiştir.

Tez çalışmamın ikinci aşamasında ise androloji laboratuvarına başvuran fertil ve infertil bireylerde, sperm kapasitasyonu ile ilişkisini düşündüğümüz bu UPS proteinlerinden p97/VCP ve NEDL2'nun fertil ve infertil bireylerdeki ekspresyon farklılıkları belirlenmiştir (Şekil 4.2). Bu kısım 4.2'de ayrıntılı olarak açıklanacaktır. Kapasitasyon deneylerinde çalışılan PAWP molekülü daha öncesinde Dr. Sutovsky laboratuvarında fertil ve infertil bireylerde gösterildiği ve yayın haline getirildiği için tezimin bu aşamasında PAWP değerlendirilmesi fertil ve infertil hasta gruplarındaki çalışmaya dahil edilmemiştir.

İnfertilite deneylerinde 10 fertil ve 10 infertil donöre ait sperm hücreleri kullanılmış (n=10) ve bu deneylerde kullanılan sperm örnekleri PBS ile süspanse edilerek yıkama yapıldıktan santrifüje tabii tutularak hareketli ve hareketsiz tüm sperm hücreleri elde edilmiştir. Bu yöntemle donörlere ait tüm sperm hücreleri kullanıldığı için immünofloresan, flow sitometri ve Western blot deneyleri için yeterli miktarda sperm hücresi kolayca elde edilmiş ve bu nedenle sperm konsantrasyonu için belli

bir sayı koşut olarak belirlenmemiştir. Özet olarak tez çalışmamın ikinci aşamasında da aşağıdaki şemada da görüldüğü gibi bir deney akış yöntemi izlenmiştir (şekil 4.2).



şekil 4.2. İnfertilite sürecinde ubiquitin proteazom sistemi proteinlerinin etkisini belirleyebilmek için oluşturalan deney grupları: Fertil ve infertil bireylerde karşılaştırmalı olarak p97/VCP ve NEDL2 ekspresyonlarını belirlemek için sperm hücreleri immü floresan, akım sitometri ve Western blot yöntemi ile incelenmiştir.

4.1. Ubikütin Proteazom Sistemi (UPS) Proteinlerinden p97/VCP, NEDL2 ve PAWP Proteinlerinin Sperm Kapasitasyonundaki Rollerini

Ubikütin proteazom sistemi proteinlerinden olan p97/VCP, NEDL2 ve PAWP proteinlerinin insan sperm kapasitasyonu sürecindeki rolünü araştırmak amacı ile bu proteinlerin sperm hücrelerindeki lokalizasyonu ve ekspresyonu immü floresan, akım sitometri ve Western blot yöntemleriyle belirlenmiştir.

Öncelikle p97/VCP'nin kapasitasyonu indüklenmiş ve indüklenmemiş insan sperm hücrelerindeki ekspresyonu araştırılmıştır. Bu amaç doğrultusunda sperm hücreleri herhangi bir inkübasyona tabii tutulmadan gradient yöntemi ile yıkama yapıldıktan hemen sonra, 0. saatte sperm yayma prepatları, fikse edilmiş sperm

örnekleri ve de Western blot için -80 °C'de saklanmak üzere sperm örnekleri hazırlanmıştır. Sonrasında, aynı hastaya ait kalan aliquat ikiye ayrılarak 5 ve 18 saatlik kapasitasyon süreleri sonunda belirtilen analizler için kullanılmıştır.

Kapasitasyon deneyleri için sadece fertil (n=3) bireylere ait sperm örnekleri kullanılmıştır. Fertil (n=3) bireyler WHO (Dünya Sağlık Örgütü, 2010, Laboratuvar El Kitabı, İnsan semeninin incelenmesi ve işlemlerden geçirilmesi, 5. Baskı, Cambridge Üniversitesi, Cambridge, UK) kriterlerine göre standart semen analizi ve Kruger morfoloji testine tabii tutulmuştur. Standart semen analizi ile sperm örneğinin hacmi, ejakülatın mililitredeki sperm sayısı, tüm ejakülattaki sperm sayısı, tüm spermilerin hareketlilik yüzdesi, ileri hareketli spermilerin yüzdesi ve likefikasyon süresi gibi kriterlere bakılmıştır. Sperm morfolojisi ise Kruger kriterlerine göre bakılmış ve her bir sperm hücresi baş, akrozomal bölge, mitokondriyal bölge ve kuyruk bölgesinin morfolojisi açısından değerlendirilmiştir. Kruger morfoloji analizi için her bireye ait sperm yayma preparatları Diff Quik boyama ile boyandıktan sonra 200 hücre morfolojik incelemeye tabii tutulmuştur. Kapasitasyon deneylerinde kullandığım fertil bireylere ait semen analizi ve Kruger test sonuçları tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1. Fertil bireylere ait standart semen analizi ve Kruger morfoloji sonuçları

	Hacim (ml)	Sperm Sayısı (10 ⁶ x ml)	Toplam Sperm Sayısı (x10 ⁶)	Total Motilite (%)	İleri Hareketli Sperm (%)	Normal Morfoloji (≥4)	Yaş	Likefikasyon Süresi
Fertil 1 (F1)	3	190	570	68,4	63,1	52	42	40 dk.
Fertil 2 (F2)	5,5	140	770	73,8	69,2	64	30	15 dk.
Fertil 3 (F1)	4	120	480	64,7	61,7	76	36	30 dk.

4.1.1. p97/VCP'nin Kapasitasyonu İndüklenmiş ve Kapasitasyonu İndüklenmemiş Hücrelerdeki Ekspresyonu

p97/VCP'nin kapasitasyon sürecine girmemiş ve kapasitasyon sürecinde sperm hücresindeki ekspresyonunu değerlendirmek amacı ile sperm hücreleri herhangi bir inkübasyona tabii tutulmadan 0. saatte ve de inkübasyonu takiben 5. ve 18. saatlerde incelenmiştir. Spontan olarak kapasitasyon sürecine giren hücreler de p97/VCP lokalizasyonu ve ekspresyonunu saptamak için ise NCM ile inkübe edilmiş ve de yine immünofloresan, Western blot ve akım sitometrik analizler yapılmıştır.

4.1.1.1. p97/VCP'nin Kapasitasyon Sürecinden Önce ve Kapasitasyon Sürecinde İnsan Spermindeki Lokalizasyonunun Belirlenmesi

Kapasitasyon sürecine girmeden önce sperm hücrelerinde p97/VCP'nin lokalizasyonunu saptayabilmek amacı ile sperm hücreleri inkübasyona tabii tutulmadan yıkama işlemini takiben 0. saatte immünofloresan yöntemle incelenmiştir. Kapasitasyon sürecinde p97/VCP lokalizasyonunda bir değişiklik olup olmadığını saptayabilmek için ise NCM (kapasite etmeyen medyum) ile 18 saatlik inkübasyon süreci sonrasında, CM (kapasite eden medyum) ile inkübasyon sırasında ise 5. ve 18. saatlerde p97/VCP'nin sperm hücrelerindeki lokalizasyonuna bakılmıştır. Sperm hücreleri NCM ile de 5 saatlik inkübasyona tabii tutulmuşlardır. Fakat 5. Saat NCM ile 18. Saat NCM arasında boyanma açısından bir fark görülmediği NCM ile 5 saat inkübe edilen grup sonuçları tekrar bulgular arasına konmamıştır.

p97/VCP'nin Kapasitasyon Süreci Öncesi 0. Saatte Sperm Hücresindeki Lokalizasyonu

Fertil bireylere ait normal morfolojiye sahip sperm hücrelerinde p97/VCP' nin lokalizasyonunu saptamak için yapılan immünofloresan çalışmaları sonucunda sperm hücrelerinin p97/VCP için üç farklı boyanma paterni gösterdiği görülmüştür.

Birinci boyanma paterninde tüm kuyruk ve kuyruktan daha şiddetli bir şekilde bağlantı parçasında p97/VCP lokalizasyonu görülürken, başta p97/VCP'nin distal ekvatoryal bölgede tek bölgede çizgi halinde lokalize olmuştur (Şekil 4.3-A) (n=3).

İkinci boyanma paterninde ise p97/VCP birinci boyanma paterninde olduğu gibi tüm kuyruk boyunca ve kuyruktan daha yoğun bir şekilde bağlantı parçasında lokalizasyon gösterirken, başta ise birinci boyanma paterninden farklı olarak distal ekvatoryal bölgede ardışık iki bölgede çift çizgi halinde lokalize olmuştur (Şekil 4.3-E) (n=3). Üçüncü boyanma paterninde ise p97/VCP sadece spermin tüm kuyruğu boyunca ve kuyruktan daha yoğun bir şekilde bağlantı parçasında lokalizasyon gösterirken, baş bölgesinde p97/VCP sinyal vermemiştir (Şekil 4.3-I) (n=3).

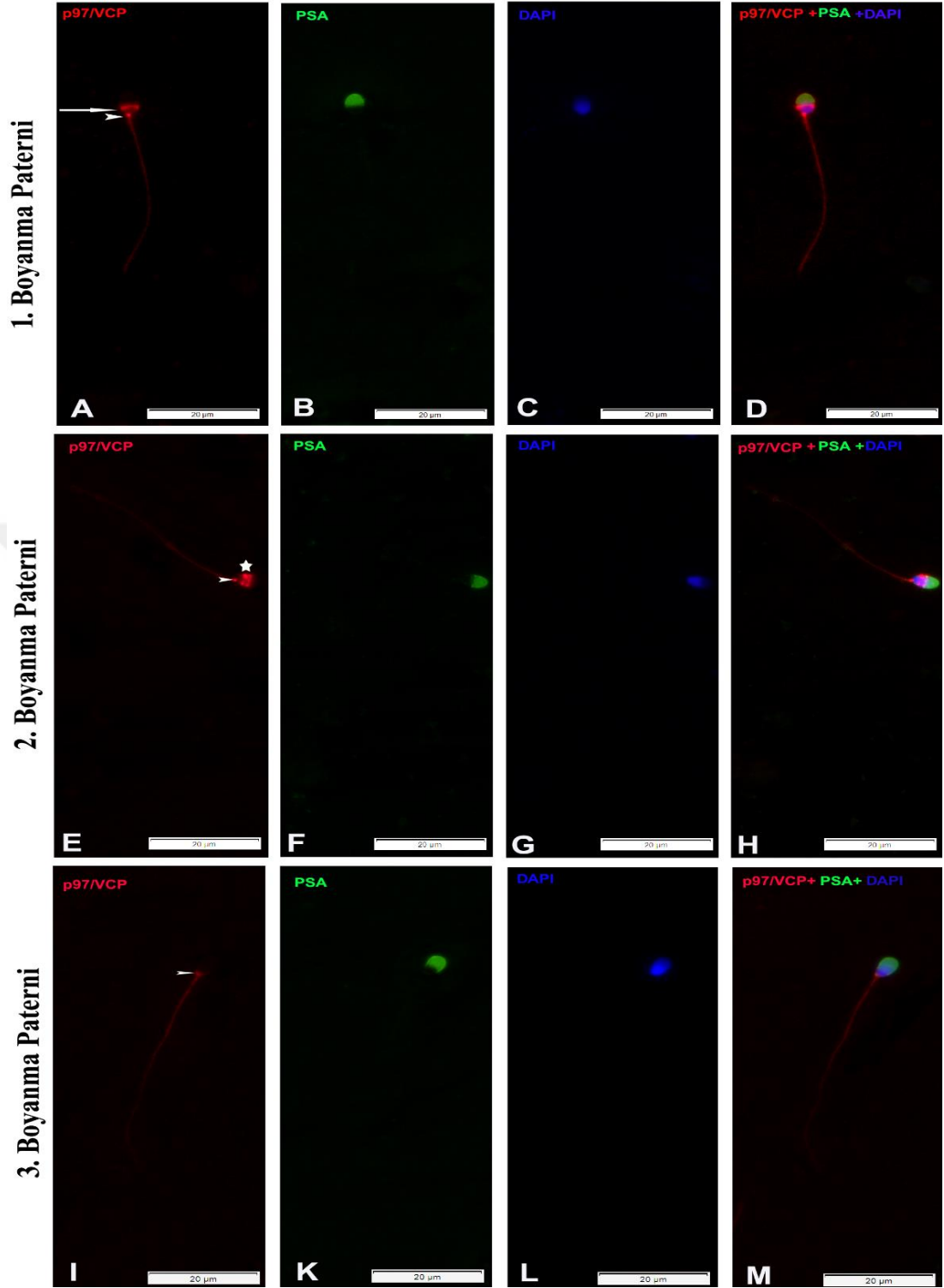
p97/VCP'nin immüno Floresan olarak sperm hücresindeki lokalizasyonunu saptamak için yapılan immüno Floresan tekniğinde hücreler p97/VCP proteininin yanısıra DNA'yı görüntüleyebilmek için DAPI ve akrozomu görüntüleyebilmek için ise PSA ile inkübe edilmiştir. Akrozomal bölgenin görülmesi için kullanılan PSA boyaması sonucunda da 0. saatte sperm hücrelerinin akrozomal bütünlüğünün korunduğu, sınırları düzgün ve boyanma açısından yoğun bir akrozomal bölge gözlenmiştir (Şekil 4.3-B-F-K).

Sperm hücrelerinin çekirdek bölgelerini görüntüleyebilmek için yapılan DAPI boyaması sonucunda ise normal morfolojiye sahip sperm hücreleri ile uyumlu çekirdek bölgeleri gözlenmiştir (Şekil 4.3- C-G-L).

İmmüno Floresan çalışmaları üç farklı donöre ait sperm yayma preparatlarında çalışılmış ve her bireye ait 200 hücre sayılmıştır. Sonuçta p97/VCP'ye ait birinci boyanma paterni hücrelerin %54'ünde, ikinci boyanma paterni hücrelerin % 14'ünde, üçüncü boyanma paterni ise tüm hücrelerin %32'sinde görülmüştür (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Fertil bireylere ait sperm yayma preparatlarında 0. saatte görülen üç farklı p97/VCP boyanma paternlerinin tüm spermler içindeki görülme yüzdesi: 3 farklı fertil bireye ait sperm yayma preparatları incelenmiş, her preparattan 200 hücre sayılmıştır.

	<u>1.Boyanma Paterni</u>	<u>2.Boyanma Paterni</u>	<u>3.Boyanma Paterni</u>
(n=3, 600 sperm)	Kuyruk (+) Bağlantı parçası (+) Distal Ekvatoryal Bölge(+) (Tek çizgi)	Kuyruk (+) Bağlantı parçası (+) Distal Ekvatoryal Bölge(+) (Çift çizgi)	Kuyruk (+) Bağlantı parçası (+)
p97/VCP immunoreaktivitesi (%)	53.33±1.45	14.00±0.58	32.33±1.76



Şekil 4.3. Fertil bireylerde 0.saatte gözlenen p97/VCP boyanma paternleri: A:Fertil bireylere ait sperm yayma preparatlarında p97/VCP'ye ait üç farklı boyanma paterni saptanmış ve görülme yüzdesi en yüksek olan birinci boyanma paterninde tüm kuyruk boyunca, bağlantı parçasında (okbaşı) ve de spermin baş bölgesinde distal ekvatoryal bölgede (ok) lokalize olduğu görülmüştür. E: İkinci boyanma paterninde ise p97/VCP tüm sperm kuyruğu boyunca, bağlantı parçasında ve de baş distal ekvatoryal bölgesinde çift çizgi olarak (yıldız) lokalize olmuştur. I: Üçüncü boyanma paternine göre ise p97/VCP sadece sperm kuyruğunda ve bağlantı parçasında (okbaşı) lokalize olmuştur. Bar: 20 µm

NCM ile İnkübe Edilen Gruplarda p97/VCP'nin Sperm Hücresindeki Lokalizasyonu

NCM solüsyonunda bekletilen sperm hücrelerinin spontan olarak kapasitasyona doğru gidip gitmeyeceğini araştırabilmek amacı ile spermler gradient yöntemi ile yıkama işleminin ardından bu solüsyon içerisinde 18 saat inkübasyona tabii tutulmuştur. İnkübasyonu takiben fikse edilen hücrelerin sperm yayma preparatları hazırlanarak immünofloresan olarak bu proteinlerin hücredeki lokalizasyonuna bakılmıştır.

p97/VCP immünoaktivitesi 0. saatle uyumlu olarak üç farklı boyanma paterni göstermiştir (n=3). Fakat NCM ile inkübasyona tabii tutulan hücreler immünofloresan yöntemi ile incelendiğinde 0. saatten farklı olarak yeni bir boyanma paterni görülmüştür.

Bu boyanma paterninde sperm hücrelerinde distal ekvatoryal bölgede tek ya da çift çizgi halinde görülen p97/VCP boyanma şiddetinin bazı hücrelerde azalmaya başladığı, bazı hücrelerde özellikle hücrenin orta hattından hücre zarına doğru kaybolmaya başladığı gözlenmiştir. Bu paterne ait sperm hücrelerinin bazılarında ise karakteristik olarak başın anterior bölgesinde p97/VCP lokalizasyonunun görülmeye başlandığı gözlenmiştir. Anterior kısımda çok belirgin pozitif p97/VCP lokalizasyonu veren hücrelerin distal ekvatoryal bölgelerinde hiç sinyal olmaması da dikkat çekici bir bulgudur. Bu paterni temsil eden sperm hücrelerinde baş bölgesindeki distal ekvatoryal bölgedeki boyanma paterninin akrozomal bölgeye doğru kaydığı özellikle de anterior ring dediğimiz sperm başının ön uç kısmında halkasal bir şekilde olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak ilk defa NCM grubunda karşılaştığımız 4. boyanma paternine ait sperm hücrelerinde;

- 4-1) Bazı hücrelerde distal ekvatoryal bölgedeki p97/VCP ekspresyonu azalmaya başlamıştır.
- 4-2) Bazı hücrelerde distal ekvatoryal bölgedeki p97/VCP ekspresyonu kaybolmaya başlamıştır.
- 4-3) Bazı hücrelerde distal ekvatoryal bölgedeki azalan p97/VCP ekspresyonuna paralel olarak anterior bölgede p97/VCP görülmeye başlanmıştır.

4-4) Bazı hücrelerde ise distal ekvatoryal bölgedeki p97/VCP lokalizasyonu tamamen kaybolup anterior ring adlı bölgede belirgin bir p97/VCP ekspresyonu görülmüştür.

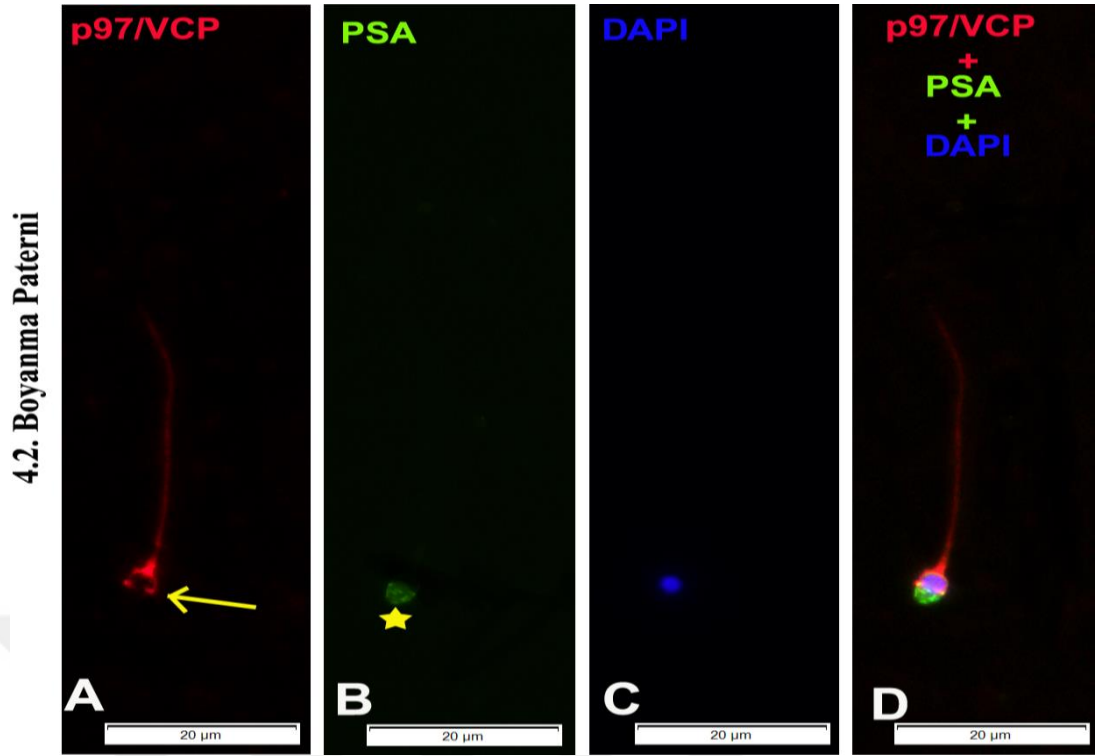
Çalışmalar üç farklı donöre ait sperm numunelerinden hazırlanan örnekler ile çalışılmış ve immünofloresan yapılan preparatların herbirinde 200 hücre sayılmıştır. Yapılan sayımlar sonucunda bu grupta görülmeye başlandığı gözlenen 4. boyanma paterninin hücrelerin %2-3'ünde görüldüğü saptanmıştır.

Sonuç olarak NCM ile 18 saat inkübe edilen grupta 0.saate göre p97/VCP boyanma paterninde spermin baş kısmında distal ekvatoryal bölgede yoğun olan ekspresyonun %2-3 oranında azalıp anterior bölgede pozitif boyanma vermesi şeklinde bir değişiklik olmuştur.

Tablo 4.3. Fertil bireylere ait sperm yayma preparatlarında NCM ile inkübasyon sonucu p97/VCP boyanma paternlerinin tüm sperm içinindeki görülme yüzdesi: 3 farklı fertil bireye ait sperm yayma preparatları incelenmiş, her preparattan 200 hücre sayılmıştır.4. boyanma paternine ait hücreler %2-3 oranında bulunmuştur.

	<u>1.Boyanma Paterni</u>	<u>2.Boyanma Paterni</u>	<u>3.Boyanma Paterni</u>	<u>4.Boyanma Paterni</u>
(n=3, 600 sperm)	Kuyruk (+) Bağlantı parçası Distal Ekvatoryal Bölge (Tek çizgi)	Kuyruk Bağlantı parçası Distal Ekvatoryal Bölge (Çift çizgi)	Kuyruk Bağlantı parçası	Kuyruk Bağlantı parçası Distal Ekvatoryal Bölge Akrozomal Bölge
p97/VCP immunoreaktivitesi (%)	52.17±0.60	13±0.29	32.17±0.73	2,67±0.17

Ayrıca bu grupta yapılan immünofloresan deneylerinde p97/VCP primer antikorunun yanısıra DNA'yı boyamak için DAPI ve akrozomu boyamak için PSA boyası kullanılmıştır. Bu grupta akrozomal bölgeyi görüntüleyebilmek için uygulanan PSA boyanma yoğunluğunun 0. saate göre minimal bir azalma gösterdiği saptanmıştır.



Şekil 4.4. Fertil bireylere ait sperm hücrelerinin NCM ile inkübasyon sonucu sperm hücrelerinde p97/VCP proteininin lokalizasyonunun gösterilmesi: A: NCM ile inkübe edilen gruplarda 0. saatten farklı olarak görülen boyanma paterninde hücrelerin bazılarında distal ekvatoryal bölgede görülen p97/VCP sinyalinin azalmaya ve hatta bazı hücrelerde hücrenin orta hattından kenarlara doğru azalmaya başladığı görülmektedir (sarı ok). B: Bu gruba ait sperm hücrelerinin PSA boyanma yoğunluğunun da minimal azalma gösterdiği tüm hücrelerin yaklaşık %3'ünde akrozomal bölgede boyanma şiddetinin azaldığı görülmektedir (sarı yıldız). C: DAPI ile sperm hücrelerinin çekirdek bölgesinin görüntülenmesi D: p97/VCP+PSA+DAPI kombinasyonu. Bar: 20 µm

p97/VCP'nin Kapasitasyon Sürecinde 5. Saatte Sperm Hücresindeki Lokalizasyonu

Fertil bireylerden alınan sperm örneklerinde, UPS proteini olan p97/VCP proteininin kapasitasyon sürecinde 5. saatteki lokalizasyonunu belirleyebilmek için sperm hücreleri CM ile 5 saat inkübe edilmiş, inkübasyonu takiben yapılan sperm yayma preparatlarında p97/VCP immünoaktivitesi diğer gruplarda olduğu gibi baş ve kuyruk bölgesinde belirlenmiştir (n=3). Bu grupta da 0. saatte olduğu gibi üç farklı boyanma paterni görülmüştür.

Fakat bu grupta da NCM ile uyumlu olarak 0. saatten farklı 4. bir boyanma paterni daha görülmüştür. Bu paterni temsil sperm hücrelerinde kuyruktaki p97/VCP ekspresyonunun yanı sıra distal ekvatoryal bölgedeki boyanma paterninin akrozomal

bölgeye doğru kaydığı özellikle de anterior ring dediğimiz sperm başının ön uç kısmında halkasal bir şekilde olduğu görülmüştür. Fakat bu grupta NCM grubundan farklı olarak 4. boyanma paternine ait bazı hücrelerde kuyruk ta görülen p97/VCP ekspresyonunun azalmaya başladığı görülmüştür.

5 saatlik inkübasyon sonucu gördüğümüz 4. boyanma paternine ait sperm hücrelerinde;

4.1) Bazı hücrelerde distal ekvatoryal bölgedeki p97/VCP ekspresyonu azalmaya başlamıştır.

4.2) Bazı hücrelerde distal ekvatoryal bölgedeki p97/VCP ekspresyonu kaybolmaya başlamıştır.

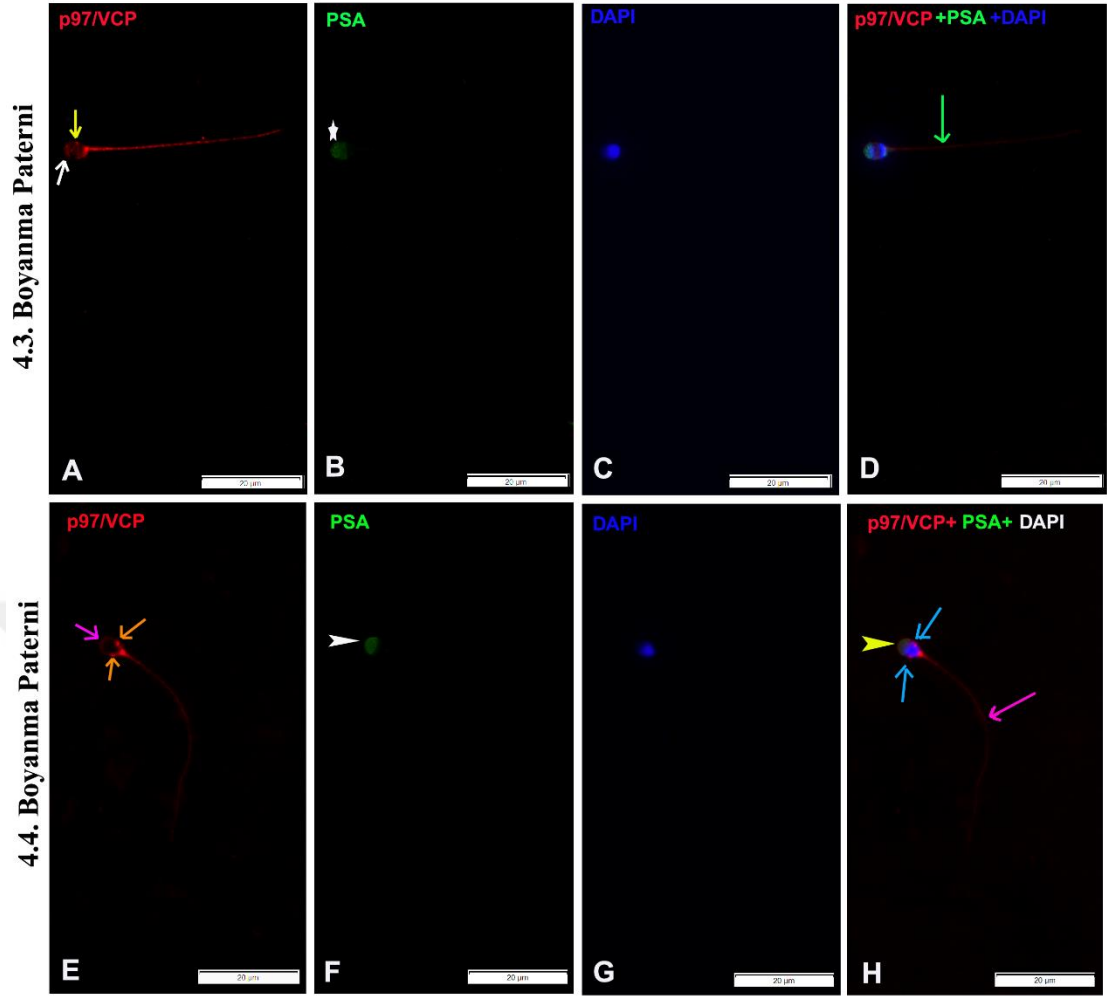
4.3) Bazı hücrelerde distal ekvatoryal bölgedeki azalan p97/VCP ekspresyonuna paralel olarak anterior bölgede p97/VCP görülmeye başlanmıştır.

4.4) Bazı hücrelerde distal ekvatoryal bölgedeki p97/VCP lokalizasyonu tamamen kaybolup anterior ring dediğimiz bölgede belirgin bir p97/VCP ekspresyonu görülmeye başlanmıştır.

4.5) Bazı hücrelerde ise kuyruk p97/VCP boyanma şiddetinin minimal bir azalma gösterdiği görülmüştür.

Bu grupta p97/VCP lokalizasyonunun değiştiği ve anterior kısımda pozitif boyanma veren hücrelerin anlamlı bir şekilde arttığı görülmüştür. Diğer tüm gruplarda olduğu gibi bu grupta da immüno floresan çalışmaları üç farklı donöre ait sperm yayma preparatlarında çalışılmış ve her preparatta 200 hücre sayılmıştır. Yapılan sayımlar sonucunda sperm kuyruğunda, bağlantı parçasında ve de distal ekvatoryal bölgede tek çizgi halinde görülen p97/VCP boyama paterninin hücrelerin % 47'sinde, sperm kuyruğunda, bağlantı parçasında ve de distal ekvatoryal bölgede çift çizgi halinde görülen p97/VCP boyama paterninin hücrelerin % 13'ünde görüldüğü saptanmıştır.

Sperm kuyruğunda ve de bağlantı parçasında görülen p97/VCP boyama paterninin ise hücrelerin % 29'unda görüldüğü hücrelerin % 11'inde ise sperm kuyruğunda ve başın anterior kısmında olmak üzere farklı bir boyanma paterni görülmüştür. Bu sonuçlar göstermiştir ki p97/VCP'nin lokalizasyonu kapasitasyon sürecinde değişmektedir. 0. saatte baskın olarak distal ekvatoryal bölgede görülen p97/VCP lokalizasyonu anlamlı bir şekilde başın anterior bölgesine doğru kaymıştır.



Şekil 4.5. Fertil bireylere ait sperm hücrelerinde CM ile 5 saat inkübasyon sonucu p97/VCP proteininin lokalizasyonunun gösterilmesi: A: 5 saatlik inkübasyon 0. saatle karşılaştırıldığında yaklaşık %11'inde p97/VCP'nin lokalizasyonunun değiştiği gözlenmiştir. İnkübasyon öncesinde baş bölgesinde sadece distal ekvatoryal bölgede tek veya çift çizgi halinde lokalizasyon veren p97/VCP bu hücrelerde başın anterior bölgesinde de lokalizasyon göstermiştir (Beyaz ok). Bu hücrelerde ayrıca distal ekvatoryal bölgede tek çizgi ya da çift çizgi halinde lokalize p97/VCP'nin yine bu bölgede lokalizasyon gösterdiği fakat p97/VCP ekspresyonunun azaldığı dikkat çekmektedir (Sarı ok). B: Bu hücrelerde PSA ile işaretlenen sperm hücrelerinin akrozomal bölgesinde boyanma şiddetinin 0. saate göre oldukça azalması elde ettiğimiz ikinci önemli bulgudur (Yıldız). C: Kapasitasyonu indüklenen sperm hücrelerinin DNA bölgesinde herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. D: Bu hücrelerde elde ettiğimiz diğer bulgu ise kuyrukta 0. saate göre azalan şiddette p97/VCP ekspresyonu görülmektedir (yeşil ok). E: p97/VCP lokalizasyonunun kapasitasyon süreci ile birlikte değiştiği hücrelerin bazılarında ise distal ekvatoryal bölgede tek ya da çift çizgi halinde lokalizasyon gösteren sperm hücrelerinde bu lokalizasyonun hücrelerin orta kısımdan kenarlara doğru p97/VCP lokalizasyonunun kaybolmaya başladığı görülmektedir (turuncu ok). Ayrıca bu hücrelerde anterior bölgedeki p97/VCP ekspresyonunun ise distal ekvatoryal bölgesinde sinyal olan hücelere göre arttığı görülmektedir (mor ok). F: Bu hücrelerde de PSA boyanmasının şiddetinin azaldığı görülmektedir (beyaz ok). G: DAPI boyanması ile sperm hücresinin görüntülenmesi H: p97/VCP+PSA+ DAPI kombinasyonu sonucunda da p97/VCP lokalizasyonu değişen hücrelerin kuyruk bölgesinde p97/VCP ekspresyonunun azaldığı görülmektedir (mor ok). Bu hücrelerin distal ekvatoryal bölgelerindeki P97/VCP sinyalinin de özellikle hücrelerin orta kısmından başlayarak azalmaya başladığı görülmektedir (mavi ok). Bar: 20 µm

PSA boyaması sonucu elde ettiğimiz görüntülerin değerlendirilmesi sonucunda bu gruba ait elde ettiğimiz ikinci önemli bulgu ise sperm hücrelerinin akrozomal boyanma yoğunluğunun 0. saat ve NCM ile inkübasyon grubuna göre azaldığı ve akrozomal bütünlüğün bazı hücrelerde bozulmaya başlaması yönündedir.

Tablo 4.4. 5 saatlik inkübasyon grubuna ait p97/VCP boyanma paternlerinin tüm spermler içindeki görülme yüzdesi: 3 farklı fertil bireye ait sperm yayma preparatları incelenmiş, her preparattan 200 hücre sayılmıştır.

(n=3, 600 sperm)	<u>1.Boyanma Paterni</u> Kuyruk Bağlantı parçası Distal Ekvatoryal Bölge (Tek çizgi)	<u>2.Boyanma Paterni</u> Kuyruk Bağlantı parçası Distal Ekvatoryal Bölge (Çift çizgi)	<u>3.Boyanma Paterni</u> Kuyruk Bağlantı parçası	<u>4.Boyanma Paterni</u> Kuyruk Bağlantı parçası Distal Ekvatoryal Bölge (- ve/ya da +) Akrozomal Bölge
p97/VCP immunoreaktivitesi (%)	46.83±0.60	12.83±0.44	28.17±1.17	11.17±0.44

p97/VCP’ nin Kapasitasyon Sürecinde 18. Saatte Sperm Hücresindeki Lokalizasyonu

Fertil bireylerden alınan sperm örneklerinde, UPS proteini olan p97/VCP proteininin kapasitasyon sürecinde 18. saatteki lokalizasyonunu belirleyebilmek için sperm hücreleri CM ile 18 saat inkübe edilmiş, inkübasyonu takiben yapılan sperm yayma preparatlarında p97/VCP immünoreaktivitesi diğer gruplarda olduğu gibi baş ve kuyruk bölgesinde belirlenmiştir (n=3).

18 saat boyunca CM ile inkübe ettiğimiz edilen bu gruptaki sperm hücrelerinde de p97/VCP immünoreaktivitesi NCM ve 5.saat gruplarında olduğu dört farklı boyanma paterni göstermiştir (n=3). Ancak bu grupta p97/VCP lokalizasyonunun değiştiği ve anterior kısımda pozitif boyanma veren hücrelerin sayısının diğer tüm gruplara hatta 5. saate göre oldukça anlamlı bir şekilde arttığı görülmüştür.

18 saatlik inkübasyon sonucu gördüğümüz 4. boyanma paternine ait sperm hücrelerinde;

4.1) Bazı hücrelerde distal ekvatoryal bölgedeki p97/VCP ekspresyonu azalmaya başlamıştır.

4.2) Bazı hücrelerde distal ekvatoryal bölgedeki p97/VCP ekspresyonu kaybolmaya başlamıştır.

4.3) Bazı hücrelerde distal ekvatoryal bölgedeki azalan p97/VCP ekspresyonuna paralel olarak anterior bölgede p97/VCP görülmeye başlanmıştır.

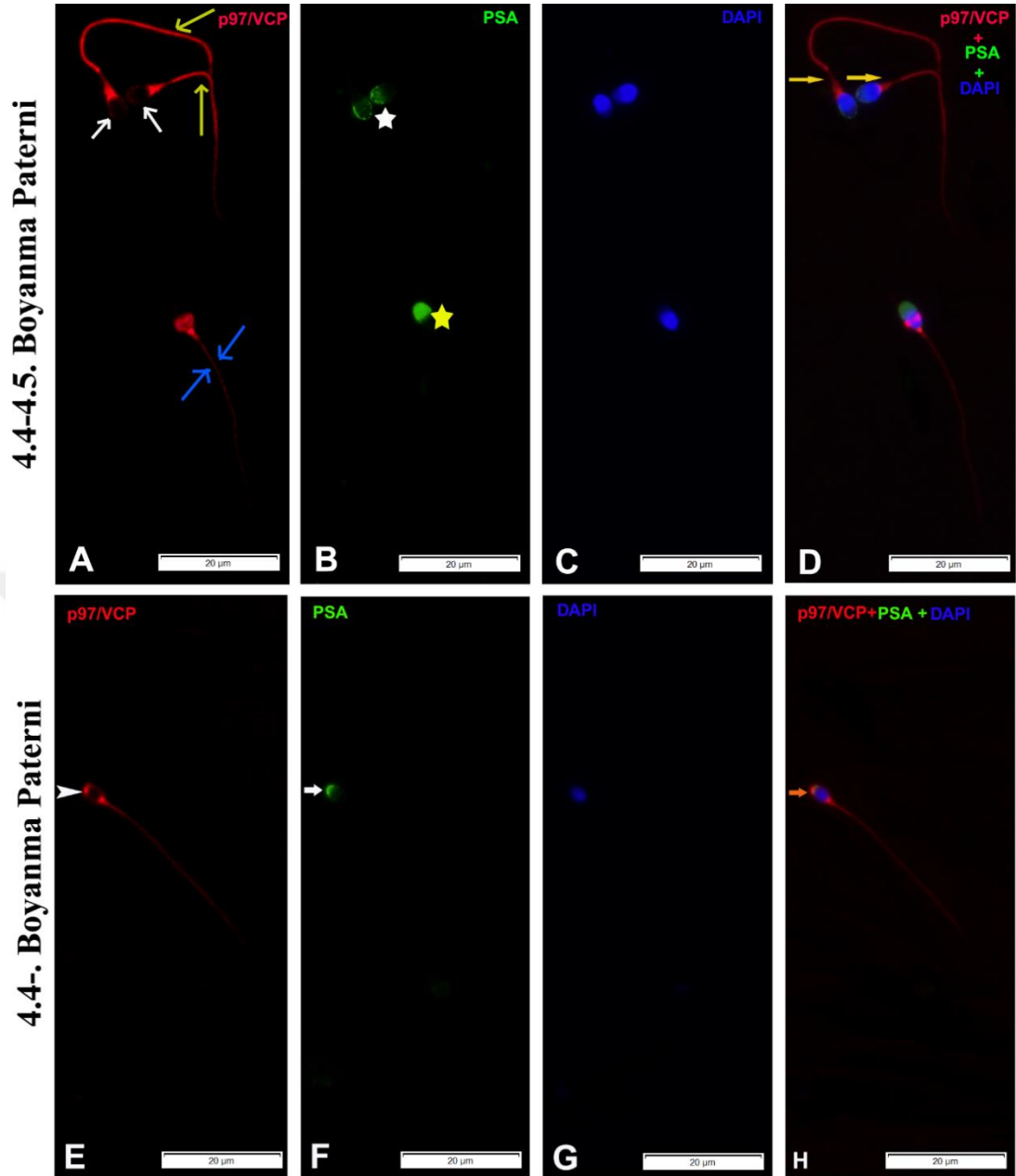
4.4) Bazı hücrelerde distal ekvatoryal bölgedeki p97/VCP lokalizasyonu tamamen kaybolup anterior ring dediğimiz bölgede belirgin bir p97/VCP ekspresyonu görülmeye başlanmıştır.

4.5) Bazı hücrelerde ise kuyruk p97/VCP boyanma şiddetinin belirgin bir artış gösterdiği görülmüştür.

Diğer tüm gruplarda olduğu gibi bu grupta da immünofloresan çalışmaları üç farklı donöre ait sperm yayma preparatlarında çalışılmış ve her preparatta 200 hücre sayılmıştır. Yapılan sayımlar sonucunda sperm kuyruğunda, bağlantı parçasında ve distal ekvatoryal bölgede görülen p97/VCP boyama paterninin hücrelerin % 42'sinde görüldüğü, hücrelerin % 11'inde ise sperm kuyruğunda ve bağlantı parçasında p97/VCP lokalizasyonun olduğu ikinci boyanma paterni görülmüştür. Sperm kuyruğunda, bağlantı parçasında ve distal ekvatoryal bölgede görülen p97/VCP boyama paterni ise hücrelerin % 25'inde görülmüştür. İlk olarak NCM ile inkübe ettiğimiz grupta görülmeye başlayan ve de 5 saat CM ile inkübasyon sonucu oluşturduğumuz grupta anlamlı bir şekilde artışı gözlenen p97/VCP'ye ait dördüncü boyanma paterninin bu grupta diğer iki gruba göre çok daha anlamlı bir şekilde arttığı gözlenmiştir.

Bu sonuçlar p97/VCP'nin lokalizasyonu kapasitasyon sürecinde değiştiğini kesin bir şekilde doğrulamaktadır. Sperm hücreleri arasında baskın olarak distal ekvatoryal bölgede tek ya da çift çizgi halinde görülen p97/VCP lokalizasyonunun anlamlı bir şekilde başın anterior bölgesine doğru kaydığı görülmüştür.

Ayrıca bu grupta p97/VCP lokalizasyonun anterior bölgeye doğru kaydığı hücrelerde akrozomal bölgede ki bütünlüğün bozulduğu ve PSA boyanma yoğunluğunun diğer tüm gruplara hatta 5. saat grubuna göre de oldukça azaldığı görülmüştür.

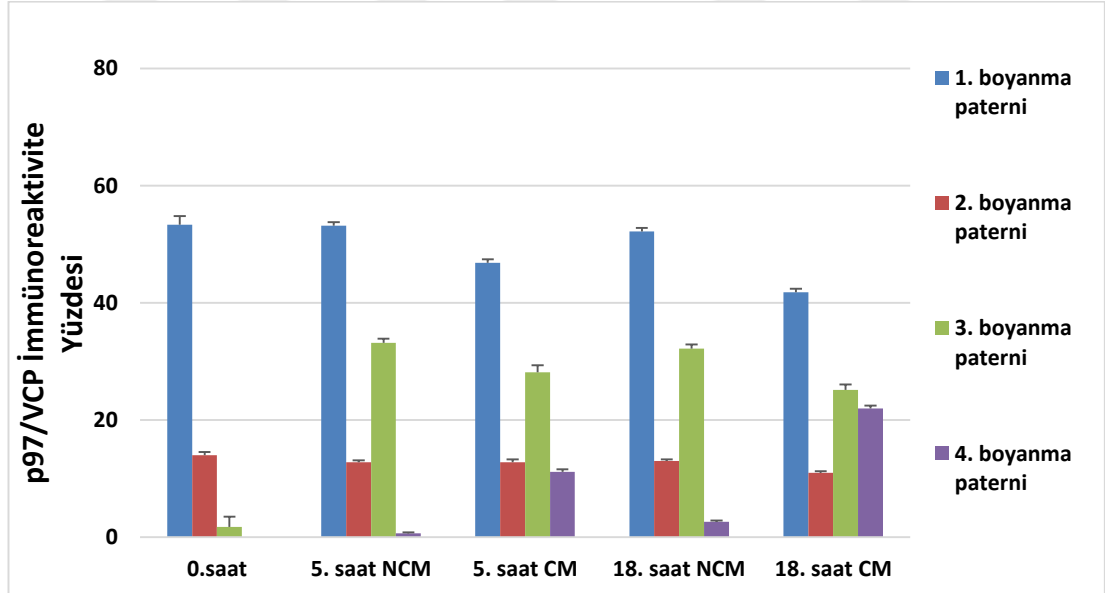


Şekil 4.6. Fertil bireylere ait sperm hücrelerinde CM ile 18 saat inkübasyon sonucu p97/VCP proteininin lokalizasyonunun gösterilmesi: A: 18 s. inkübasyondan sonra bazı hücrelerde distal ekvatoryal bölgede p97/VCP sinyali görülmezken, anterior bölgede lokalize olduğu görülmüştür (beyaz ok). Kuyrukta görülen p97/VCP boyanma şiddetinin de birinci boyanma paterni gösteren hücrelerin kuyruk kısmında ki boyanma şiddetine göre (mavi ok) arttığı görülmektedir (sarı ok). B: Bu grupta dördüncü boyanma paterni gösteren hücrelerin akrozomal bölgesindeki bütünlüğün bozulmaya başladığı, PSA boyanma şiddetinde oldukça azaldığı görülmektedir (beyaz yıldız). Bu hücreler arasında birinci boyanma paterni gösteren hücrelerin akrozomal bölgesinin bütünlüğünü korumuş ve güçlü bir PSA boyanma şiddeti verdiği görülmektedir (sarı ok). C: DAPI ile çekirdek görüntülenmesi D: Kapasitasyon sürecinde anterior bölgelerinde pozitif p97/VCP olan hücrelerin kuyruk bölgelerinde boyanma şiddetinin artması ve bu hücrelerin mitokondriyal bölgelerinde azalan p97/VCP boyanması dikkati çekmektedir (sarı ok). E: Kapasite olmuş bu sperm hücresinde anterior kısımda güçlü p97/VCP boyanması görülmektedir (beyaz ok). F: Bu hücrenin akrozomal bölgesinde zayıf PSA boyanması dikkat çekicidir (beyaz ok). H:Anterior ring bölümünde PSA ve p97/VCP birlikte sarı renkte ışıma vermiştir (turuncu ok). Bar: 20 µm

Tablo 4.5. CM ile 18 saat inkübasyon sonucunda görülen dört farklı p97/VCP boyanma paterninin tüm spermiler içindeki görülme yüzdesi: 3 farklı fertil bireye ait sperm yayma preparatları incelenmiş, her preparattan 200 hücre sayılmıştır.

p97/VCP (n=3)	<u>1.Boyanma Paterni</u> Kuyruk Bağlantı parçası Distal Ekvatoryal Bölge (Tek çizgi)	<u>2.Boyanma Paterni</u> Kuyruk Bağlantı parçası Distal Ekvatoryal Bölge (Çift çizgi)	<u>3.Boyanma Paterni</u> Kuyruk Bağlantı parçası	<u>4.Boyanma Paterni</u> Kuyruk Bağlantı parçası Distal Ekvatoryal Bölge (- ve, ya da +) Akrozomal Bölge
p97/VCP immunoreaktivitesi (%)	41.8±0.6	11±0.29	25.17±0.93	22±0.5

Sperm hücrelerinin CM ile 18 saatlik inkübasyonu sonucu elde ettiğimiz bir diğer önemli bulgu ise kapasitasyon sürecine girdiğini düşündüğümüz dördüncü boyanma paternine ait hücrelerin kuyruk p97/VCP ekspresyonunun, diğer boyanma paternlerinde yer alan sperm hücrelerinin kuyruk p97/VCP ekspresyonuna göre anlamlı bir şekilde arttığı şeklindedir.



Şekil 4.7. p97/VCP proteininin 0. saat, NCM ile inkübasyon sürecinde 5. ve 18. saatlerde, CM ile inkübasyon sürecinde 5. ve 18. saatlerde göstermiş olduğu 1., 2. ve 3. boyanma paternlerine ait görülme yüzdesi: 3 farklı fertil bireye ait sperm hücreleri kullanılmış ve her bireyden 200 hücre sayılmıştır (n=3).

4.1.1.2. p97/VCP' nin Kapasitasyon Sürecinden Önce ve Kapasitasyon Sürecinde Sperm Hücresindeki Ekspresyonunun Flow Sitometrik Analizi

Fertil bireylere ait sperm hücrelerinde p97/VCP lokalizasyonunun kapasitasyon sürecinden önce 0. saatte, kapasitasyon sürecinde 5. ve 18. saatlerde ve de NCM ile inkübe edilen gruplarda belirlenmesinden sonra bu proteininin sperm hücrelerindeki ekspresyonunu belirlemek amacı ile deneylere flow sitometrik analizler ile devam edilmiştir. Bu aşamada deneylere ayrıca inhibitörler kullanılarak oluşturulan gruplarda eklenmiştir.

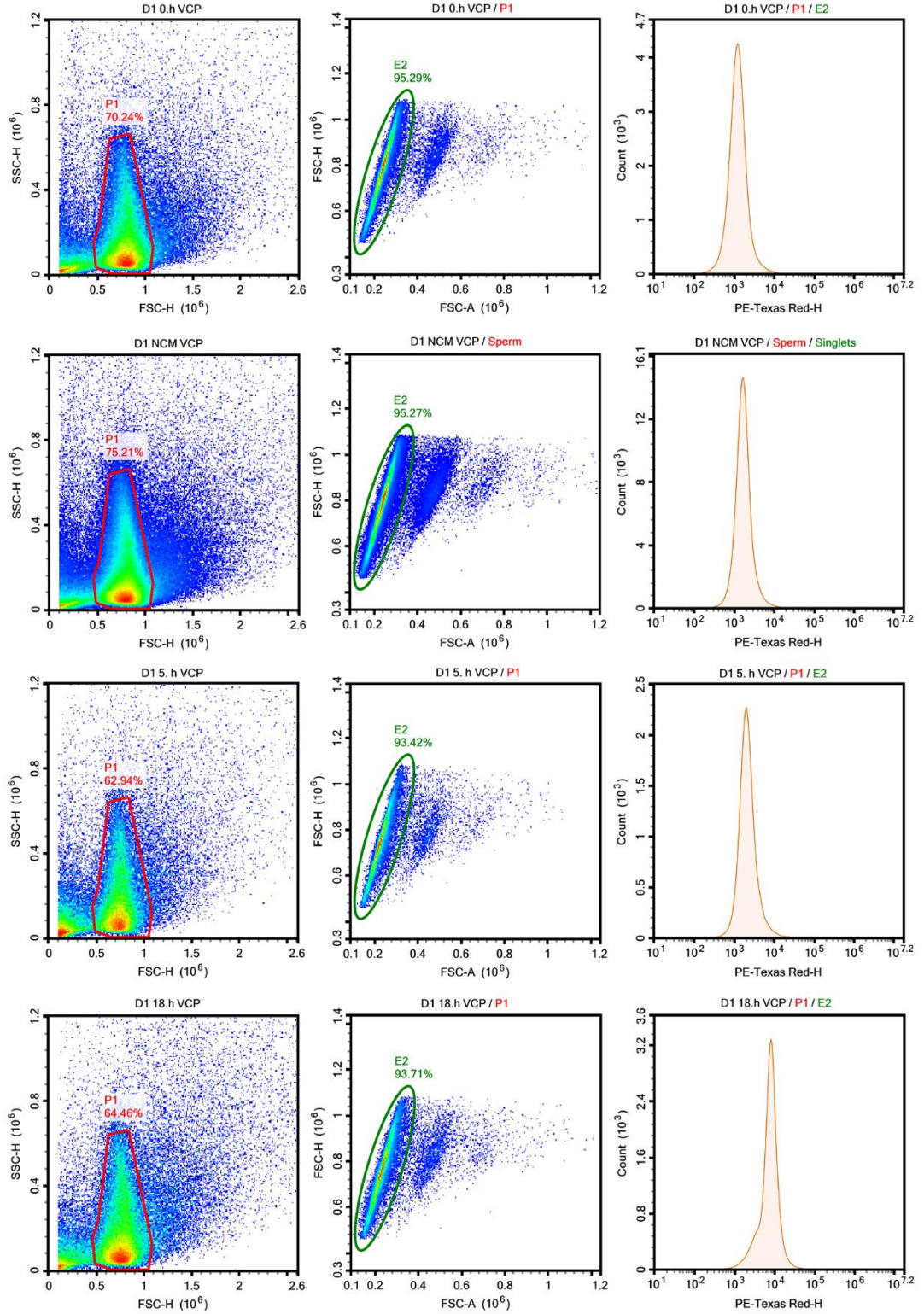
Analizler esnasında sperm hücresinin boyutu göz önüne alınarak öncelikle hücre popülasyonumuz seçilmiş, daha sonra ise bu popülasyon içerisinde başka hücrelerle birleşip hatalı ışıma verecek hücreleri elemek amacıyla akım sitometri cihazı içerisindeki akış kabininden tek tek ışıma vererek geçen hücreler seçilmiş ve de bu hücrelerin yoğunluğu ölçülmüştür.

0.saat, 5. saat, 18. saatlerde ve NCM ile İnkübe Edilen Sperm Hücrelerinde p97/VCP Ekspresyonunun Flow Sitometrik Analizi

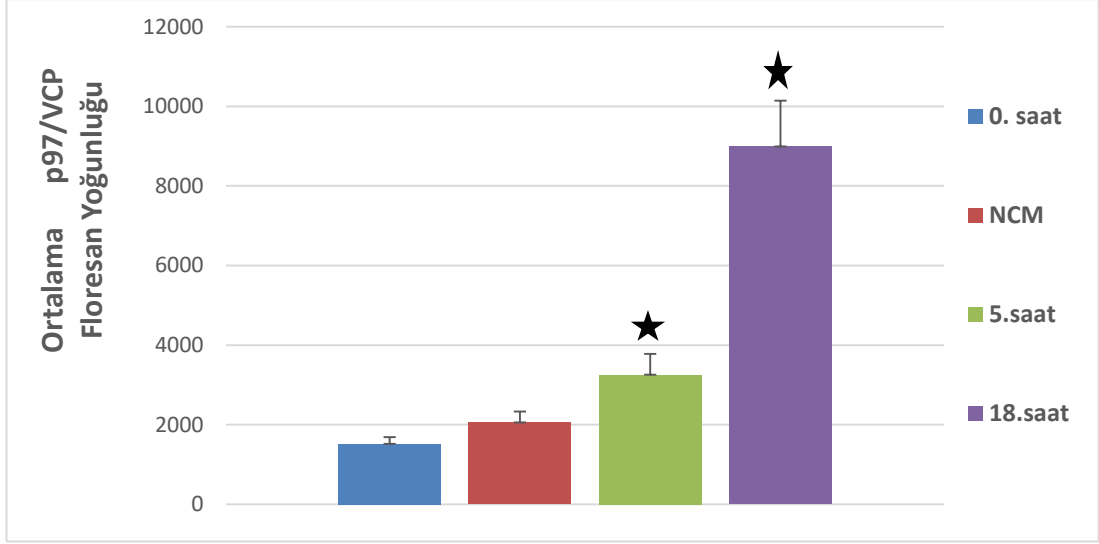
Kapasitasyon sürecinde lokalizasyonunun ve boyanma şiddetinin değiştiğini belirlediğimiz p97/VCP proteininin yine kapasitasyon sürecinde ekspresyonlarındaki değişikliği saptayabilmek için yapılan akım sitometrik analizler sonucunda immünfloresan sonuçlarla uyumlu olarak 0. saatten 18. saate doğru p97/VCP ekspresyonunda bir artış gözlenmiştir.

Akım sitometrisi deneylerinde her grup için üç fertil bireye ait fikse edilmiş sperm hücreleri ile çalışılmıştır ve bu üç bireyin flow sitometri sonuçları Şekil 4.8'de görülmektedir.

0.saat, 5. saat, 18. saatlerde ve NCM ile inkübe edilen sperm hücrelerinde p97/VCP ekspresyonunun akım sitometrik analizi sonucu elde edilen veriler ile yapılan istatistiksel çalışmalar sonucunda 0.saat; NCM grubu, 5.saat ve 18. saat ile karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak p97/VCP ekspresyonunda 5. ve 18. saatlerde görülen artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (0.s vs. 5.s. $p<0,005$; 0.s. vs. 18.s $p<0,001$). NCM grubunda ki minimal artış ise anlamlı sonuç vermemiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.8. Fertil bireylerde kapasitasyon sürecinden önce ve kapasitasyon süreci boyunca p97/VCP ekpresyonunun gösterilmesi: D1 kodlu fertil bireyden alınan sperm örnekleri ile yapılan flow sitometrik analizler sonucunda belirlediğimiz sperm popülasyonuna ait grafik (solda), bu popülasyonlar içerisinde tek sıra halinde akış kabini içerisinde bulunan hücrelere ait sperm popülasyonuna ait grafik (ortada) ve bu hücrelere ait p97/VCP ekspresyonuna ait grafik (sağda) görülmektedir .



Şekil 4.9. p97/VCP ekspresyonunun 0. saat, 5. saat, 18. Saat ve NCM gruplarında akım sitometrik yöntemle karşılaştırmalı olarak değeri: Bu proteinin ekspresyonunda 0. saatten 18. saate doğru p97/VCP'nin ekspresyonunda artış görülmüştür. 18. saatte ise diğer gruplara göre anlamlı bir artış saptanmıştır. Yapılan 3 farklı deneyin ortalama±SEM değerleri olarak verilmiş ve istatistiksel olarak anlamlı olanlar yıldız ile işaretlenmiştir (0.s vs.5.s. $p<0,005$; 0.s. vs. 18.s $p<0,001$).

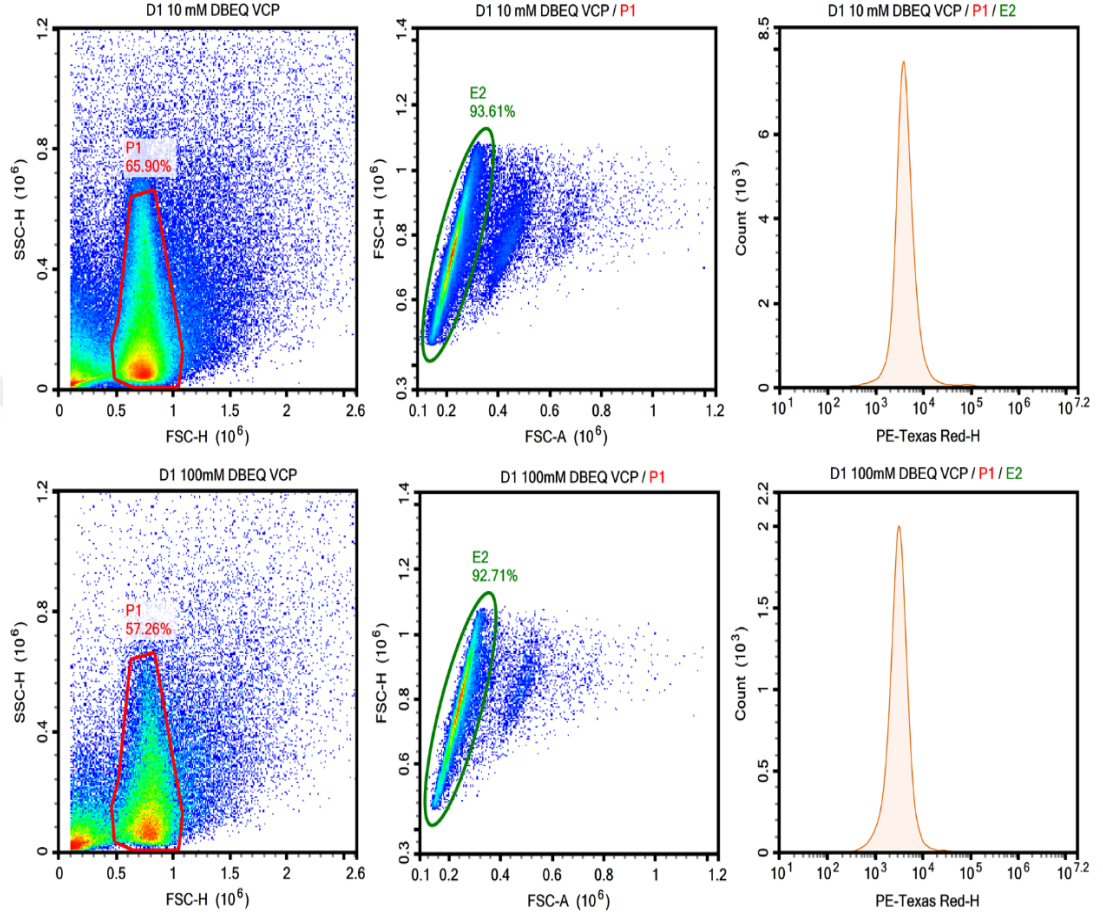
Kapasitasyon Medyumu ve p97/ VCP İnhibitörü 18 Saat İnkübe Edilen Sperm Hücrelerinde p97/VCP Ekspresyonları

Kapasitasyon sürecinde lokalizasyonunun ve ekspresyonunun değiştiğini belirlediğimiz p97/VCP proteininin geri dönüştürülebilir bir inhibitörü olan DBEQ'nun kapasitasyon medyumuna eklenmesi ile yapılan inkübasyon sonucunda p97/VCP proteininin ekspresyonunda nasıl bir değişiklik olduğu analiz edilmiştir. Bu amaçla inhibitörün etkisini tam olarak farklı konsantrasyonlarda DBEQ ile hazırlanan kapasitasyon medyumları ile sperm hücreleri inkübe edilmiş ve de denemeler sonucunda DBEQ'nun düşük etkili (10 mM) ve güçlü etkili (100 mM) olduğu iki konsantrasyon oranı belirlenmiştir.

Akım sitometrisi deneylerinde her grup için üç fertil bireye ait fıkse edilmiş sperm hücreleri ile çalışılmıştır ve bu üç bireyin flow sitometri sonuçları Şekil 4.10'da görülmektedir.

10 mM ve 100 mM DBEQ ile inkübe edilen sperm hücrelerinde p97/VCP ekspresyonunun akım sitometrik analizi sonucu elde edilen verileri ile yapılan istatistiksel çalışmalar sonucunda her iki grup 18. saat ile karşılaştırılmıştır. Sonuç

olarak p97/VCP ekspresyonunda DBEQ gruplarında görülen artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 4.13) (18s. vs. 10mM DBEQ $p<0,001$; 18s. vs. 100mM DBEQ $p<0,001$).



Şekil 4.10. Fertil bireylerde kapasitasyon sürecinde p97/VCP inhibitörü DBEQ ekspresyonunun gösterilmesi: D1 kodlu fertil bireyden alınan sperm örnekleri ile yapılan flow sitometrik analizler sonucunda belirlediğimiz sperm popülasyonuna ait grafik (solda), bu popülasyonlar içerisinde tek sıra halinde akış kabini içerisinde bulunan hücrelere ait sperm popülasyonuna ait grafik (ortada) ve bu hücrelere ait p97/VCP ekspresyonuna ait grafik (sağda) görülmektedir.

Fakat 10 mM DBEQ konsantrasyonu kullanılarak inkübe edilen gruplara göre 100 mM DBEQ konsantrasyonu kullanılarak inkübe edilen gruplarda p97/VCP ekspresyonunda çok daha anlamlı bir düşüş gözlenmiş ve kapasitasyon sürecinde p97/VCP'nin inhibe edilmesinde 100 mM DBEQ konsantrasyonunun daha etkili ve verimli olduğu bulgusu elde edilmiştir. (Şekil 4.13).

Kapasitasyon Medyumuna ve 26 S İnhibitörleri ile 18 Saat İnkübe Edilen Sperm Hücrelerinde p97/VCP Ekspresyonları

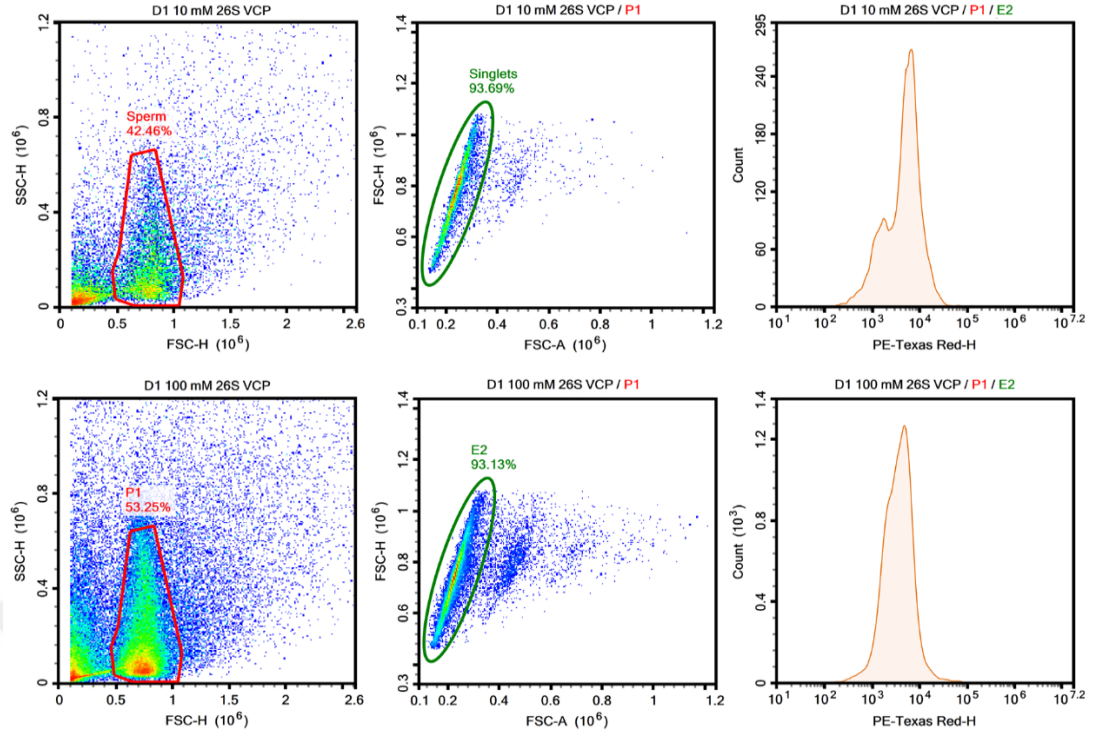
Kapasitasyon sürecinde lokalizasyonunun ve ekspresyonunun değiştiğini belirlediğimiz p97/VCP proteininin ubikülin proteazom sistemi inhibitörlerinin kapasitasyon medyumuna eklenmesi ile yapılan inkübasyon sonucunda p97/VCP proteininin ekspresyonunda nasıl bir değişiklik olduğu analiz edilmiştir. Bu amaçla üç farklı ubikülin proteazom sistemi inhibitörü kullanılmış ve inhibitörlerin etkisini tam olarak saptayabilmek için farklı konsantrasyonlarda UPS inhibitörleri ile hazırlanan kapasitasyon medyumları ile sperm hücreleri inkübe edilmiştir.

UPS inhibitörleri olarak kullandığımız MG-132, Epoksimisin ve CLBL inhibitörlerinden eşit miktarda kullanarak hazırladığımız karışımın kapasitasyon sürecine olan etkisini saptayabilmek için bu karışımlardan farklı konsantrasyonlarda kullanılarak eklenen kapasitasyon medyumuna ile deneyler yapılmış ve denemeler sonucunda UPS inhibitörlerinin düşük etkili (10 mM) ve güçlü etkili (100 mM) olduğu iki konsantrasyon oranı belirlenmiştir.

Akım sitometrisi deneylerinde her grup için üç fertil bireye ait fikse edilmiş sperm hücreleri ile çalışılmıştır ve bu üç bireyin flow sitometri sonuçları Şekil 4.11’de görülmektedir.

10 mM ve 100 mM 26S inhibitörleri karışımı ile inkübe edilen sperm hücrelerinde p97/VCP ekspresyonunun akım sitometrik analizi sonucu elde edilen verileri ile yapılan istatistiksel çalışmalar sonucunda her iki grup 18. saat ile karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak p97/VCP ekspresyonunda 26S inhibitör gruplarında görülen artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 4.13) (18s. vs. 10 mM 26S $p<0,001$; 18s. vs. 100mM 26S Proteazom inhibitörü $p<0,001$).

Fakat 10 mM 26S konsantrasyonu kullanılarak inkübe edilen gruplara göre 100 mM 26S konsantrasyonu kullanılarak inkübe edilen gruplarda p97/VCP ekspresyonunda çok daha anlamlı bir düşüş gözlenmiş ve kapasitasyon sürecinde UPS’nin inhibe edilmesinde 100 mM 26S konsantrasyonunun daha etkili ve verimli olduğu bulgusu elde edilmiştir. (Şekil 4.13).



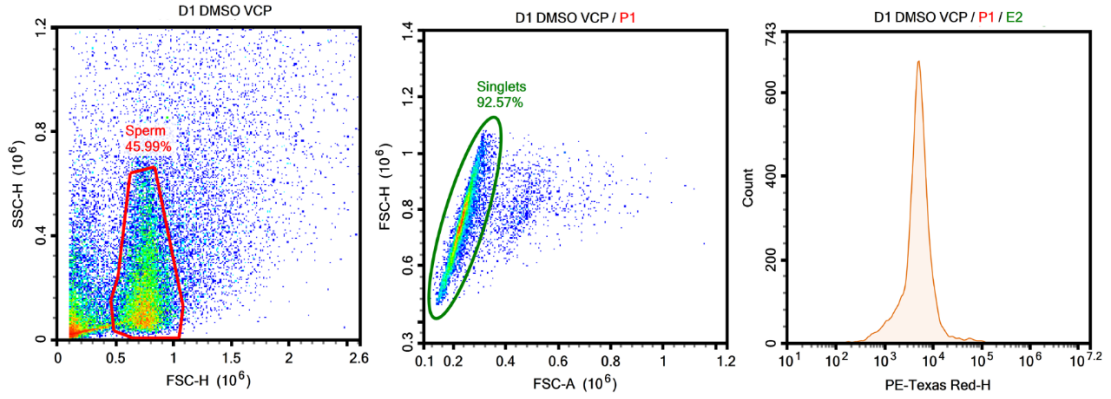
Şekil 4.11. Fertil bireylerde kapasitasyon sürecinde UPS inhibitörlerinin p97/VCP ekspresyonuna olan etkisinin gösterilmesi: D1 kodlu fertil bireyden alınan sperm örnekleri ile yapılan flow sitometrik analizler sonucunda belirlediğimiz sperm popülasyonuna ait grafik (solda), bu popülasyonlar içerisinde tek sıra halinde akış kabini içerisinde bulunan hücrelere ait sperm popülasyonuna ait grafik (ortada) ve bu hücrelere ait p97/VCP ekspresyonuna ait grafik (sağda) görülmektedir.

Kapasitasyon Medyumu ve DMSO ile 18 Saat İnkübe Edilen Sperm Hücrelerinde p97/VCP Ekspresyonları

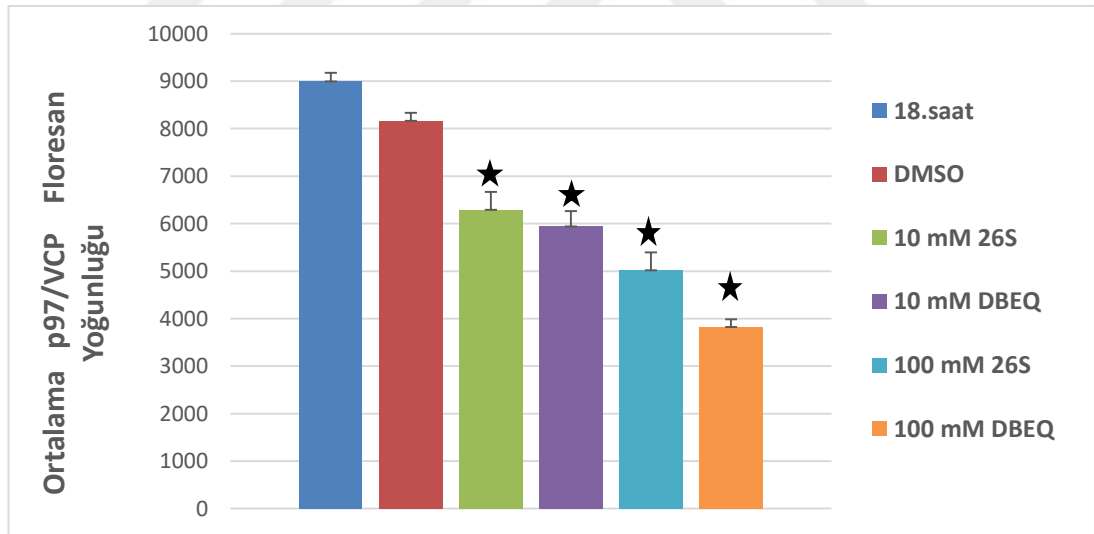
Bu iki gruba ek olarak hem UPS inhibitörlerini çözdürmek için kullandığımız hemde p97/VCP inhibitörünü çözdürmek için kullandığımız DMSO kimyasalının kapasitasyon sürecine olan etkisini araştırabilmek için kapasitasyon medyumuna sadece DMSO eklenerek inkübe edilen sperm hücrelerinde de p97/VCP proteininin ekspresyonundaki değişiklikler flow sitometrik yöntemle incelenmiştir.

Akım sitometrisi deneylerinde bu grup için üç fertil bireye ait fiks edilmiş sperm hücreleri ile çalışılmıştır ve bu üç bireyin flow sitometri sonuçları Şekil 4.12’de görülmektedir. Sonuç olarak DMSO eklenerek hazırlanan kapasitasyon medyumuna inkübe edilen gruplarda 18 saat sadece kapasitasyon medyumuna inkübe edilen gruba göre p97/VCP ekspresyonunda minimal da olsa bir düşüş gözlenmiştir. Fakat

istatistiksel olarak anlamlı olmayan bu azalma sonucunda DMSO'nun kapasitasyon sürecinde toksik etkisinin çok az olduğu bulgusu elde edilmiştir (Şekil 4.13).



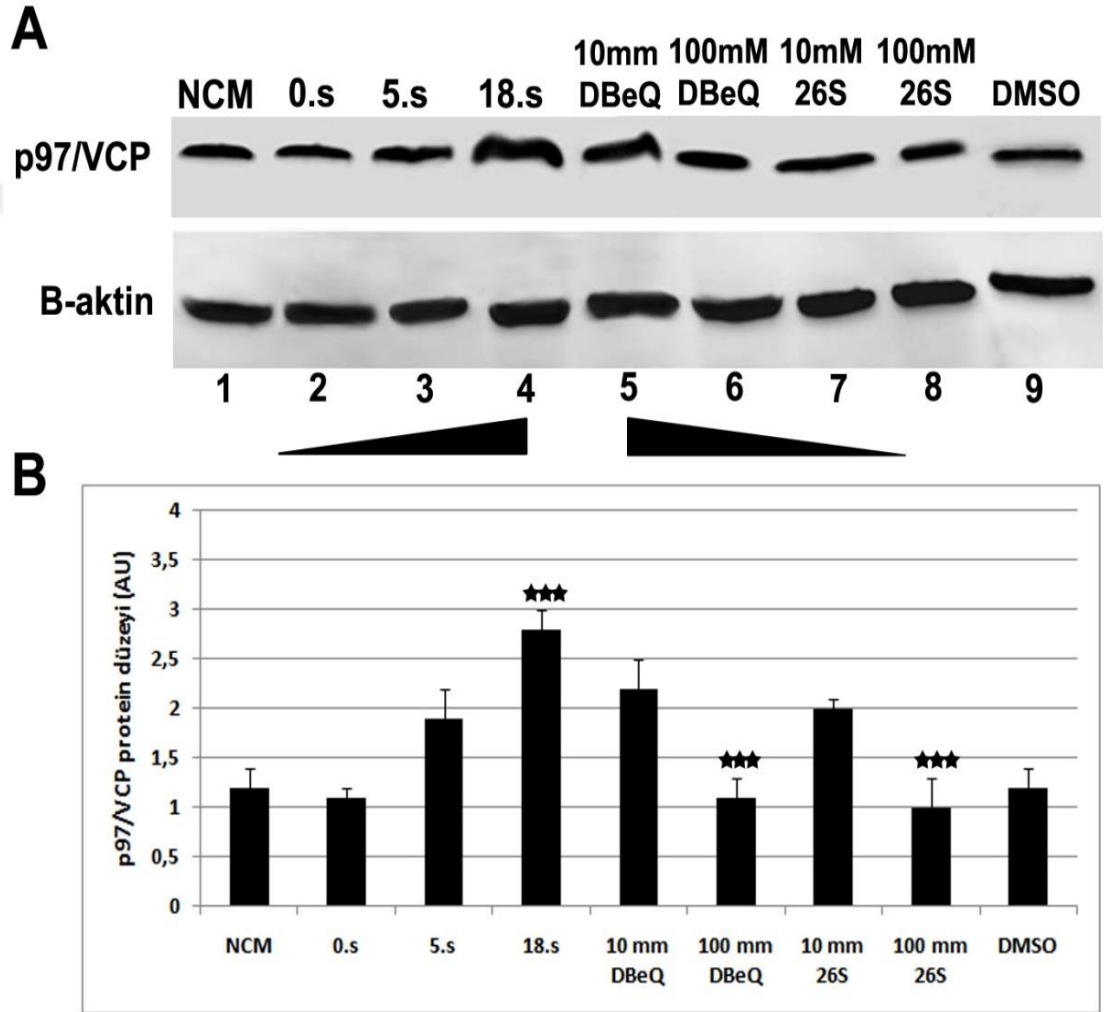
Şekil 4.12. Fertil bireylerde kapasitasyon sürecinde DMSO'nun p97/VCP ekspresyonuna olan etkisinin gösterilmesi: D1 kodlu fertil bireyden alınan sperm örnekleri ile yapılan flow sitometrik analizler sonucunda belirlediğimiz sperm popülasyonuna ait grafik (solda), bu popülasyonlar içerisinde tek sıra halinde akış kabini içerisinde bulunan hücrelere ait sperm popülasyonuna ait grafik (ortada) ve bu hücrelere ait p97/VCP ekspresyonuna ait grafik (sağda) görülmektedir .



Şekil 4.13. p97/VCP ekspresyonunun DBEQ, 26S İnhibitörleri ve DMSO eklenen gruplarda akım sitometrik yöntemle karşılaştırmalı olarak değeri: Bu proteinin ekspresyonunda 100 mM DBEQ ve 100 Mm 26S inhibitörü eklenen gruplarda saatte diğer gruplara göre anlamlı bir artış saptanmıştır. Sadece DMSO eklenen gruplarda ise 18. saat grubuna göre anlamlı olmayan minimal bir azalma görülmüştür. Yapılan 3 farklı deneyin ortalama±SEM değerleri olarak verilmiş ve istatistiksel olarak anlamlı olanlar yıldız ile işaretlenmiştir (18s. vs. 10 mM 26S $p<0,001$; 18s. vs. 10mM DBEQ $p<0,001$; 18s. vs. 100mM 26S Proteazom inhibitörü $p<0,001$; 18s. vs. 100mM DBEQ $p<0,001$).

4.1.1.3. p97/VCP'nin Kapasitasyon Sürecinden Önce ve Kapasitasyon Sürecinde Sperm Hücresindeki Ekspresyonunun Western Blot Yöntemi ile Analizi

İmmüno Floresan ve flow sitometrik analizleri kantitatif olarak desteklemek amacı ile Western blot analizi yapılmıştır.



Şekil 4.14. İnsan sperminin kapasitasyonuna p97/VCP inhibitörü (DBeQ) ve proteazom inhibitörlerinin (26S) etkisi (A ve B). (A) p97/VCP protein ekspresyonu NCM (Kapasite etmeyen medyum), 0., 5. Ve 18. Saatlik kapasitasyon süreleri sonrasında, 18 saatlik DBeQ (10 ve 100 mM) ve 26 S proteazom inhibitörü (10 ve 100 mM) ile inkübasyonu sonrasında ve inhibitörlerin hazırlandığı DMSO ile inkübe edildikten sonra Western blot yöntemi ile değerlendirildi. (B) İmage J programı kullanılarak protein bandları okutulduğunda, P97/VCP ekspresyonunun 0. Saatten 18. saate doğru artışı gösterdiği (1-4 nolu bandlar), inhibitör uygulaması ile bu ekspresyonun azaldığı (5-9 nolu bandlar) belirlenmiştir. Yapılan 3 farklı deneyin ortalama±SEM değerleri olarak verilmiş ve istatistiksel olarak anlamlı olanlar 3 yıldız ile işaretlenmiştir. NCM vs. 18s $p < 0,001$; 0.s vs. 18s. $p < 0,001$; 18s. vs. 100mM DBeQ $p < 0,001$; 18s. vs. 100mM 26S Proteazom inhibitörü.

Oluşturulan kapasitasyon deney gruplarına ait ekstraktlar ile yapılan western blot analizi sonucunda elde edilen membranın p97/VCP antikoru ile muamelesi sonucunda p97/VCP (89 kDa) proteinine karşılık gelen bantların 0.saatten 18.saate doğru arttığı görülmüştür.

En yoğun bant ise 18. saatte gözlenirken, kapasitasyon medyumlarına inhibitör verilen guruplar da özellikle yüksek konsantrasyonda (100 mM) inhibitör eklenen gruplarda 18. saate göre daha az yoğunlukta bantlar gözlenmiştir.

4.1.2. NEDL2'nun Kapasitasyonu İndüklenmiş ve Kapasitasyonu İndüklenmemiş Hücrelerdeki Ekspresyonu

NEDL2 proteininin kapasitasyon sürecine girmemiş ve kapasitasyon sürecinde sperm hücresindeki ekspresyonunu değerlendirmek amacı ile sperm hücreleri herhangi bir inkübasyona tabii tutulmadan 0. saatte ve de inkübasyonu takiben 5. ve 18. saatlerde incelenmiştir. Spontan olarak kapasitasyon sürecine giren hücreler de NEDL2 lokalizasyonu ve ekspresyonunu saptamak için ise NCM ile inkübe edilmiş ve de takiben immünofloresan, Western blot ve akım sitometrik analizler yapılmıştır.

4.1.2.1. NEDL2'nun Kapasitasyon Sürecinden Önce ve Kapasitasyon Sürecinde İnsan Spermindeki Lokalizasyonunun Belirlenmesi

NEDL2'nun kapasitasyon sürecine girmeden önce sperm hücrelerinde lokalizasyonunu saptayabilmek amacı ile sperm hücreleri inkübasyona tabii tutulmadan yıkama işlemini takiben 0. saatte immünofloresan yöntemle incelenmiştir. Kapasitasyon sürecinde p97/VCP lokalizasyonunda bir değişiklik olup olmadığını saptayabilmek için ise NCM (kapasite etmeyen medyum) ile 18 saatlik inkübasyon süreci sonrasında, CM (kapasite eden medyum) ile inkübasyon sırasında ise 5. ve 18. saatlerde NEDL2'nun sperm hücrelerindeki lokalizasyonuna bakılmıştır. Spem hücreleri NCM ile de 5 saatlik inkübasyona tabii tutulmuşlardır. Fakat 5. Saat NCM ile 18. Saat NCM arasında boyanma açısından bir fark görülmediği NCM ile 5 saat inkübe edilen grup sonuçları tekrar bulgular arasına konmamıştır.

NEDL2'nun Kapasitasyon Süreci Öncesi 0. Saatte Sperm Hücresindeki Lokalizasyonu

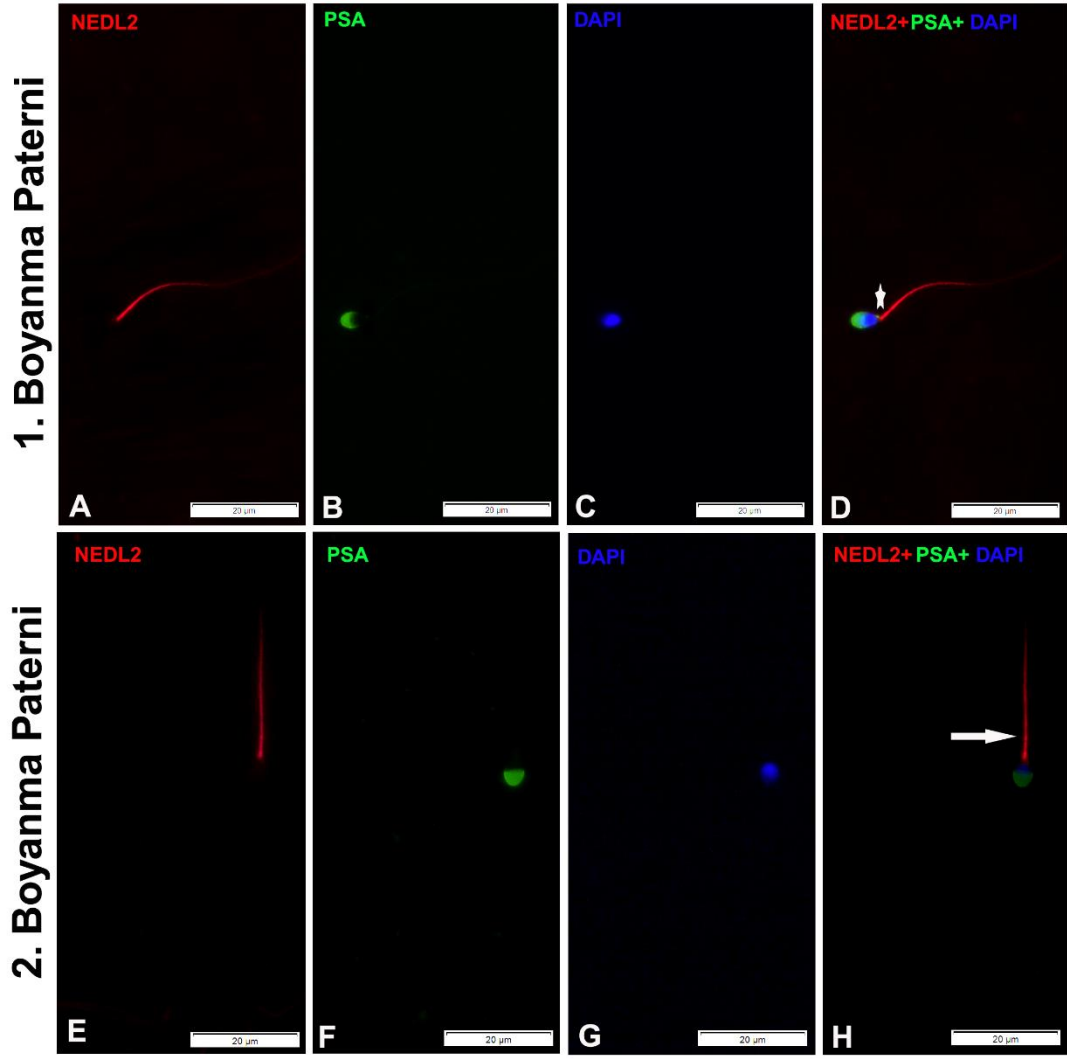
p97/VCP proteinini takiben sperm hücrelerindeki NEDL2 proteininin lokalizasyonunu belirlemek için yine gradient yöntemi ile yıkama yapıldıktan sonra 0. saatte hazırlanan sperm yayma prepatlarında NEDL2 lokalizasyonuna immüno Floresan yöntem ile bakılmıştır.

Sperm hücrelerinin gradient yöntemi ile yıkanmasından sonra NEDL2 proteini kullanılarak yapılan immüno Floresan çalışmaları sonucunda sperm hücrelerinin NEDL2 için iki farklı boyanma paterni gösterdiği görülmüştür. Birinci boyanma paternine göre NEDL2 spermin sperm baş ve bağlantı parçasında lokalizasyon göstermezken, sperm kuyruğunun son parçası hariç boyanma göstermiştir. Bu boyanma paterninde kuyruk orta parçasında kuyruk esas parçasına göre daha şiddetli olan boyanma dikkat çekicidir (n=3) (Şekil 4.15-A).

İkinci boyanma paterninde ise birinci boyanma paternide olduğu gibi sperm baş kısmında NEDL2 boyanma göstermezken sperm, sperm kuyruk son parça hariç tüm sperm boyunca NEDL2 lokalizasyonu görülmüştür. İkinci boyanma paterniden farklı olarak kuyruk orta ve esas parçasında aynı şiddette boyanma görülmüştür (n=3) (Şekil 4.15-E).

NEDL2 proteininin immüno Floresan olarak sperm hücresindeki lokalizasyonunu saptamak için yapılan immüno Floresan tekniğinde hücreler NEDL2 proteininin yanı sıra p97/VCP analizlerinde olduğu DNA'yı görüntüleyebilmek için DAPI ve akrozomu görüntüleyebilmek için PSA ile işaretlenmiştir. PSA boyaması sonucunda 0. saatte sperm hücrelerinin akrozomal bütünlüğünün korunduğu, sınırları düzgün ve boyanma açısından yoğun bir akrozomal bölge gözlenmiştir (Şekil 4.15-B-F).

Sperm hücrelerinin çekirdek bölgesini görüntüleyebilmek için kullanılan DAPI boyaması sonucunda ise spermilerin postakrozomal bölgede sınırları düzgün DNA sinyali verdiği görülmüştür (Şekil 4.15-C-G).



Şekil 4.15. Fertil bireylerde 0. Saatte görülen NEDL2 boyanma paterni: Fertil bireylere ait sperm yayma preparatlarında yapılan immüno Floresan analizler sonucunda NEDL2'ya ait iki farklı boyanma paterni saptanmış ve de sperm hücreleri arasında görülme yüzdesi daha yüksek olan birinci boyanma paterninde son parça hariç tüm kuyruk boyunca NEDL2 boyanması tespit edilmiştir. D: Bu boyanma paterninde kuyruk orta kısmında esas kısma göre daha şiddetli olan NEDL2 boyanması dikkat çekicidir. İkinci boyanma paterninde ise NEDL2 yine kuyruk son parça hariç tüm kuyrukta lokalizasyon göstermiş fakat boyanma şiddeti kuyruk orta parça ve esas parçada aynı şiddette görülmüştür. B-F: Her iki paterni ait sperm hücrelerinde de akrozomal bölgenin sınırları düzgün bütün bir yapıya sahip olduğu görülmüştür. C-G: Aynı şekilde çekirdek bölgesinde postakrozomal bölgede normal morfolojiye sahip olduğu görülmüştür. Bar: 20 µm

İmmüno Floresan çalışmaları üç farklı donöre ait sperm yayma preparatlarında çalışılmış ve her preparatta 200 hücre sayılmıştır. Yapılan sayımlar sonucunda NEDL2'ya ait birinci boyanma paterni tüm hücrelerin %90'ında, ikinci boyanma paterni ise tüm hücrelerin % 10'unda saptanmıştır (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. Fertil bireylere ait sperm yayma preparatlarında 0. saatte görülen iki farklı NEDL2 boyanma paternlerinin tüm spermler içindeki yüzde gösterimi: 3 farklı fertil bireye ait sperm yayma preparatları incelenmiş, her preparattan 200 hücre sayılmıştır.

(n=3, 600 sperm)	<u>1.Boyanma Paterni</u> Kuyruk Orta Parça (+) Kuyruk Esas Parça (+)	<u>2.Boyanma Paterni</u> Kuyruk Orta Parça (+) Kuyruk Esas Parça (+)
NEDL2 immunoreaktivitesi (%)	90,33±0,88	9,67±0,88

NCM ile İnkübe Edilen Gruplarda NEDL2'nun Sperm Hücresindeki Lokalizasyonu

NEDL2 ekspresyonun ise NCM solüsyonunda inkübe edilen sperm hücrelerinde nasıl bir değişikliğe uğradıklarını saptamak amacı ile spermler 18 saat boyunca NCM solüsyonunda inkübe edilmiştir. Sonuç olarak yine 0. saatle uyumlu olarak görülen iki farklı boyanma paternine ek olarak üçüncü bir boyanma paterni daha görülmüştür. Bu boyanma paternine ait hücrelerde diğer boyanma paternlerinde olduğu gibi son parça hariç tüm kuyruk boyunca NEDL2 lokalizasyonu görülmüştür fakat orta parçada görülen NEDL2 ekspresyonunun ikinci boyanma paternine göre dahada azaldığı görülmüştür.

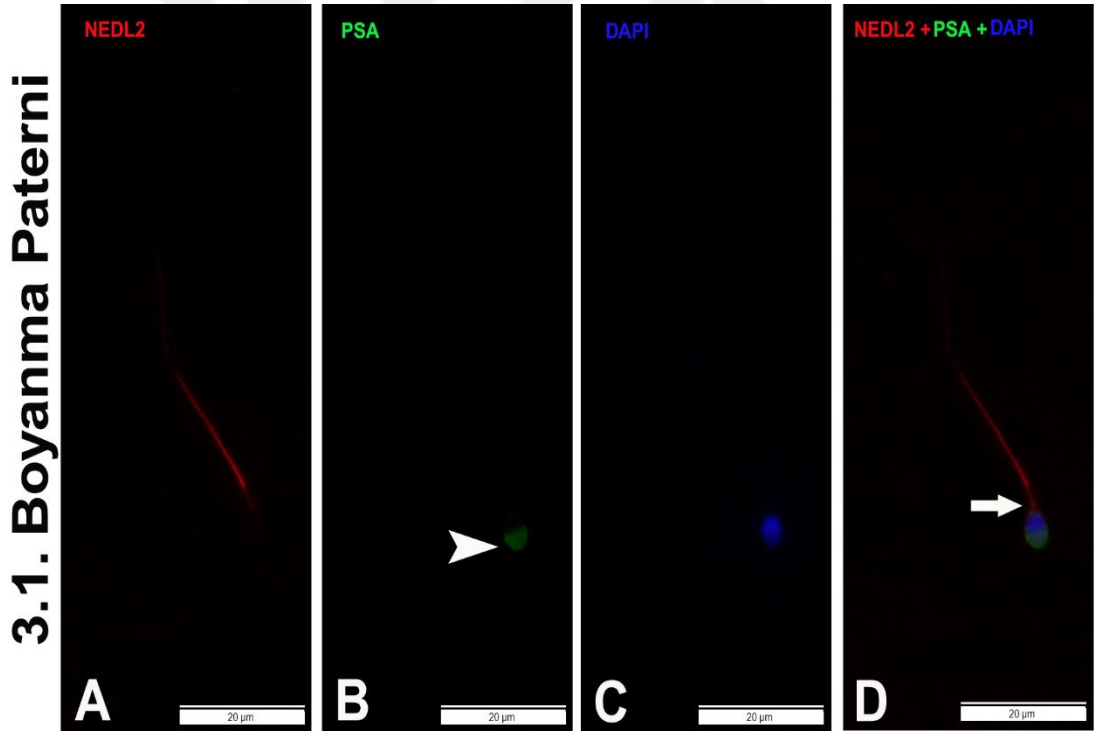
Bu gruba ait her üç donöre ait sperm yayma preparatlarında yapılan sayımlar sonucunda birinci boyanma paternine ait hücrelerin tüm hücrelerin % 83'ünü, ikinci paterne ait hücrelerin ise tüm popülasyonun %15'ini ve de üçüncü paterne ait hücrelerin ise tüm hücrelerin %2'sini oluşturduğu görülmüştür. Ayrıca bu grupta yapılan immünofloresan deneylerinde NEDL2 primer antikorunun yanısıra kullanılan DAPI ve PSA boyaması sonucunda akrozomal bölgede boyanma yoğunluğunun 0. saate göre minimal bir azalma gösterdiği görülmüştür.

İlk defa NCM grubunda karşılaştığımız 3. boyanma paternine ait sperm hücrelerinde kuyruk orta parçada ki NEDL2 ekspresyonu ikinci boyanma paterninden daha fazla, dikkat çekici bir şekilde azalmıştır.

Sonuç olarak ilk defa NCM grubunda karşılaştığımız sperm kuyruğunun orta parçasında görülen NEDL2 ekspresyonunun diğer boyanma paternlerinde ki orta parça boyanmasına göre dikkat çekici bir şekilde azaldığı görülmüştür.

Tablo 4.7. NCM grubuna ait p97/VCP boyanma paternlerinin tüm spermier içindeki görölme yüzdesi: 3 farklı fertil bireye ait sperm yayma preparatları incelenmiş, her preparattan 200 hücre sayılmıştır.

	1.Boyanma Paterni	2.Boyanma Paterni	3.Boyanma Paterni
(n=3, 600 sperm)	Kuyruk Orta Parça (+) (Çok Yoğun Boyanma) Kuyruk Esas Parça (+)	Kuyruk Orta Parça (+) Kuyruk Esas Parça (+)	Kuyruk Orta Parça (+) (Az Yoğun Boyanma) Kuyruk Esas Parça (+) (Az yoğun, normal ya da çok yoğun)
NEDL2 immunoreaktivitesi (%)	83,33±1,86	15±1,53	1,67±0,33

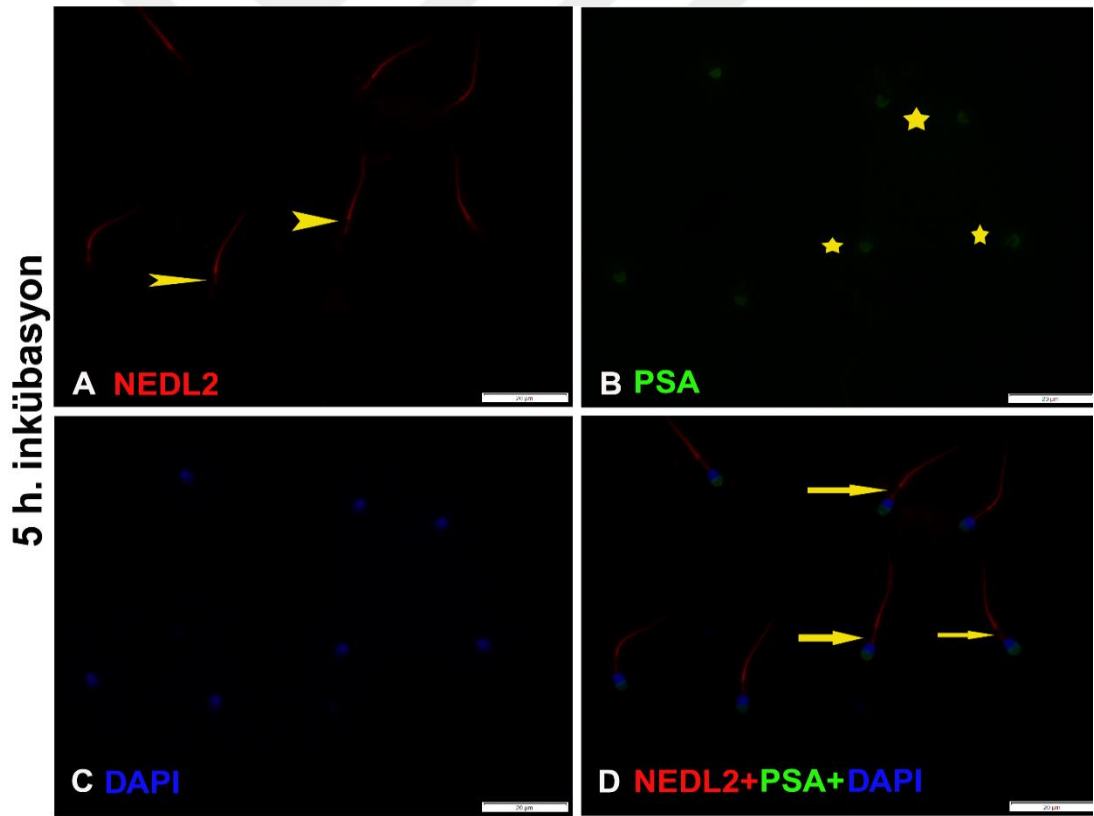


Şekil 4.16. Fertil bireylerde NCM ile inkübe edilen grupta görülen NEDL2'ya ait 3. boyanma paterni: A: NEDL2 lokalizasyonu sperm kuyruğunun orta ve esas parçası boyunca görülmüştür. B: NCM ile inkübe edilen spermierin akrozomal bölgesinde bütünlüğün bozulmadığı fakat bazı hücrelerde PSA boyanma şiddetinin oldukça azaldığı gözlenmiştir (okbaşı). C: DAPI ile çekirdek bölgesinin görüntülenmesi D: Sperm kuyruğunda oldukça azalan NEDL2 ekspresyonu dikkat çekicidir (ok). Bar: 20 µm

NEDL2'nun Kapasitasyon Sürecinde 5. Saatte Sperm Hücresindeki Lokalizasyonu

Fertil bireylerden alınan sperm örneklerinde, NEDL2 proteininin kapasitasyon sürecinde 5. saatteki lokalizasyonunu belirleyebilmek için sperm hücreleri CM ile 5 saat inkübe edilmiş, inkübasyonu takiben yapılan sperm yayma preparatlarında NEDL2 immünoreaktivitesi diğer gruplarda olduğu gibi kuyruk bölgesinde orta parça ve esas parçada belirlenmiştir (n=3).

Bu grupta ki sperm hücrelerinde de NCM grubunda olduğu gibi birinci ve ikinci boyanma paternlerine ek olarak üçüncü boyanma paternine ait hücreler görülmüş fakat bu hücrelerin sayısının NCM grubuna göre oldukça anlamlı bir şekilde arttığı görülmüştür.



Şekil 4.17. CM ile 5 saat inkübe edilen gruplarda görülen NEDL2'ya ait boyanma paternleri: **A:** NEDL2 lokalizasyonu sperm kuyruğunun orta ve esas parçası boyunca görülmüştür. Bu gruba ait hücrelerde görülen sperm orta parçasında azalan NEDL2 ekspresyonu görülmektedir (sarı okbaşı). **B:** CM ile 5 saat inkübe edilen spermlerin akrozomal bölgesinde PSA boyanma şiddetinin oldukça azaldığı gözlenmiştir (sarı yıldız). **C:** DAPI ile çekirdek bölgesinin görüntülenmesi **D:** 3. boyanma paternine ait hücrelerin sayısının arttığı görülmektedir (sarı ok). Bar: 20 µm

Bu gruba ait her üç donore ait sperm yayma preparatlarında yapılan sayımlar sonucunda birinci boyanma paternine ait hücrelerin tüm hücrelerin % 70'ini, ikinci paterne ait hücrelerin ise tüm popülasyonun % 17'ünü ve de üçüncü paterne ait hücrelerin ise tüm hücrelerin %13'ünü oluşturduğu görülmüştür.

PSA boyaması sonucu elde ettiğimiz görüntülerin değerlendirilmesi sonucunda bu gruba ait elde ettiğimiz ikinci önemli bulgu ise 5 saatlik inkübasyon sonucunda p97/VCP ile immünofloresan uyguladığımız sperm hücrelerinden elde ettiğimiz bulgu ile uyumlu olarak akrozomal boyanma yoğunluğunun 0. saat ve NCM ile inkübasyon grubuna göre azaldığı ve akrozomal bütünlüğün bazı hücrelerde bozulmaya başlaması yönündedir.

Tablo 4.8. 5 saatlik inkübasyon grubuna ait NEDL2 boyanma paternlerinin tüm spermier içindeki görülme yüzdesi: 3 farklı fertil bireye ait sperm yayma preparatları incelenmiş, her preparattan 200 hücre sayılmıştır.

	<u>1.Boyanma Paterni</u>	<u>2.Boyanma Paterni</u>	<u>3.Boyanma Paterni</u>
(n=3, 600 sperm)	Kuyruk Orta Parça (+) (Çok Yoğun Boyanma) Kuyruk Esas Parça (+)	Kuyruk Orta Parça (+) Kuyruk Esas Parça (+)	Kuyruk Orta Parça (+) (Az Yoğun Boyanma) Kuyruk Esas Parça (+) (Az yoğun, normal ya da çok yoğun)
NEDL2 immunoreaktivitesi (%)	70,33±0,88	16,67±1,20	13±1,15

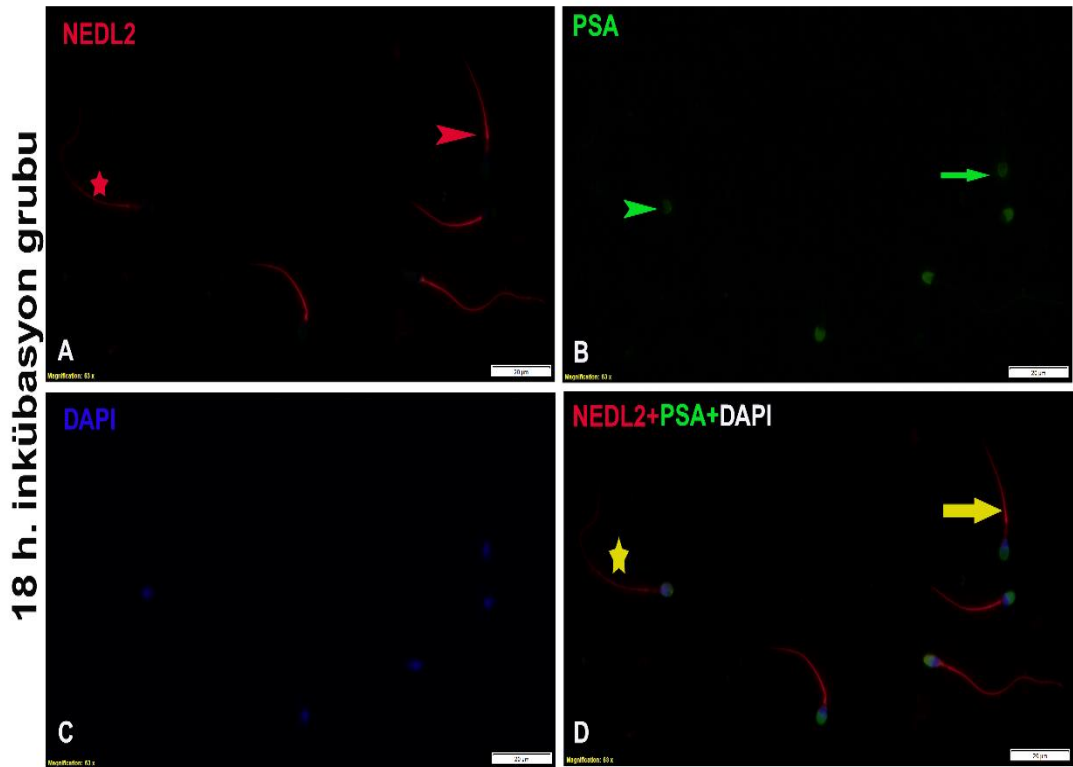
NEDL2' nun Kapasitasyon Sürecinde 18. Saatte Sperm Hücresindeki Lokalizasyonu

Fertil bireylerden alınan sperm örneklerinde NEDL2 proteininin kapasitasyon sürecinde 18. saatteki lokalizasyonunu belirleyebilmek için sperm hücreleri CM ile 18 saat inkübe edilmiş, inkübasyonu takiben yapılan sperm yayma preparatlarında NEDL2 immünoreaktivitesi diğer gruplarda olduğu sadece kuyruk bölgesinde belirlenmiştir (n=3).

18 saat CM ile inkübe ettiğimiz sperm hücrelerinde p97/VCP, NCM ve 5.saat gruplarında olduğu üç farklı boyanma paterni göstermiştir (n=3). Tüm hücreler içerisinde kuyruk esas parça ve bu kısımdan daha yoğun olarak kuyruk orta parçada NEDL2 lokalizasyonu gösteren sperm hücreleri %52, kuyruk esas parça ve kuyruk

orta parçada eşit şiddette ekspresyon gösteren hücreler %21 oranında dağılım göstermiştir. Bu her iki boyanma paternine ek olarak dikkat çekici bir şekilde kuyruk orta parça da ve ya bazı hücrelerde orta parçaya ek olarak kuyruk esas parçada da azalan ekspresyon gösteren hücreler %27 olarak bulunmuştur.

Ancak bu grupta 3. boyanma paternine ait sperm hücrelerinin bazılarında azalan kuyruk orta parçadaki NEDL2 ekspresyonuna ek olarak kuyruk esas parçadaki NEDL2 ekspresyonunda dikkat çekici bir şekilde azaldığı gözlenmiştir. Ayrıca bu gruba ait sperm hücreleri arasında 3. boyanma paterni gösteren hücrelerin sayısında diğer gruplara göre özellikle 5. saate göre anlamlı bir artış gözlenmiştir.



Şekil 4.18. CM ile 18 saat inkübe edilen gruplarda görülen NEDL2'ya ait boyanma paternleri: A: Bu gruba ait bazı hücrelerde sperm orta parçasında azalan NEDL2 ekspresyonu görülmektedir (kırmızı okbaşı). Bazı hücrelerde ise anlamlı bir şekilde azalan orta parçadaki NEDL2 ekspresyonuna yine dikkat çekici bir şekilde azalan kuyruk esas parça NEDL2 ekspresyonu eşlik etmektedir (kırmızı yıldız). B: 3-1 boyanma paterni gösteren hücrelerin akrozomal bölgesinde PSA boyanma şiddetinin oldukça azaldığı (yeşil ok), 3-2 boyanma paterni gösteren hücrelerin ise akrozomal bölgelerindeki bütünlüğün bozulmaya başladığı ve de PSA şiddetinin ise 3-1 boyanma paterni gösyeren hücrelere göre daha fazla azaldığı gözlenmiştir (yeşil okbaşı). C: DAPI ile çekirdek bölgesinin görüntülenmesi D: 3. boyanma paternine ait hücrelerin sayısının arttığı görülmektedir. 3-1 boyanma paterni (sarı ok), 3-2 boyanma paterni (sarı yıldız). Bar: 20 µm

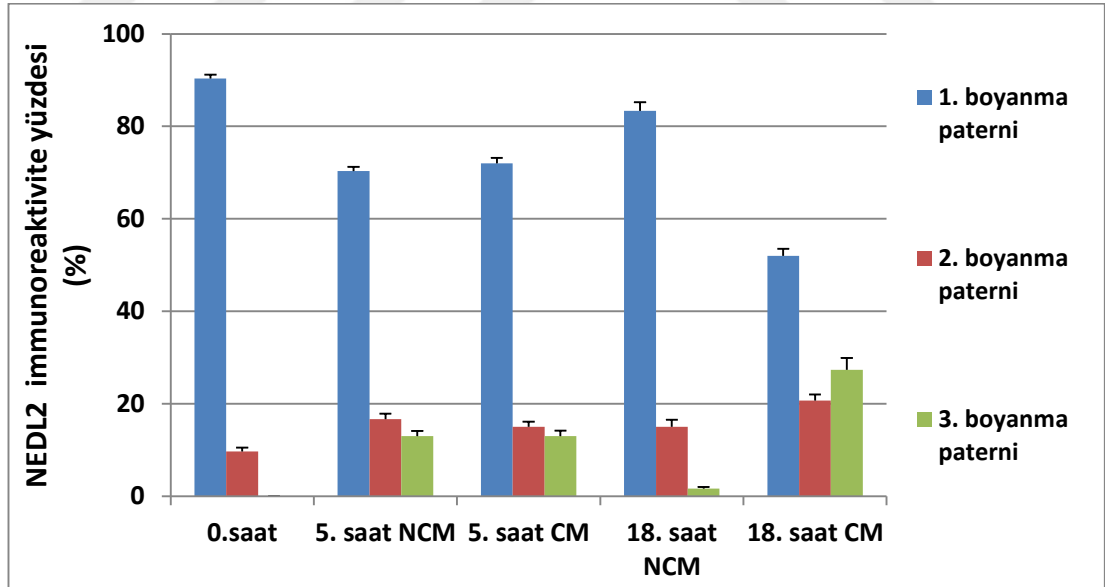
Sonuç olarak 18 saatlik inkübasyon sonucu gördüğümüz 3. boyanma paternine ait sperm hücrelerinde;

3-1) Bazı hücrelerde sadece kuyruk orta parça ekspresyonu azalmaya başlamıştır.

3-2) Bazı hücrelerde ise kuyruk orta parça ile birlikte kuyruk esas parçada da dikkat çekici bir şekilde NEDL2 ekspresyonu azalmaya başlamıştır.

Tablo 4.9. 18 saatlik inkübasyon grubuna ait NEDL2 boyanma paternlerinin tüm spermler içindeki görülme yüzdesi: 3 farklı fertil bireye ait sperm yayma preparatları incelenmiş, her preparattan 200 hücre sayılmıştır.

(n=3, 600 sperm)	1.Boyanma Paterni	2.Boyanma Paterni	3.Boyanma Paterni
	Kuyruk Orta Parça (+) (Çok Yoğun) Kuyruk Esas Parça (+)	Kuyruk Orta Parça (+) Kuyruk Esas Parça (+)	Kuyruk Orta Parça (+) (Az Yoğun) Kuyruk Esas Parça (+) (Az yoğun ya da normal ya da çok yoğun)
NEDL2 immunoreaktivitesi (%)	52±1,53	20,67±1,33	27,33±2,60



Şekil 4.19. NEDL2 proteininin 0. saat, NCM ile inkübasyon sürecinde 5. ve 18. saatlerde, CM ile inkübasyon sürecinde 5. ve 18. saatlerde göstermiş olduğu 1 .2. ve 3. boyanma paternlerine ait görülme yüzdesi: 3 farklı fertil bireye ait sperm hücreleri kullanılmış ve her bireyden 200 hücre sayılmıştır (n=3).

4.1.2.2. NEDL2' nun Kapasitasyon Sürecinden Önce ve Kapasitasyon Sürecinde Sperm Hücresindeki Ekspresyonunun Flow Sitometrik Analizi

Fertil bireylere ait sperm hücrelerinde NEDL2 lokalizasyonunun kapasitasyon sürecinden önce 0. saatte, kapasitasyon sürecinde 5. ve 18. saatlerde ve de NCM ile inkübe edilen gruplarda belirlenmesinden sonra bu proteininin sperm hücrelerindeki ekspresyonunu belirlemek amacı ile deneylere flow sitometrik analizler ile devam edilmiştir. Bu aşamada deneylere ayrıca inhibitörler kullanılarak oluşturulan gruplarda eklenmiştir.

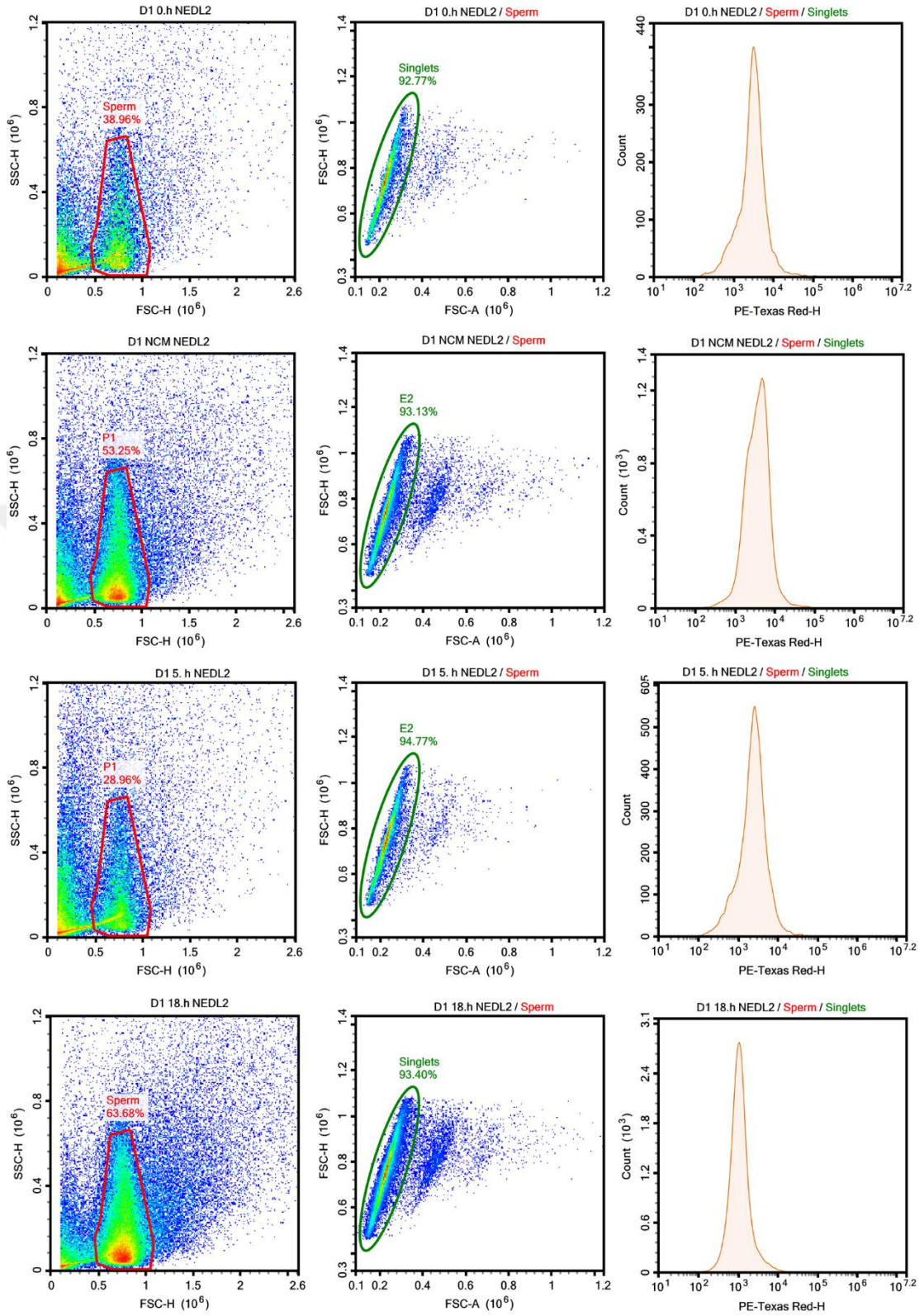
Analizler esnasında sperm hücresinin boyutu göz önüne alınarak öncelikle hücre popülasyonumuz seçilmiş, daha sonra ise bu popülasyon içerisinde başka hücrelerle birleşip hatalı ışımaya verecek hücreleri elemek amacıyla akım sitometri cihazı içerisindeki akış kabininden tek tek ışımaya vererek geçen hücreler seçilmiş ve de bu hücrelerin yoğunluğu ölçülmüştür.

0.saat, 5. saat, 18. saatlerde ve NCM ile İnkübe Edilen Sperm Hücrelerinde NEDL2 Ekspresyonunun Flow Sitometrik Analizi

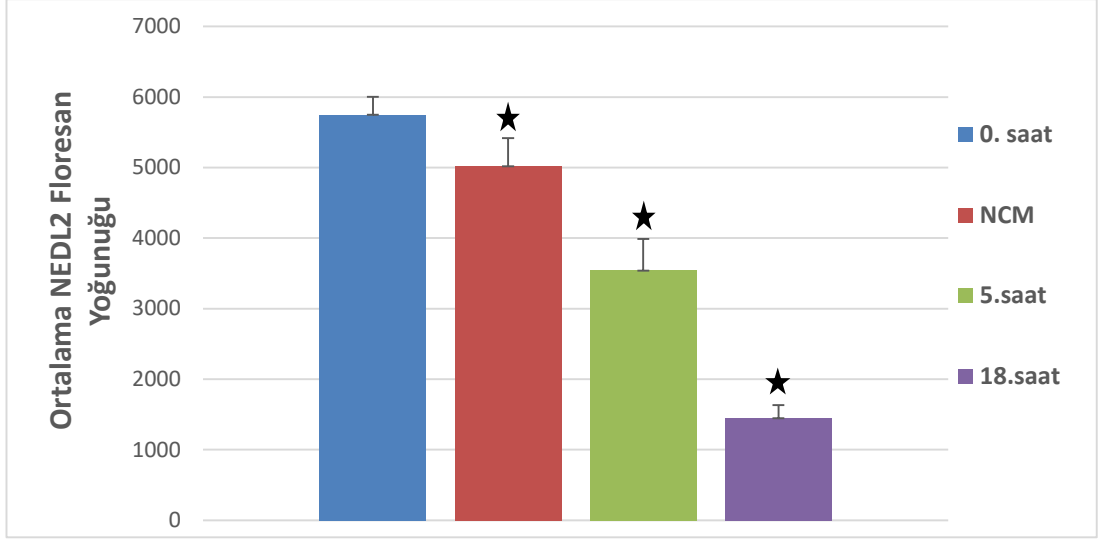
Kapasitasyon sürecinde farklı saatlerde kuyruğun farklı bölgelerinde boyanma şiddetininin değiştiğini belirlediğimiz NEDL2 proteininin yine kapasitasyon sürecinde ekspresyonlarındaki değişikliği saptayabilmek için yapılan flow sitometrik analizler sonucunda immünfloresan sonuçlarla uyumlu olarak 0. saatten 18. saate doğru NEDL2 ekspresyonunda bir azalma gözlenmiştir.

Akım sitometrisi deneylerinde her grup için üç fertil bireye ait fikse edilmiş sperm hücreleri ile çalışılmıştır ve bu üç bireyin flow sitometri sonuçları Şekil 4.20'de görülmektedir.

0.saat, 5. saat, 18. saatlerde ve NCM ile inkübe edilen sperm hücrelerinde NEDL2 ekspresyonunun akım sitometrik analizi sonucu elde edilen veriler ile yapılan istatistiksel çalışmalar sonucunda 0.saat; NCM grubu, 5.saat ve 18. saat ile karşılaştırılmış ve sonuç olarak NEDL2 ekspresyonunda azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (0.s vs.NCM. $p<0,005$; 0.s vs.5.s. $p<0,001$; 0.s. vs. 18.s $p<0,001$) (Şekil 4.21).



Şekil 4.20. Fertil bireylerde kapasitasyon sürecinden önce ve kapasitasyon süreci boyunca NEDL2 ekspresyonunun gösterilmesi: D1 kodlu fertil bireyden alınan sperm örnekleri ile yapılan flow sitometrik analizler sonucunda belirlediğimiz sperm popülasyonuna ait grafik (solda), bu popülasyonlar içerisinde tek sıra halinde akış kabini içerisinde bulunan hücrelere ait sperm popülasyonuna ait grafik (ortada) ve bu hücrelere ait NEDL2 ekspresyonuna ait grafik(sağda) görülmektedir .



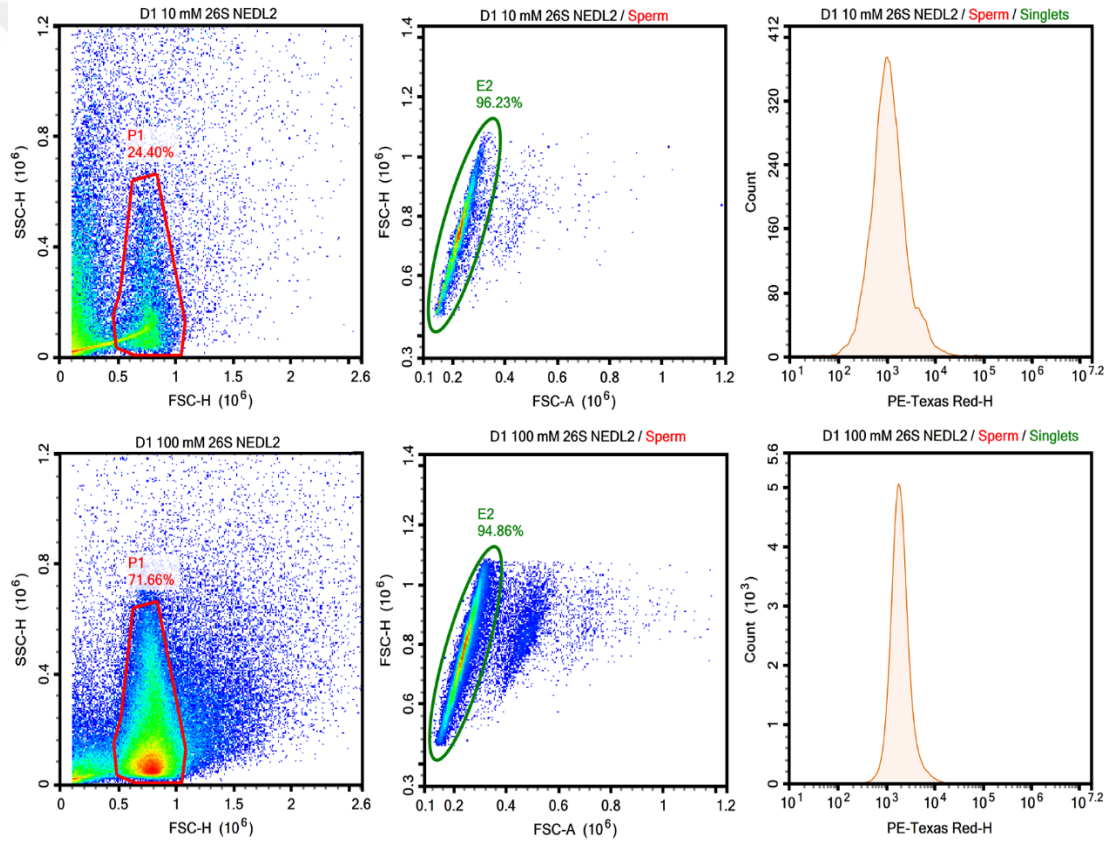
Şekil 4.21. NEDL2 ekspresyonunun 0. saat, 5. saat, 18. Saat ve NCM gruplarında akım sitometrik yöntemle karşılaştırmalı olarak değeri: Bu proteinin ekspresyonunda 0. saatten 18. saate doğru artış görülmüştür. 18. saatte ise diğer gruplara göre anlamlı bir azalma saptanmıştır. Yapılan 3 farklı deneyin ortalama±SEM değerleri olarak verilmiş ve istatistiksel olarak anlamlı olanlar yıldız ile işaretlenmiştir (0.s vs.NCM. $p<0,005$; 0.s vs.5.s. $p<0,001$; 0.s. vs. 18.s $p<0,001$).

Kapasitasyon Medyumuna ve 26 S İnhibitörleri ile 18 Saat İnkübe Edilen Sperm Hücrelerinde NEDL2 Ekspresyonları

Kapasitasyon sürecinde ekspresyonunun değiştiğini belirlediğimiz NEDL2 proteininin ubikülin proteazom sistemi inhibitörlerinin kapasitasyon medyumuna eklenmesi ile yapılan inkübasyon sonucunda NEDL2 proteininin ekspresyonunda nasıl bir değişiklik olduğu saptamak amacı ile öncelikle flow sitometrik analizler yapılmıştır. Bu amaçla üç farklı ubikülin proteazom sistemi inhibitörü kullanılmış ve inhibitörlerin etkisini tam olarak saptayabilmek için farklı konsantrasyonlarda UPS inhibitörleri ile hazırlanan kapasitasyon medyumları ile sperm hücreleri inkübe edilmiştir.

UPS inhibitörleri olarak kullandığımız MG-132, Epoksimisin ve CLBL inhibitörlerinden eşit konsantrasyonda kullanarak hazırladığımız karışımın kapasitasyon sürecine olan etkisini saptayabilmek için bu karışımlardan farklı konsantrasyonlarda kullanılarak eklenen kapasitasyon medyumuna ile deneyler yapılmış ve denemeler sonucunda UPS inhibitörlerinin düşük etkili (10 mM) ve güçlü etkili (100 mM) olduğu iki konsantrasyon oranı belirlenmiştir.

Akım sitometrisi deneylerinde bu her grup için üç fertil bireye ait fikse edilmiş sperm hücreleri NEDL2 ile çalışılmıştır ve bu üç bireyin flow sitometri sonuçları Şekil 4.22’de görülmektedir. Sonuç olarak 26S proteazom inhibitörleri kullanılarak yapılan kapasitasyon deneylerinde inhibitör kullanmadan sadece CM ile inkübe edilen gruplara göre NEDL2 ekspresyonunda artış gözlenmiştir. 10 mM UPS inhibitörleri konsantrasyonu kullanılarak hazırlanan kapasitasyon medyumunu ile inkübe edilen gruplara göre 100 mM UPS inhibitörleri konsantrasyonu kullanılarak hazırlanan kapasitasyon medyumunu ile inkübe edilen gruplarda NEDL2 ekspresyonunda daha anlamlı bir artış gözlenmiştir (Şekil 4.24) (18s. vs. 10 mM 26S $p<0,001$; 18s. vs. 100mM 26S Proteazom inhibitörü $p<0,001$).



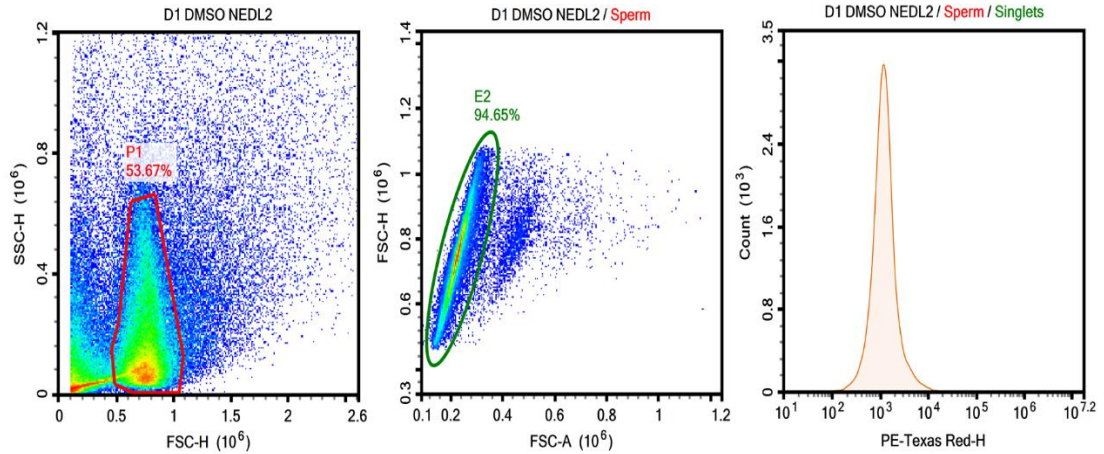
Şekil 4.22. Fertil bireylerde kapasitasyon sürecinde UPS inhibitörlerinin NEDL2 ekspresyonuna olan etkisinin gösterilmesi: D1 kodlu fertil bireyden alınan sperm örnekleri ile yapılan flow sitometrik analizler sonucunda belirlediğimiz sperm popülasyonuna ait grafik (solda), bu popülasyonlar içerisinde tek sıra halinde akış kabini içerisinde bulunan hücrelere ait sperm popülasyonuna ait grafik (ortada) ve bu hücrelere ait NEDL2 ekspresyonuna ait grafik (sağda) görülmektedir.

Kapasitasyon Medyumuna ve DMSO ile 18 Saat İnkübe Edilen Sperm Hücrelerinde NEDL2 Ekspresyonları

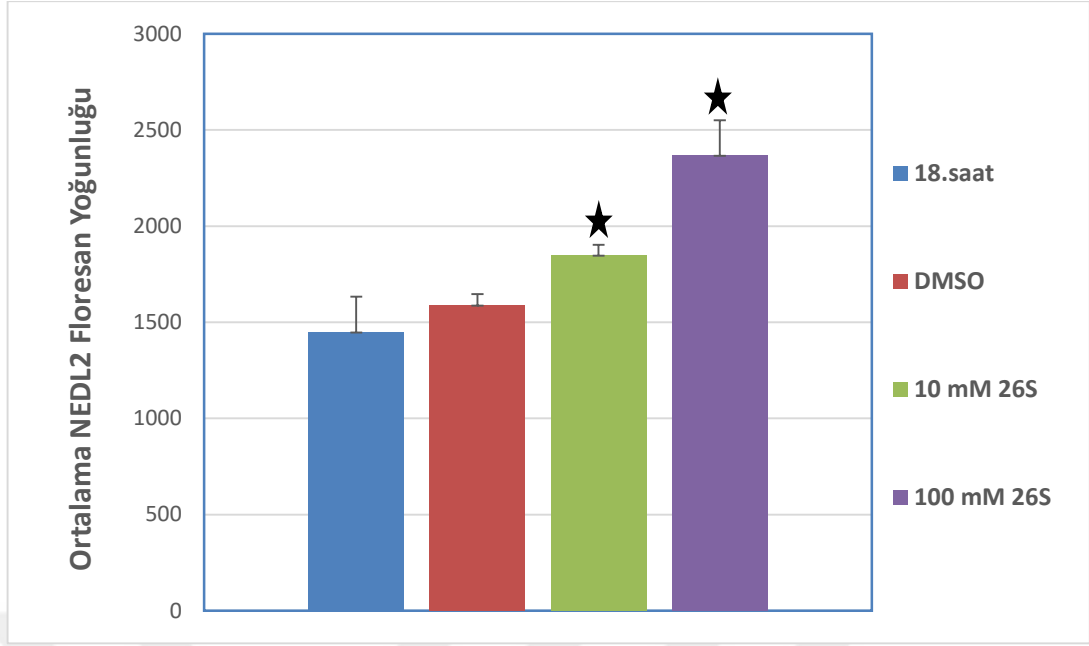
Bu iki gruba ek olarak UPS inhibitörlerini çözdürmek için kullandığımız DMSO kimyasalının kapasitasyon sürecine olan etkisini araştırabilmek için kapasitasyon medyumuna sadece DMSO eklenerek inkübe edilen sperm hücrelerinde de NEDL2 proteininin ekspresyonundaki değişiklikler flow sitometrik yöntemle incelenmiştir.

Akım sitometrisi deneylerinde bu grup için üç fertil bireye ait fıkse edilmiş sperm hücreleri ile çalışılmıştır ve bu üç bireyin flow sitometri sonuçları Şekil 4.23’de görülmektedir.

Sonuç olarak DMSO eklenerek hazırlanan kapasitasyon medyumuna ile inkübe edilen gruplarda 18 saat sadece kapasitasyon medyumuna ile inkübe edilen gruba göre NEDL2 ekspresyonunda minimal da olsa bir artış gözlenmiştir (Şekil 4.24). İstatistiksel olarak anlamlı bulunmayan bu artış sonucunda DMSO’ nun kapasitasyon sürecinde ve bu süreçte NEDL2 ekspresyonu üzerinde etkili bir toksik etkisinin olmadığı görülmüştür.



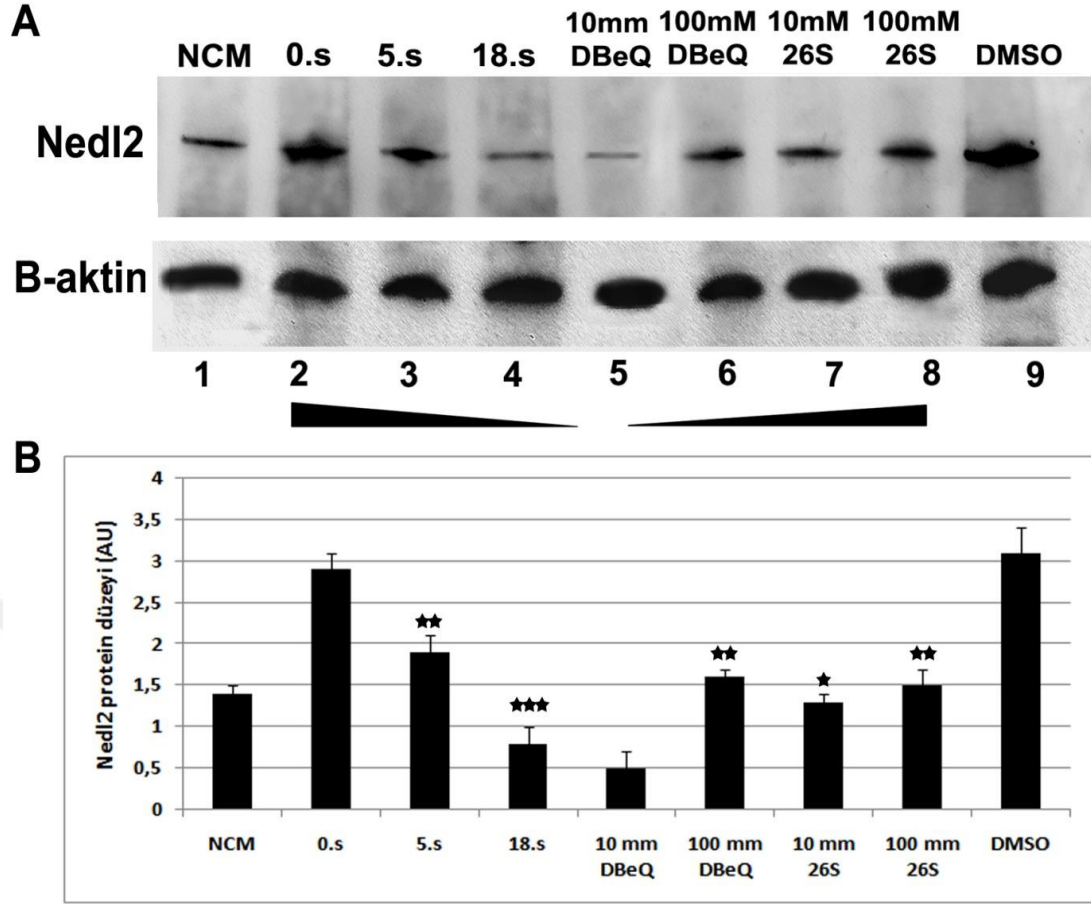
Şekil 4.23. Fertil bireylerde kapasitasyon sürecinde DMSO’nun NEDL2 ekspresyonuna olan etkisinin gösterilmesi: D1 kodlu fertil bireyden alınan sperm örnekleri ile yapılan flow sitometrik analizler sonucunda belirlediğimiz sperm popülasyonuna ait grafik (solda), bu popülasyonlar içerisinde tek sıra halinde akış kabini içerisinde bulunan hücrelere ait sperm popülasyonuna ait grafik (ortada) ve bu hücrelere ait NEDL2 ekspresyonuna ait grafik(sağda) görülmektedir .



Şekil 4.24. NEDL2 ekspresyonunun 26S İnhibitörleri ve DMSO eklenen gruplarda 18. saat grubuna göre akım sitometrik yöntemle karşılaştırmalı olarak değeri: Bu proteinin ekspresyonunda 100 mM 26S inhibitörü eklenen gruplarda saatte diğer gruplara göre anlamlı bir artış saptanmıştır. Sadece DMSO eklenen gruplarda ise 18. saat grubuna göre minimal bir artış görülmüştür. 18s. vs. 10 mM 26S $p<0,001$; 18s. vs. 100mM 26S Proteazom inhibitörü $p<0,001$).

4.1.2.3. NEDL2'nun Kapasitasyon Sürecinden Önce ve Kapasitasyon Sürecinde Sperm Hücresindeki Ekspresyonunun Western Blot Yöntemi ile Analizi

İmmünofloresan ve flow sitometrik analizleri kantitatif olarak desteklemek amacı ile Western blot analizi yapılmıştır. Oluşturulan kapasitasyon deney gruplarına ait ekstraktlar ile yapılan western blot analizi sonucunda elde edilen membranın NEDL2 antikoru ile muamelesi sonucunda NEDL2 (176 kDa) proteinine karşılık gelen bantların 0.saatten 18.saate doğru arttığı görülmüştür. En yoğun bant ise 0. saatte gözlenirken, kapasitasyon medyumlarına inhibitör verilen guruplar da özellikle yüksek konsantrasyonda (100 mM) inhibitör eklenen gruplarda 18. saate göre daha yoğun bantlar gözlenmiştir.



Şekil 4.25. İnsan sperminin kapasitasyonuna p97/VCP inhibitörü (DBEq) ve proteazom inhibitörlerinin (26S) etkisi (A ve B). (A) NEDL2 protein ekspresyonu NCM (Kapasite etmeyen medyum), 0., 5. ve 18. saatlik kapasitasyon süreleri sonrasında, 18 saatlik DBEq (10 ve 100 mM) ve 26 S proteazom inhibitörü (10 ve 100 mM) ile inkübasyonu sonrasında ve inhibitörlerin hazırlandığı DMSO ile inkübe edildikten sonra Western blot yöntemi ile değerlendirildi. (B) İmage J programı kullanılarak protein bantları okutulduğunda, NEDL2 ekspresyonunun 0. Saatten 18.saate doğru azalış gösterdiği (1-4 nolu bandlar), inhibitör uygulaması ile bu ekspresyonun arttığı (5-9 nolu bandlar) belirlenmiştir. Yapılan 3 farklı deneyin ortalama±SEM değerleri olarak verilmiş ve istatistiksel olarak anlamlı olanlar 3 ve 2 yıldız ile işaretlenmiştir. 0.s vs.18s $p<0,001$; star, star 0.s vs.5.s. $p<0,01$; 5s. vs.18s $p<0,01$; 18s. vs. 100mM DBEq $p<0,01$; 18s. vs. 100mM 26S $p<0,01$; star, 18s. vs. 10mM 26S Proteazom inhibitörü $p<0,05$; .

4.1.3. PAWP'ın Kapasitasyonu İndüklenmiş ve Kapasitasyonu İndüklenmemiş Hücrelerdeki Ekspresyonu

p97/VCP ve NEDL2 proteinlerini takiben PAWP proteininin de kapasitasyon sürecine girmemiş ve kapasitasyon sürecinde sperm hücreesindeki ekspresyonunu belirleyebilmek amacı ile sperm hücreleri herhangi bir inkübasyona tabii tutulmadan 0. saatte ve de inkübasyonu takiben 5. ve 18. saatlerde incelenmiştir. Spontan olarak kapasitasyon sürecine giren hücreler de PAWP lokalizasyonu ve ekspresyonunu

saptamak için ise NCM ile inkübe edilmiş ve de yine immünofloresan, Western blot ve akım sitometrik analizler yapılmıştır.

4.1.3.1. PAWP'ın Kapasitasyon Sürecinden Önce ve Kapasitasyon Sürecinde İnsan Spermindeki Lokalizasyonunun Belirlenmesi

Sperm hücrelerinde kapasitasyon sürecine girmeden önce PAWP'ın lokalizasyonunu saptayabilmek amacı ile sperm hücreleri inkübasyona tabii tutulmadan yıkama işlemini takiben 0. saatte immünofloresan yöntemle incelenmiştir. PAWP'ın kapasitasyon sürecinde lokalizasyonunda bir değişiklik olup olmadığını saptayabilmek için ise sperm hücreleri NCM ile 18 saatlik inkübasyon süreci sonrasında ve CM ile inkübasyon sırasında ise 5. ve 18. saatlerde immünofloresan yöntemle sperm hücrelerindeki lokalizasyonuna bakılmıştır. Sperm hücreleri NCM ile de 5 saatlik inkübasyona tabii tutulmuşlardır. Fakat 5. saat NCM ile 18. saat NCM arasında boyanma açısından bir fark görülmediği NCM ile 5 saat inkübe edilen grup sonuçları tekrar bulgular arasına konmamıştır.

PAWP'ın Kapasitasyon Süreci Öncesi 0. Saatte Sperm Hücresindeki Lokalizasyonu

PAWP'ın fertil bireylere ait normal morfolojiye sahip sperm hücrelerinde lokalizasyonunu saptamak için sperm yayma preparatları üzerinde yapılan immünofloresan çalışmaları sonucunda sperm hücrelerinde PAWP'ın iki farklı boyanma paterni gösterdiği görülmüştür.

Sperm hücrelerinin büyük bir çoğunluğunda görülen birinci boyanma paternine göre PAWP sperm kuyruğunun orta parçasında, esas parçasında ve de son kısmında olmak üzere her üç bölgesinde de boyanma göstermiştir. Kuyruk orta parça ve esas parçada aynı şiddette boyanma görülürken kuyruk son kısımda bu bölgelere göre azalan şiddette bir boyanma görülmüştür. Kuyruktan daha şiddetli bir şekilde bağlantı parçasında ve de postakrozomal bölgede çift çizgi halinde PAWP lokalizasyonu görülmektedir (Şekil 4.26-A).

Az sayıda görülen ikinci boyanma paternine göre ise yine tüm kuyruk boyunca görülen PAWP lokalizasyonunu takiben bağlantı parçasında ve de başın postakrozomal bölgesinde çift çizgi halinde iki bölgede lokalizasyon göstermiştir. Birinci boyanma paterninden farklı olarak ise orta parçada mitokondriyal bölgede esas parçaya göre minimal azalan bir ekspresyon görülmektedir. Yani orta parçada görülen bu azalma 0.saatte çok belirgin olmayıp minimal şiddette bir azalma göstermiştir. Kuyruk son kısımda ise birinci paternde olduğu gibi boyanma şiddeti esas parça ve orta parçaya göre azalan şiddettedir (Şekil 4.26-E).

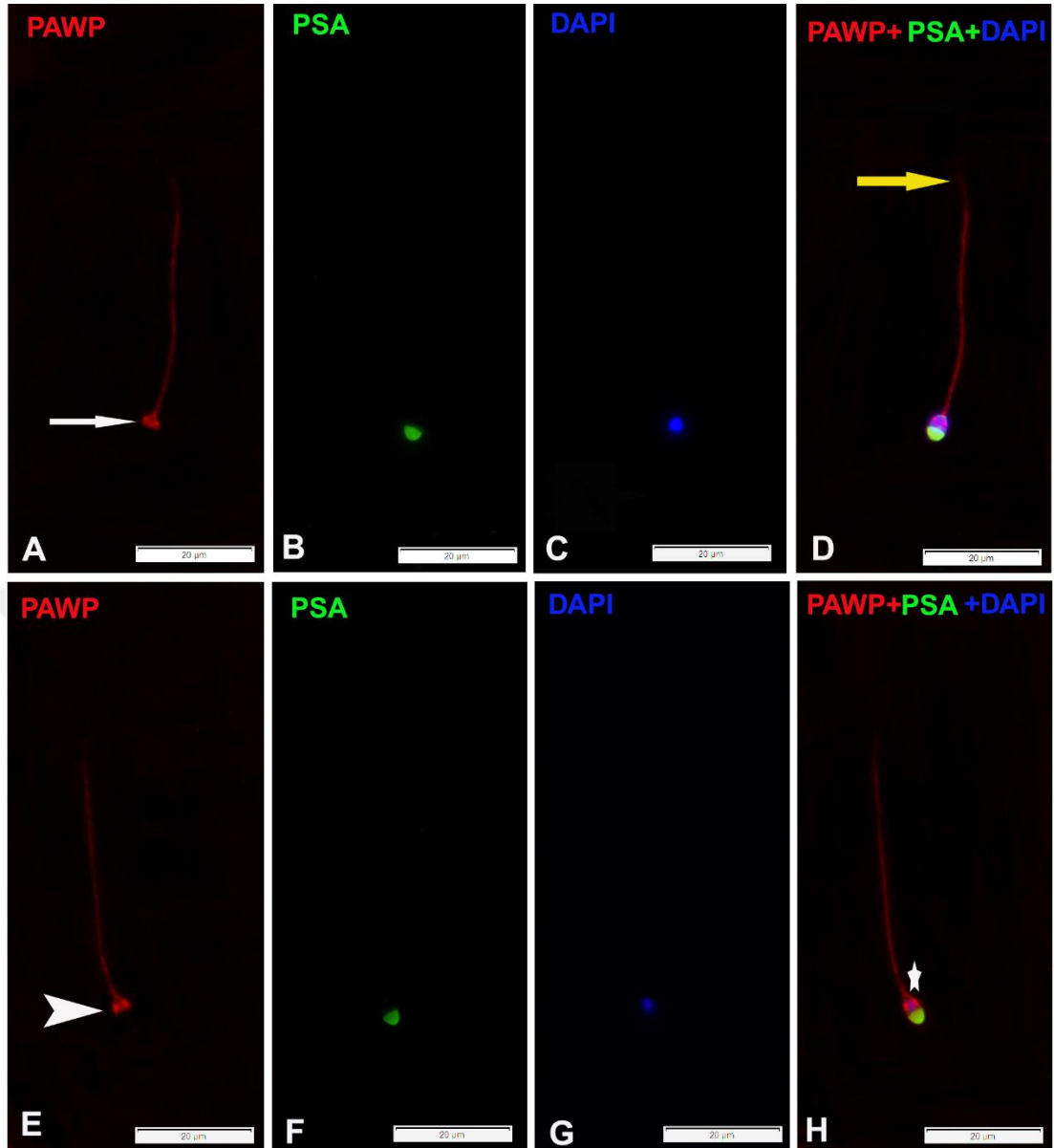
Akrozomal bölgenin görülmesi için kullanılan PSA boyaması sonucunda da 0. saatte PAWP ile işaretlenen hücrelerde akrozomal bütünlüğün korunduğu, sınırları düzgün ve boyanma açısından yoğun bir akrozomal bölge gözlenmiştir (Şekil 4.26-B-F).

Yine PAWP pozitif sperm hücrelerinin çekirdek bölgesini görüntüleyebilmek için kullanılan DAPI boyaması sonucunda da spermilerin postakrozomal bölgede sınırları düzgün DNA sinyali verdiği görülmüştür (Şekil 4.26-C-G).

İmmünofloresan çalışmaları üç farklı donöre ait sperm yayma preparatlarında çalışılmış ve her preparatta 200 hücre sayılmıştır. Yapılan sayımlar sonucunda PAWP'a ait birinci boyanma paterni tüm hücrelerin %91'inde, ikinci boyanma paterni ise tüm hücrelerin % 9'unda saptanmıştır (Tablo 4.10).

Tablo 4.10. Fertil bireylere ait sperm yayma preparatlarında 0. saatte görülen iki farklı PAWP boyanma paterninin tüm spermier içindeki görülme yüzdesi: 3 farklı fertil bireye ait sperm yayma preparatları incelenmiş, her preparattan 200 hücre olmak üzere toplam 600 hücre sayılmıştır.

(n=3, 600 sperm)	<u>1.Boyanma Paterni</u>	<u>2.Boyanma Paterni</u>
	Kuyruk (+) Bağlantı parçası (+) Postakrozomal Bölge(+)	Kuyruk (+) Bağlantı parçası (+) Postakrozomal Bölge(+)
PAWP immunoreaktivitesi (%)	91.33±1.20	8,67±1,20



Şekil 4.26. Fertil bireylere ait sperm yayma preparatlarında 0. saatte görülen iki farklı PAWP boyanma paterninin immünfloresan yöntemle görüntülenmesi; Fertil bireylere PAWP immünfloresan çalışmalar sonucunda iki farklı boyanma paterni görülmüştür. A: Birinci boyanma paternine göre sperm hücrelerinin baş bölgesinde postakrozomal bölgede çift çizgi halinde PAWP lokalizasyonu görülmüştür (beyaz ok). B: PSA boyaması sonucunda akrozomal yapının düzgün olduğu görülmektedir. C: Çekirdek bölgesinin görüntülenmesi D: Kuyruk kısmında orta ve esas parçada aynı şiddette PAWP boyanması görülürken kuyruk son parçada bu iki bölgeye göre çok düşük şiddette PAWP boyanması görülmüştür (sarı ok). E: İkinci boyanma paternine göre ise yine baş bölgesinde çift çizgi halinde iki bölgede PAWP lokalizasyonu görülmüştür (okbaşı). F: PSA boyaması sonucunda akrozomal bölgedeki boyanma şiddetinin yüksek olduğu görülmektedir. G: Çekirdek normal morfolojiye sahip hücrelerle uyumlu bir şekilde postakrozomal bölgede yer almaktadır. H: Orta parçada esas parçaya göre minimal azalan bir boyanma çok az sayıda ki hücrede görülmektedir (yıldız). Bar: 20 µm

NCM ile İnkübe Edilen Gruplarda PAWP'ın Sperm Hücresindeki Lokalizasyonu

Sperm hücrelerinin spontan olarak kapasitasyona doğru gidip gitmeyeceğini araştırabilmek amacı ile NCM solüsyonunda 18 saat inkübe edilen spermier gradient yöntemi ile yıkama işleminin ardından sperm yayma preparatları hazırlanarak immünofloresan olarak PAWP' ın sperm hücrelerindeki lokalizasyonuna bakılmıştır.

PAWP immünoreaktivitesi 0. saatle uyumlu olarak iki farklı boyanma paterni göstermiştir (n=3). Fakat NCM ile inkübasyona tabii tutulan hücreler immünofloresan yöntemi ile incelendiğinde 0. saatten farklı çok nadir olarak yeni bir boyanma paterni görülmüştür. Bu üçüncü boyanma paternine ait hücrelerde;

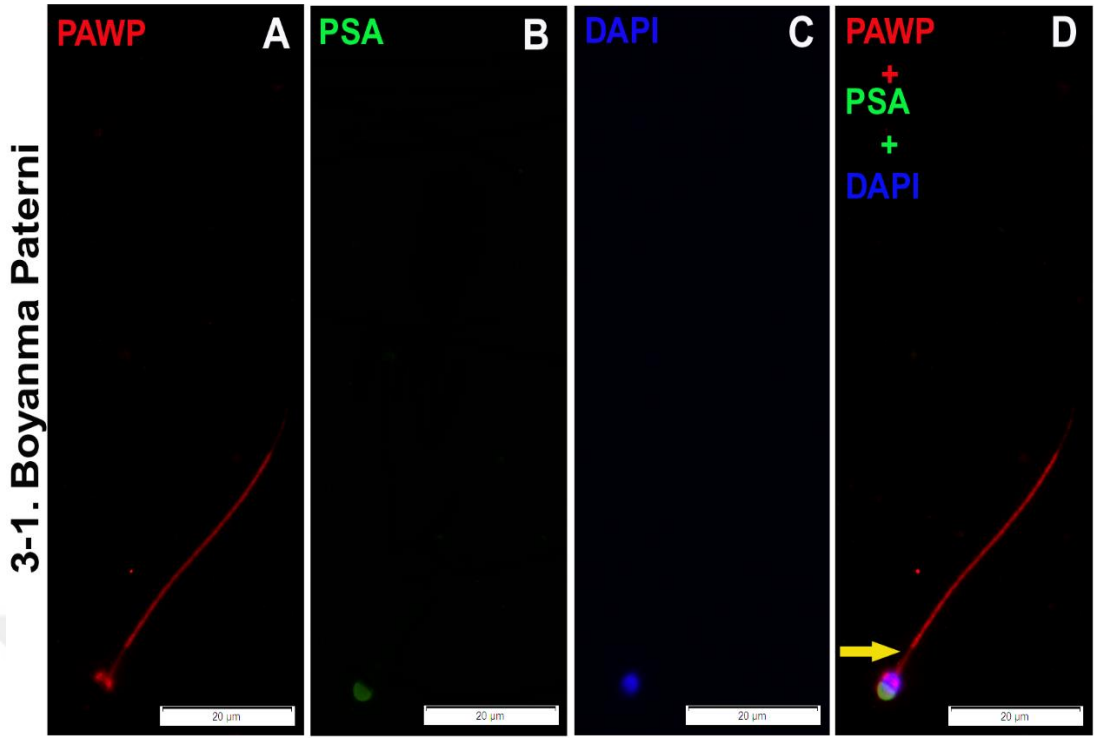
3-1) Bazı hücrelerde kuyruk orta parçadaki boyanma şiddetinin 2. boyanma paternine göre daha fazla azaldığı görülmüştür.

3-2) Bazı hücrelerde ise kuyruk orta parçadaki azalmaya ek olarak kuyruk esas parçada ki boyanma şiddetinin oldukça bariz bir şekilde arttığı görülmüştür. Bu azalmaya aynı zamanda postakrozomal bölgede çift çizgi halinde görülen PAWP lokalizasyonunda azalması eşlik etmektedir. Bu hücrelerde ayrıca akrozomal bölgeyi görüntüleyebilmek için yapılan PSA boyasında şiddetinin azaldığı dikkat çekmektedir.

NCM grubundaki bu hücrelerin sayısındaki artışın çok anlamlı olmadığı yapılan sayımlar sonucunda görülmüştür. Bu gruba ait her üç donore ait yapılan sayımlar sonucunda birinci boyanma paternine ait hücrelerin tüm hücrelerin % 90'ının, ikinci paterne ait hücrelerin ise tüm popülasyonun % 9'unu ve de üçüncü paterne ait hücrelerin ise tüm hücrelerin %1'ini oluşturduğu görülmüştür.

Tablo 4.11. NCM ile inkübe edilen gruba ait sperm hücrelerinde görülen üç farklı PAWP boyanma paterninin tüm spermier içindeki görülme yüzdesi: 3 farklı fertil bireye ait sperm yayma preparatları incelenmiş, her preparattan 200 hücre olmak üzere toplam 600 hücre sayılmıştır.

	<u>1.Boyanma Paterni</u>	<u>2.Boyanma Paterni</u>	<u>3.Boyanma Paterni</u>
(n=3, 600 sperm)	Kuyruk (+) Bağlantı parçası (+) Postakrozomal Bölge(+)	Kuyruk (+) Bağlantı parçası (+) Postakrozomal Bölge(+)	Kuyruk (+) Bağlantı parçası (+) Postakrozomal Bölge(+)
PAWP immunoreaktivitesi (%)	88,67±1.33	9,67±0,67	1,33±0,33



Şekil 4.27. NCM grubuna ait sperm yayma preparatlarında görülen PAWP boyanma paterninin immünfloresan yöntemle görüntülenmesi: Fertil bireylerde PAWP immünfloresan çalışmalar sonucunda iki farklı boyanma paterni görülmüştür. A: Birinci boyanma paterninde sperm hücrelerinin baş bölgesinde postakrozomal bölgede çift çizgi halinde PAWP lokalizasyonu görülmüştür. B: PSA boyaması sonucunda akrozomal yapının düzgün olduğu görülmektedir. C: Çekirdek bölgesinin görüntülenmesi D: Kuyruk kısmında orta parçada ikinci boyanma paternine göre azalan şiddette PAWP boyanması görülmüştür (sarı ok). Bar: 20 µm

PAWP'ın Kapasitasyon Sürecinde 5. Saatte Sperm Hücresindeki Lokalizasyonu

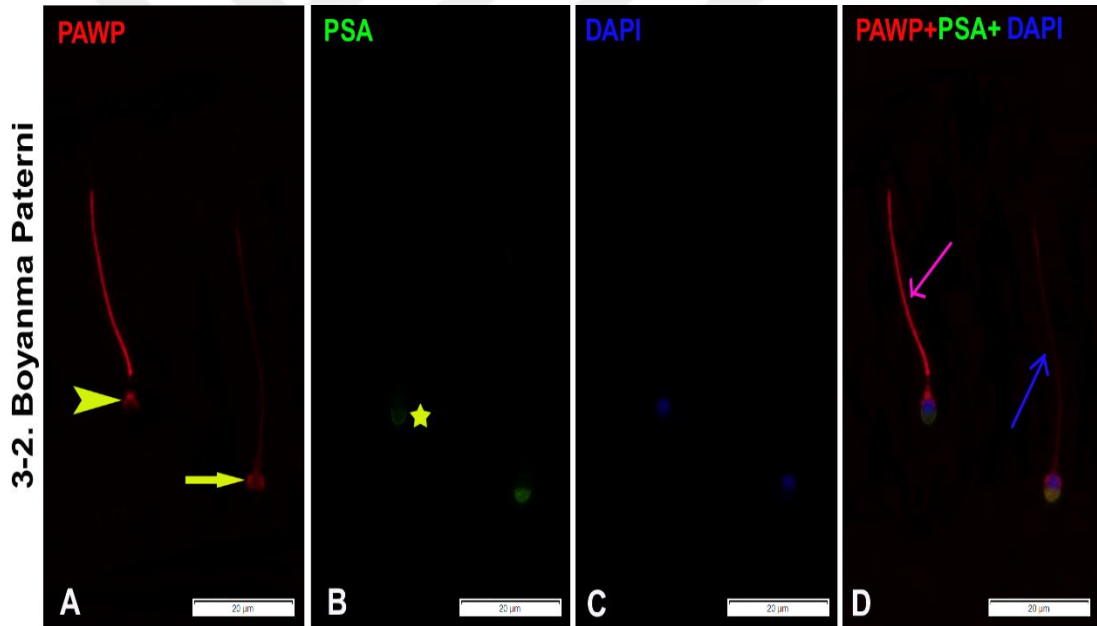
Fertil bireylerden alınan sperm örneklerinde, PAWP proteininin kapasitasyon sürecinde 5. saatteki lokalizasyonunu belirleyebilmek için p97/VCP ve NEDL2 antikorlarıyla yapılan deneylerde olduğu gibi sperm hücreleri CM ile 5 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben yapılan sperm yayma preparatlarında PAWP immünoreaktivitesi diğer gruplarda olduğu gibi başın postakrozomal bölgesinde ve tüm kuyruk boyunca belirlenmiştir (n=3). Bu grupta da NCM grubunda olduğu gibi üç farklı boyanma paterni görülmüştür.

Bu grupta ki sperm hücrelerinde NCM grubunda olduğu gibi birinci ve ikinci boyanma paternlerine ek olarak üçüncü boyanma paternine ait hücreler görülmüştür. Fakat bu paterne ait hücrelerin bir kısmında görülen kuyruk esas parçada ki PAWP

boyanma şiddetinin bariz bir şekilde arttığı 3-2. boyanma paterninine ait hücrelerin sayısında ve 3-1. boyanma paternine ait hücrelerin de sayısında artış görülmektedir.

Sonuç olarak 5. saat grubunda 3. boyanma paternine ait hücrelerin sayısında artış görülmüş bu artışı oluşturan hücrelerin çoğununda 3-1. boyanma paternine ait hücrelerden oluştuğu gözlenmiştir. Bu gruba ait dikkat çeken bir diğer bulgu ise 2. boyanma paternine ait hücrelerin yüzdesinin NCM grubuna göre artmış, 1. boyanma paternine ait hücrelerin ise yüzdesinin azalmış olmasıdır.

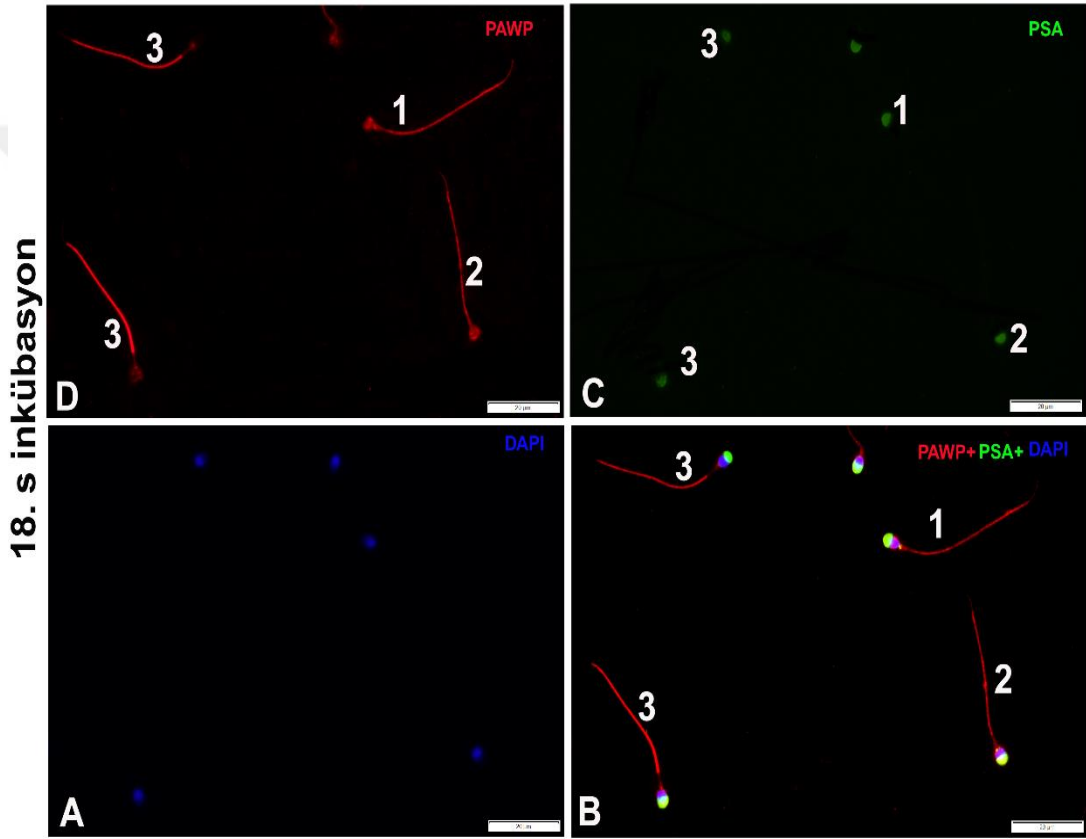
Bu gruba ait her üç donöre ait sperm yayma preparatlarında yapılan sayımlar sonucunda birinci boyanma paternine ait hücrelerin tüm hücrelerin % 79'unu, ikinci paterne ait hücrelerin ise tüm popülasyonun % 16'sını ve de üçüncü paterne ait hücrelerin ise tüm hücrelerin %5'ini oluşturduğu görülmüştür.



Şekil 4.28. Fertil bireylerde 5. saatte PAWP boyanma paterninin immünfloresan yöntemle görüntülenmesi: A: Birinci boyanma paternine göre sperm hücrelerinin baş bölgesinde postakrozomal bölgede çift çizgi halinde PAWP lokalizasyonu görülmüştür (sarı ok). İlk olarak NCM grubunda gördüğümüz, 5. saat grubunda ise görülme yüzdesinin arttığı 3-2. boyanma paterninde hücrelerin postakrozomal bölgesinde çift çizgi halinde görülen PAWP lokalizasyonunun kaybolmaya başladığı gözlenmiştir (sarı okbaşı). B: PSA boyaması sonucunda 3-2. boyanma paterni gösteren hücrelerde akrozomal bölgede PSA boyanma şiddetinin azalmıştır (sarı yıldız). C: Çekirdek bölgesinin görüntülenmesi D: 3-2. boyanma paterni gösteren hücrelerin kuyruk esas parçasında artmış PAWP boyanması görülürken (pembe ok), birinci boyanma paternine ait sperm hücrelerinin kuyruk orta ve esas parçasında aynı şiddette, kuyruk son parçada ise orta ve esas parçaya göre azalan şiddette PAWP boyanması gözlenmiştir (mavi ok). Bar: 20 µm

PAWP'ın Kapasitasyon Sürecinde 18. Saatte Sperm Hücresindeki Lokalizasyonu

Fertil bireylerden alınan sperm örneklerinde PAWP proteininin kapasitasyon sürecinde 18. saatteki lokalizasyonunu belirleyebilmek için sperm hücreleri CM ile 18 saat inkübe edilmiş, inkübasyonu takiben yapılan sperm yayma preparatlarında PAWP immünoreaktivitesi NCM ve 5. saat grupları ile uyumlu olarak 3 farklı boyanma paterni göstermiştir (n=3).

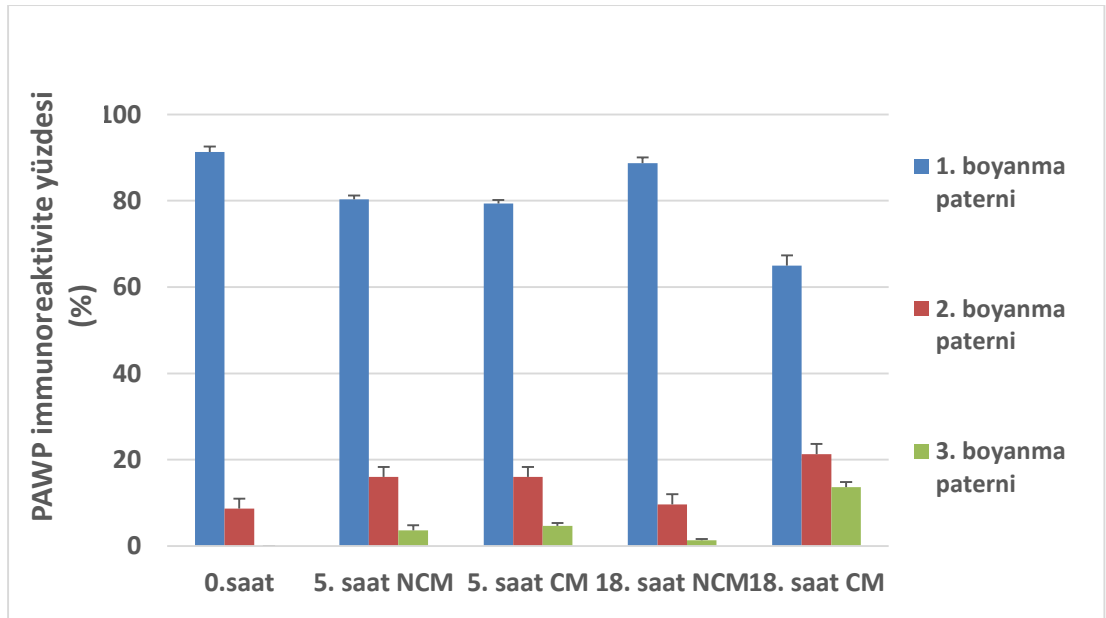


Şekil 4.29. Fertil bireylere ait sperm yayma preparatlarında 18. saatte PAWP boyanma paterninin immünfloresan yöntemle görüntülenmesi: A: Birinci boyanma paternine göre sperm hücrelerinin baş bölgesinde postakrozomal bölgede çift çizgi halinde PAWP lokalizasyonu görülmüştür (sarı ok). İlk olarak NCM grubunda gördüğümüz ve de 5. saat grubunda ise görülme yüzdesinin arttığı 3-2. boyanma paterninde ise hücrelerin başın postakrozomal bölgesinde çift çizgi halinde görülen PAWP lokalizasyonunun kaybolmaya başladığı gözlenmiştir (sarı okbaşı). B: PSA boyaması sonucunda 3-2. boyanma paterni gösteren hücrelerin akrozomal bölgesinde ki PSA boyanma şiddetinin azaldığı gözlenmiştir (sarı yıldız). C: Çekirdek bölgesinin görüntülenmesi D: 3-2. boyanma paterni gösteren hücrelerin kuyruk esas parçasında artmış PAWP boyanması görülürken (pembe ok), birinci boyanma paternine ait sperm hücrelerinin kuyruk orta ve esas parçasında aynı şiddette, kuyruk son parçada ise orta ve esas parçaya göre azalan şiddette PAWP boyanması gözlenmiştir (mavi ok). Bar: 20 µm

5. saat grubuna göre boyanma patern görülme yüzdesinin değiştiği bu grupta birinci boyanma paterni tüm hücreler içerisinde % 65 oranında, ikinci boyanma paterni % 21 oranında üçüncü boyanma paterni ise %14 oranında görülmüştür. Kapasite olduğunu düşündüğümüz üçüncü boyanma paternine ait hücrelerin görülme yüzdesi NCM ve 5. saat grubuna göre artış göstermiştir. Bu bulguya paralel olarak ikinci boyanma paternine ait hücrelerin tüm spermler içindeki yüzdeside NCM ve 5. saat grubuna göre artış göstermiştir.

Tablo 4.12. Fertil bireylere ait sperm yayma preparatlarında 18. saatte görülen üç farklı PAWP boyanma paternlerinin tüm spermler içindeki görülme yüzdesi: 3 farklı fertil bireye ait sperm yayma preparatları incelenmiş, her preparattan 200 hücre olmak üzere toplam 600 hücre sayılmıştır.

(n=3, 600 sperm)	<u>1.Boyanma Paterni</u> Kuyruk (+) Bağlantı parçası (+) Postakrozomal Bölge(+)	<u>2.Boyanma Paterni</u> Kuyruk (+) Bağlantı parçası (+) Postakrozomal Bölge(+)	<u>3.Boyanma Paterni</u> Kuyruk (+) Bağlantı parçası (+) Postakrozomal Bölge(+)
PAWP immunoreaktivitesi (%)	65±2,31	21,33±1,20	13,67±1,20



Şekil 4.30. PAWP proteininin 0. saat, NCM ile inkübasyon sürecinde 5. ve 18. saatlerde, CM ile inkübasyon sürecinde 5. ve 18. saatlerde göstermiş olduğu 1 .2. ve 3. boyanma paternlerine ait görülme yüzdesi: 3 farklı fertil bireye ait sperm hücreleri kullanılmış ve her bireyden 200 hücre sayılmıştır (n=3).

4.1.3.2. PAWP'ın Kapasitasyon Sürecinden Önce ve Kapasitasyon Sürecinde Sperm Hücresindeki Ekspresyonunun Flow Sitometrik Analizi

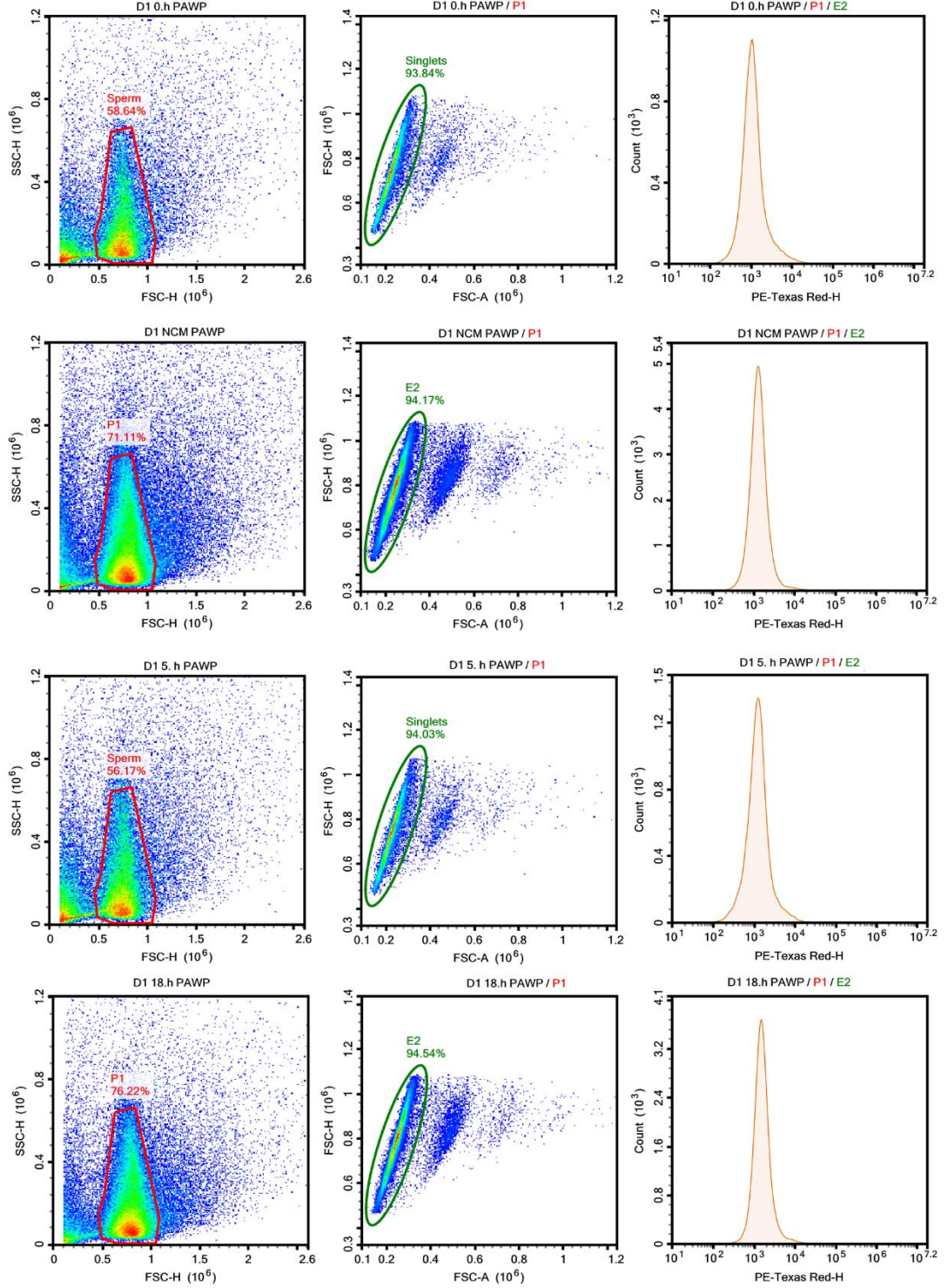
Fertil bireylere ait sperm hücrelerinde PAWP lokalizasyonunun kapasitasyon sürecinden önce 0. saatte, kapasitasyon sürecinde 5. ve 18. saatlerde ve de NCM ile inkübe edilen gruplarda belirlenmesinden sonra bu proteininin sperm hücrelerindeki ekspresyonunu belirlemek amacı ile deneylere flow sitometrik analizler ile devam edilmiştir. Bu aşamada deneylere ayrıca inhibitörler kullanılarak oluşturulan gruplarda eklenmiştir.

Analizler esnasında sperm hücresinin boyutu göz önüne alınarak öncelikle hücre popülasyonumuz seçilmiş, daha sonra ise bu popülasyon içerisinde başka hücrelerle birleşip hatalı ışımaya verecek hücreleri elemek amacıyla akım sitometri cihazı içerisindeki akış kabininden tek tek ışımaya vererek geçen hücreler seçilmiş ve de bu hücrelerin yoğunluğu ölçülmüştür.

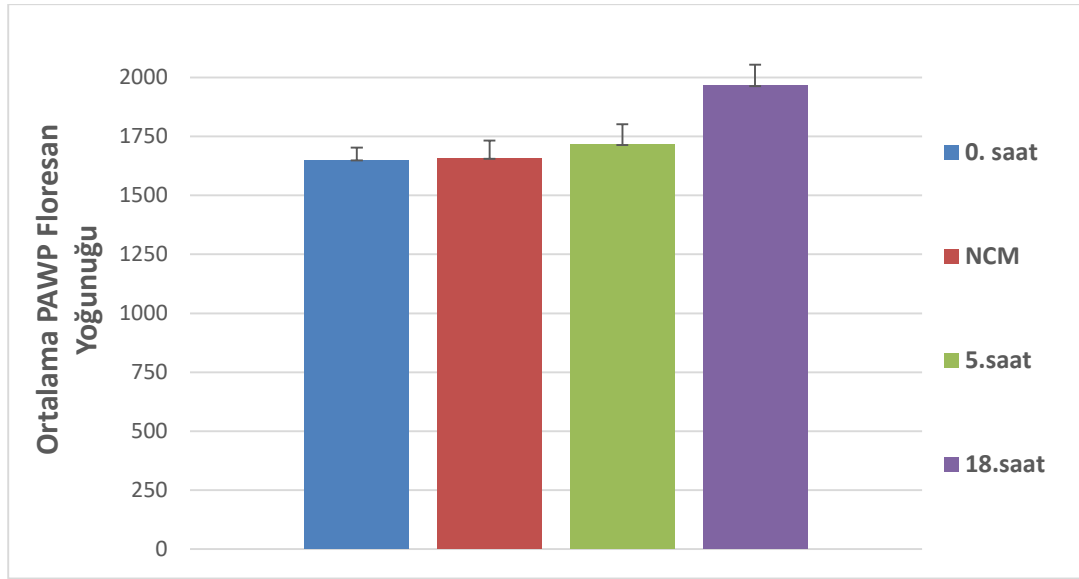
0.saat, 5. saat, 18. saatlerde ve NCM ile İnkübe Edilen Sperm Hücrelerinde PAWP Ekspresyonunun Flow Sitometrik Analizi

Kapasitasyon sürecinde baş kısmının postakrazomal bölgesinde çift çizgi halinde bulunan lokalizasyonunun ve kuyruk orta ve esas parçada ki boyanma şiddetinin değiştiğini belirlediğimiz PAWP proteininin yine kapasitasyon sürecinde ekspresyonlarındaki değişikliği saptayabilmek için yapılan flow sitometrik analizler yapılmıştır. İmmünfloresan sonuçlarla uyumlu olarak 0. saatle NCM arasında anlamlı bir fark bulunmazken, 5. saatte 0. saate göre minimal bir artış, 18. saatte ise 0. saate göre 5. saatle kıyasla daha belirgin bir artış gözlenmiştir (Şekil 4.31).

Akım sitometrisi deneylerinde her grup için üç fertil bireye ait fiks edilmiş sperm hücreleri ile çalışılmıştır ve bu üç bireyin flow sitometri sonuçları Şekil 4.31'de görülmektedir. Sonuç olarak gruplar arasında sadece 0. saat ve 18. saat karşılaştırıldığında istatistiksel olarak bu iki grup arasında anlamlı bir artış görülmüş (0.s. vs. 18.s $p<0,001$) fakat bu artışın kapasitasyon başarısı oranlarına göre immünfloresan sonuçlarla uyumlu olarak anlamlı olmadığı görülmüştür (Şekil 4.32).



Şekil 4.31. Fertil bireylerde kapasitasyon sürecinden önce ve kapasitasyon süreci boyunca PAWP ekspresyonunun gösterilmesi: D1 kodlu fertil bireyden alınan sperm örnekleri ile yapılan flow sitometrik analizler sonucunda belirlediğimiz sperm popülasyonuna ait grafik (solda), bu popülasyonlar içerisinde tek sıra halinde akış kabini içerisinde bulunan hücrelere ait sperm popülasyonuna ait grafik (ortada) ve bu hücrelere ait PAWP ekspresyonuna ait grafik(sağda) görülmektedir.



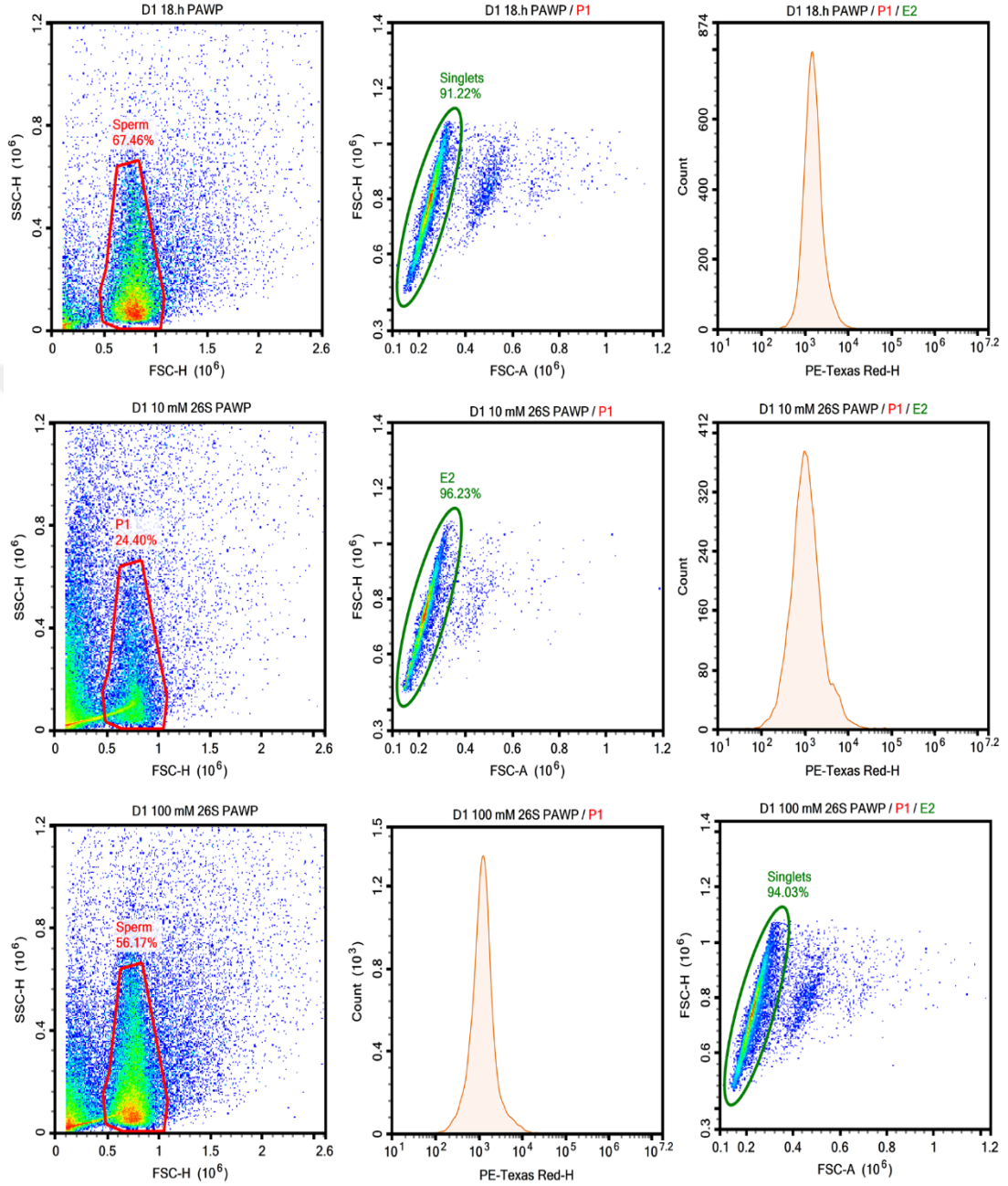
Şekil 4.32. PAWP ekspresyonunun 0. saat, 5. saat, 18. Saat ve NCM gruplarında akım sitometrik yöntemle karşılaştırmalı olarak değeri: Bu proteinin ekspresyonunda 0. saatten 18. saate minimal bir artış görülmüştür. Sadece 18. saatte ise diğer gruplara göre anlamlı bir artış saptanmıştır. Yapılan 3 farklı deneyin ortalama±SEM değerleri olarak verilmiştir (0.s. vs. 18.s $p<0,001$).

Kapasitasyon Medyumu ve 26 S İnhibitörleri ile 18 Saat İnkübe Edilen Sperm Hücrelerinde PAWP Ekspresyonları

Kapasitasyon sürecinde lokalizasyonunun ve ekspresyonunun değiştiğini belirlediğimiz PAWP proteininin ubikütün proteazom sistemi inhibitörlerinin kapasitasyon medyumuna eklenmesi ile yapılan inkübasyon sonucunda PAWP proteininin ekspresyonunda nasıl bir değişiklik olduğu analiz edilmiştir. Bu amaçla üç farklı ubikütün proteazom sistemi inhibitörü kullanılmış ve inhibitörlerin etkisini tam olarak saptayabilmek için farklı konsantrasyonlarda UPS inhibitörleri ile hazırlanan kapasitasyon medyumları ile sperm hücreleri inkübe edilmiştir.

UPS inhibitörleri olarak kullandığımız MG-132, Epoksimisin ve CLBL inhibitörlerinden eşit miktarda kullanarak hazırladığımız karışımın kapasitasyon sürecine olan etkisini saptayabilmek için bu karışımlardan farklı konsantrasyonlarda kullanılarak eklenen kapasitasyon medyumuna ile deneyler yapılmış ve denemeler sonucunda UPS inhibitörlerinin düşük etkili (10 mM) ve güçlü etkili (100 mM) olduğu iki konsantrasyon oranı belirlenmiştir.

Akım sitometrisi deneylerinde her grup için üç fertil bireye ait fıkse edilmiş sperm hücreleri ile çalışılmıştır ve bu üç bireyin flow sitometri sonuçları Şekil 4.33’de görölmektedir.

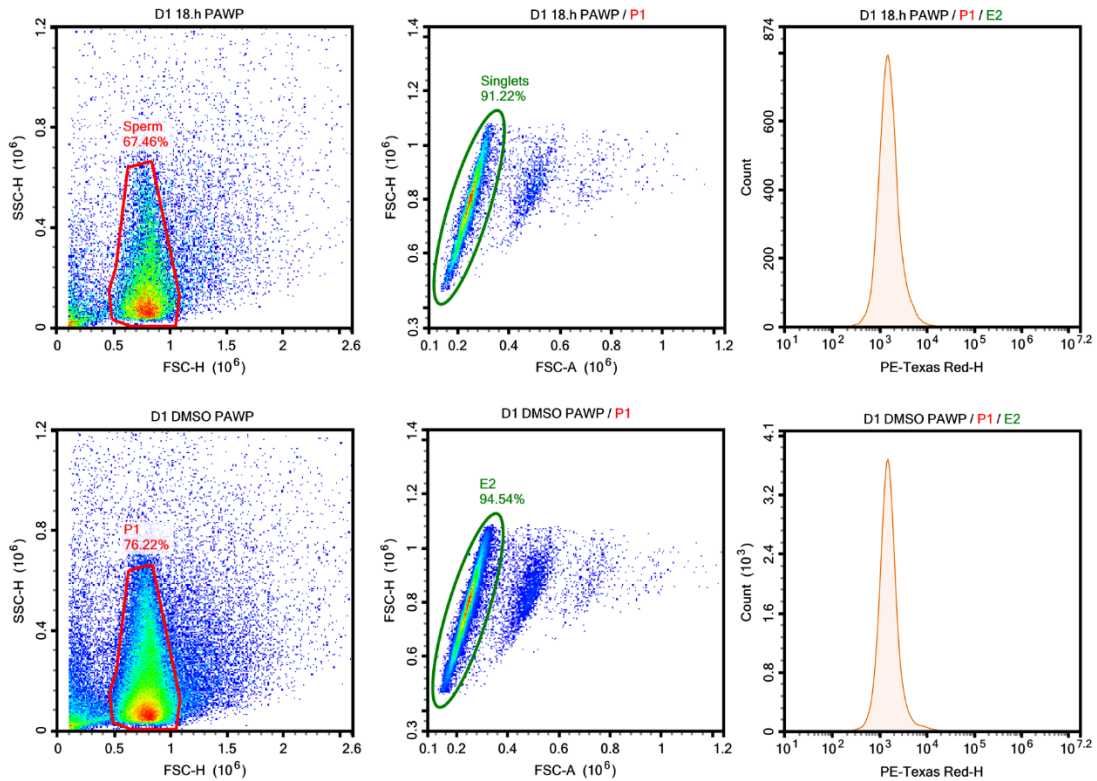


Şekil 4.33. Fertil bireylerde kapasitasyon sürecinde UPS inhibitörlerinin PAWP ekpresyonuna olan etkisinin gösterilmesi: D1 kodlu fertil bireyden alınan sperm örnekleri ile yapılan flow sitometrik analizler sonucunda belirlediğimiz sperm popülasyonuna ait grafik (solda), bu popülasyonlar içerisinde tek sıra halinde akış kabini içerisinde bulunan hücrelere ait sperm popülasyonuna ait grafik (ortada) ve bu hücrelere ait PAWP ekspresyonuna ait grafik (sağda) görölmektedir.

Sonuç olarak 10 mM UPS inhibitörleri konsantrasyonu kullanılarak hazırlanan kapasitasyon medyumunu ile inkübe edilen gruplara göre 100 mM UPS inhibitörleri konsantrasyonu kullanılarak hazırlanan kapasitasyon medyumunu ile inkübe edilen gruplarda PAWP ekspresyonundan elde edilen veriler ile yapılan istatistiksel analizler sonucunda anlamlı bir sonuç elde edilememiştir. (Şekil 4.35).

Kapasitasyon Medyumunu ve DMSO ile 18 Saat İnkübe Edilen Sperm Hücrelerinde PAWP Ekspresyonları

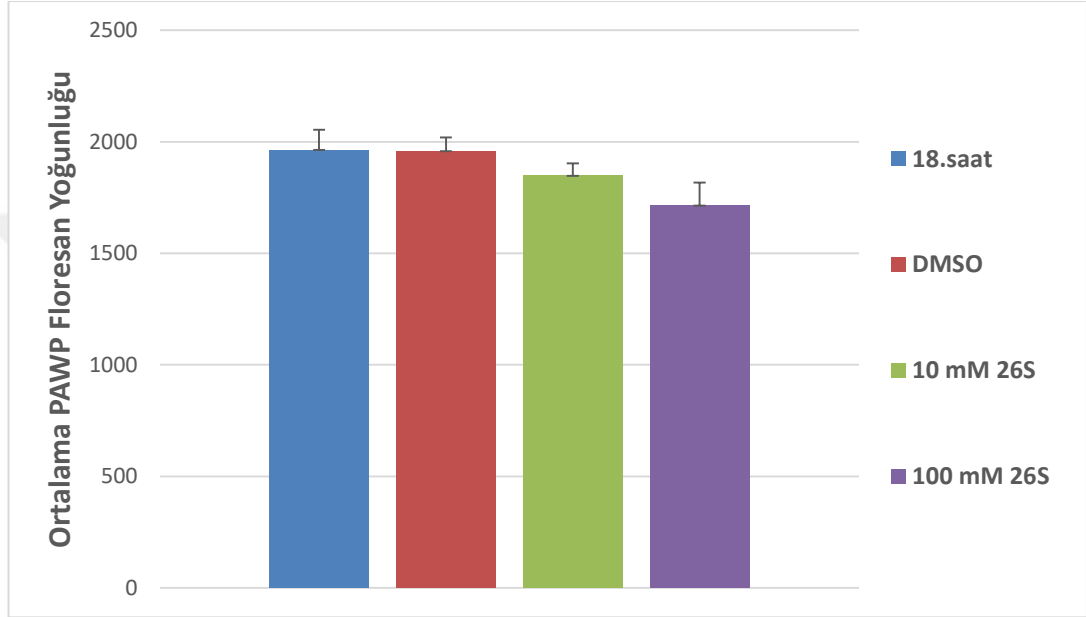
Bu iki gruba ek olarak hem UPS inhibitörlerini çözdürmek için kullandığımız hemde p97/VCP inhibitörünü çözdürmek için kullandığımız DMSO kimyasalının kapasitasyon sürecine olan etkisini araştırabilmek için kapasitasyon medyumuna sadece DMSO eklenerek inkübe edilen sperm hücrelerinde de p97/VCP proteininin ekspresyonundaki değişiklikler flow sitometrik yöntemle incelenmiştir.



Şekil 4.34. Fertil bireylerde kapasitasyon sürecinde DMSO'nun PAWP ekspresyonuna olan etkisinin gösterilmesi: D1 kodlu fertil bireyden alınan sperm örnekleri ile yapılan flow sitometrik analizler sonucunda belirlediğimiz sperm popülasyonuna ait grafik (solda), bu popülasyonlar içerisinde tek sıra halinde akış kabini içerisinde bulunan hücrelere ait sperm popülasyonuna ait grafik (ortada) ve bu hücrelere ait PAWP ekspresyonuna ait grafik (sağda) görülmektedir .

Akım sitometrisi deneylerinde bu grup için üç fertil bireye ait fıkse edilmiş sperm hücreleri ile çalışılmıştır ve bu üç bireyin flow sitometri sonuçları Şekil 4.34’de görülmektedir.

Sonuç olarak DMSO eklenerek hazırlanan kapasitasyon medyumunu ile inkübe edilen gruplarda 18 saat sadece kapasitasyon medyumunu ile inkübe edilen gruba göre PAWP ekspresyonunda anlamlı bir azalma gözlenmemiştir (Şekil 4.35).

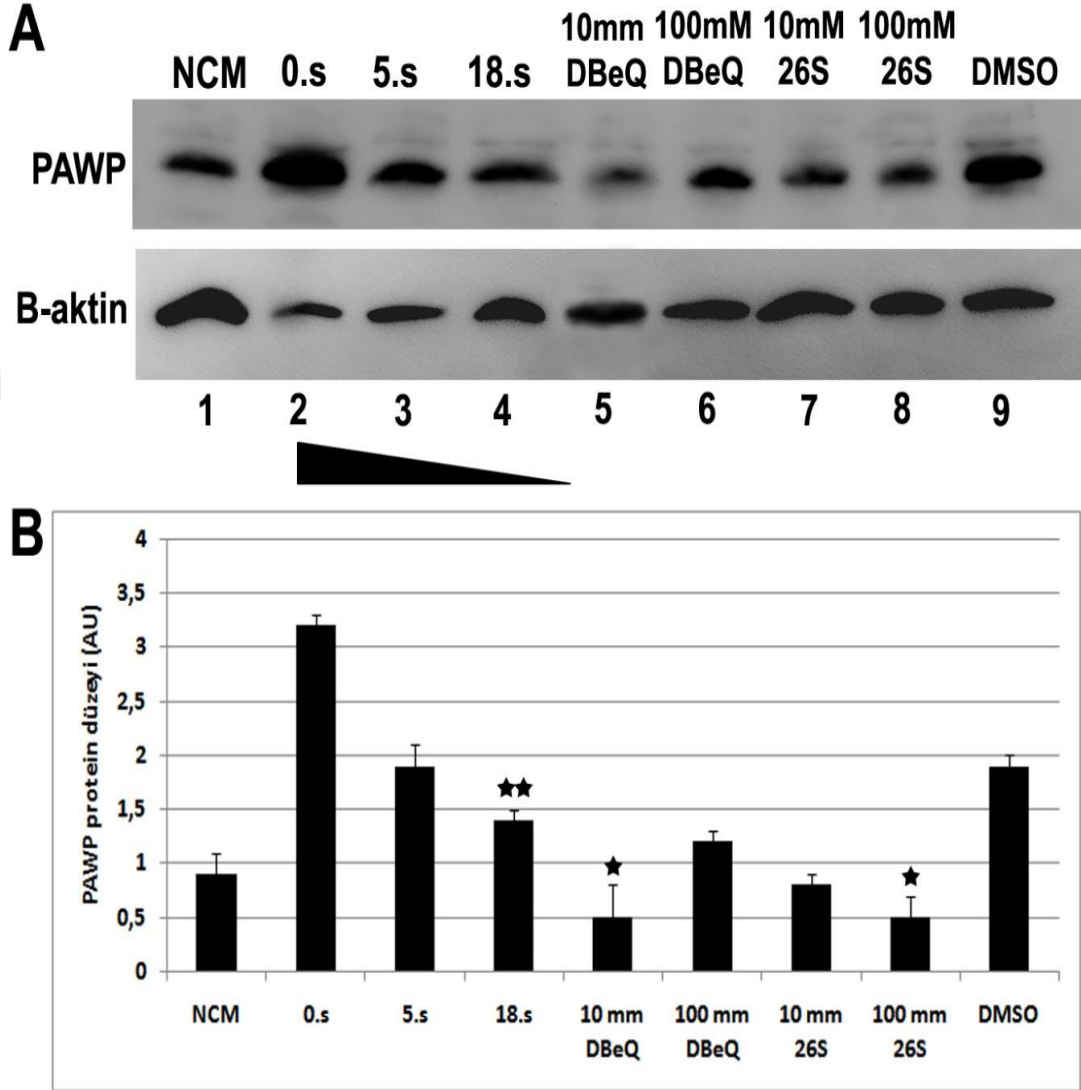


Şekil 4.35. PAWP ekspresyonunun 26S İnhibitörleri ve DMSO eklenen gruplarda 18. Saat grubuna göre akım sitometrik yöntemle karşılaştırmalı olarak değeri: Bu proteinin ekspresyonunda 100 mM 26S inhibitörü eklenen gruplarda saatte diğer gruplara göre anlamlı bir artış saptanmıştır. Sadece DMSO eklenen gruplarda ise 18. saat grubuna göre minimal bir artış görülmüştür. Yapılan 3 farklı deneyin ortalama±SEM değerleri olarak verilmiştir (18.s vs. 100 mM DMSO $p<0,001$).

4.1.1.3. PAWP’ın Kapasitasyon Sürecinden Önce ve Kapasitasyon Sürecinde Sperm Hücresindeki Ekspresyonunun Western Blot Yöntemi ile Analizi

İmmüno floresan ve flow sitometrik analizleri kantitatif olarak desteklemek amacı ile Western blot analizi yapılmıştır. Oluşturulan kapasitasyon deney gruplarına ait ekstraktlar ile yapılan western blot analizi sonucunda elde edilen membranın PAWP antikoru ile muamelesi sonucunda PAWP (32 kDa) proteinine karşılık gelen bantların 0.saatten 18.saate doğru arttığı görülmüştür. En yoğun bant ise 18. saatte gözlenirken, kapasitasyon medyumlarına inhibitör verilen guruplar da özellikle yüksek

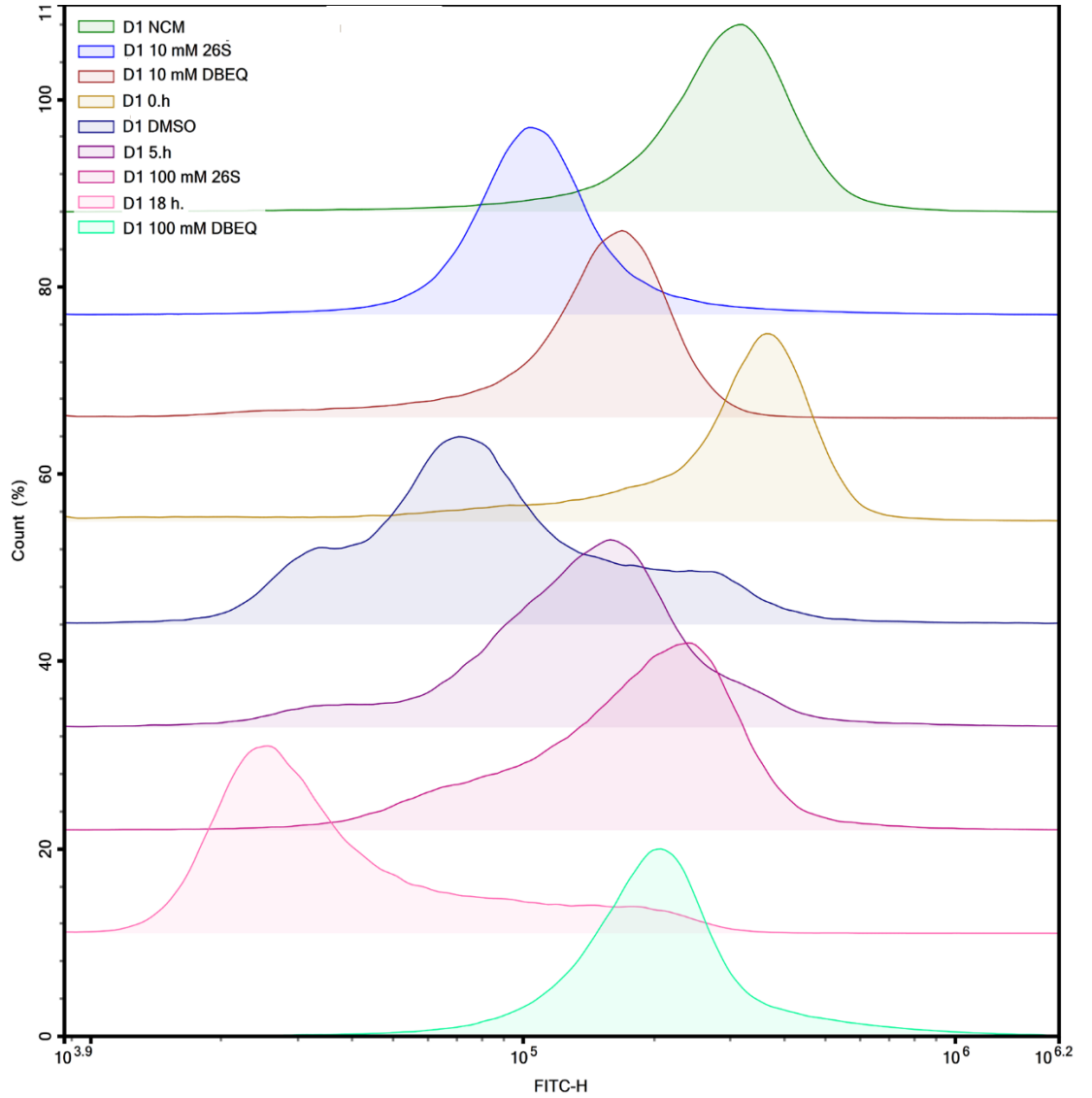
konsantrasyonda (100 mM) inhibitör eklenen gruplarda 18. saate göre daha az yoğunlukta bantlar gözlenmiştir.



Şekil 4.36. İnsan sperminin kapasitasyonuna p97/VCP inhibitörü (DBeQ) ve proteazom inhibitörlerinin (26S) etkisi (A ve B). (A) PAWP protein ekspresyonu NCM (Kapasite etmeyen medyum), 0., 5. ve 18. saatlik kapasitasyon süreleri sonrasında, 18 saatlik DBeQ (10 ve 100 mM) ve 26 S proteazom inhibitörü (10 ve 100 mM) ile inkübasyonu sonrasında ve inhibitörlerin hazırlandığı DMSO ile inkübe edildikten sonra Western blot yöntemi ile değerlendirildi. (B) İmage J programı kullanılarak protein bantları okutulduğunda, PAWP ekspresyonunun 0. Saatten 18. saate doğru azalış gösterdiği (1-4 nolu bantlar), inhibitör uygulaması ile bu ekspresyonun ise 10mM DBeQ ve 100mM 26S proteazom inhibitörü ile daha da azaldığı belirlenmiştir. Fakat 100 mM DBeQ ve 10mM 26S inhibitör uyluması ile anlamlı derecede bir düşüş saptanmamıştır. Yapılan 3 farklı deneyin ortalama±SEM değerleri olarak verilmiş ve istatistiksel olarak anlamlı olanlar 2 ve 1 yıldız ile işaretlenmiştir. Star, star, 0.s vs.18s $p<0,01$; star, 0.s vs.5.s. $p<0,05$; 18s vs 10 mM DBeQ $p<0,05$; 18s. vs. 100mM DBeQ $p<0,05$.

4.1.4. İnsan Sperm Kapasitasyonunda Akrozomal Reaksiyonun PSA ile Belirlenmesi

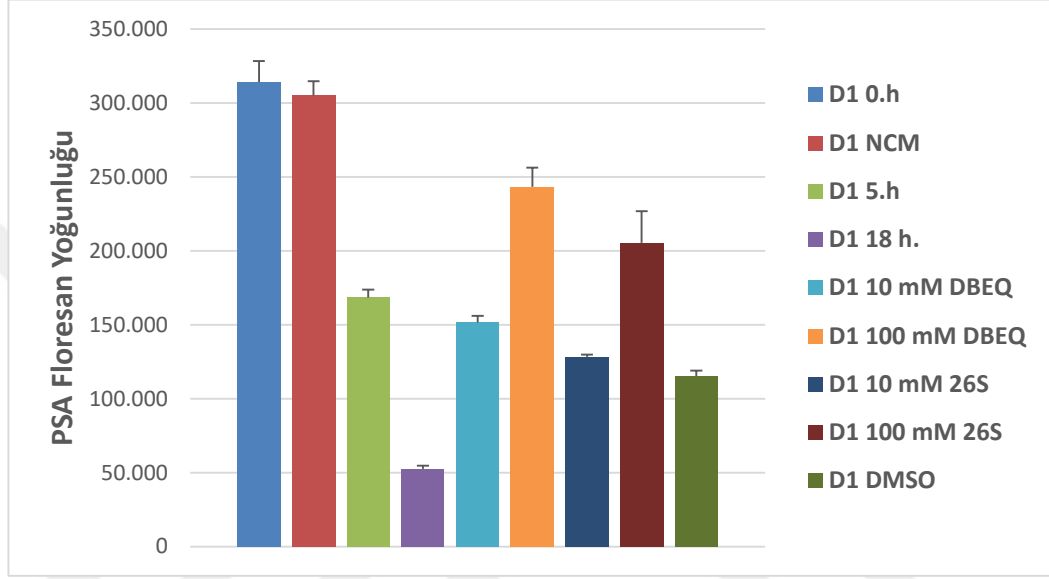
İnsan sperm hücresinin akrozomal bölgesini işaretlemek için kullanılan PSA markerı ile yapılan akım sitometrik deneyler sonucunda, immünfloresan analizlerin sonuçları ile uyumlu olarak PSA ekspresyonunun 0. saatten 18. saate doğru azaldığı görülmüştür. İnhibitör verilen gruplarda ise 18 saat inkübasyon gruplarına göre bir artış gösterdiği gözlenmiştir.



Şekil 4.37. Kapasite edilen ve inhibitör uygulanan deney gruplarında PSA ekspresyonunun gruplar arasında karşılaştırmalı gösterilmesi

Spermilerin kapasitasyon sürecine girmeleri amacı ile yapılan inkübasyon deneylerinde NCM grubu ile birlikte bazı hücrelerin akrozomal bölgesinin

bütünlüğünün bozulmaya başladığı, sınırlarının düzensizlik gösterdiği ve de PSA boyanma şiddetinin azaldığı saptanmıştır. NCM grubu ile görülmeye başlayan bu hücrelerin görülme yüzdesinin 0. saatten 18. saate doğru anlamlı bir şekilde arttığı immünfloresan analizler sonucu ile belirlenmiş ve bu sonuçlar elde edilen akım sitometri deneylerinden elde edilen bulgularımızda immünfloresan sonuçları desteklemiştir.



Şekil 4.38. Kapasite edilen ve inhibitör uygulanan deney gruplarında PSA ekspresyonunun gruplar arasında istatistiksel analizi: PSA ekspresyonunda 0. saatten 18. saate doğru anlamlı bir azalma görülmüş, 18. saat grubu ile karşılaştırıldığında ise inhibitör gruplarında anlamlı bir azalma saptanmıştır (0. s vs 5. s $p < 0,005$; 0. s vs 18. s $p < 0,001$; 18. s vs 10 mM DBEQ $p < 0,005$; 18. s vs 10 mM DBEQ $p < 0,005$; 18. s vs 100 mM DBEQ $p < 0,005$; 18. s vs 100 mM DBEQ $p < 0,001$).

Özellikle in vitro kapasitasyon deneyleri sonucunda insan spermi için ideal inkübasyon süresi olarak belirlediğimiz 18. saat grubunda PSA ekspresyonunun oldukça anlamlı bir şekilde azalması ile kapasitasyon sürecinde akrozomal membranların değişimler geçirerek akrozomal reaksiyona hazırlandığı önemli bir bulgu olarak elde edilmiştir.

Ayrıca kapasitasyon süresi boyunca lokalizasyon ve ekspresyonunun akrozomal bölgede anlamlı bir şekilde değiştiği p97/VCP proteininde, PSA ile elde ettiğimiz bu bulgularla kapasitasyon ve akrozomal reaksiyon arasında bir köprü kurduğu bulgusu güçlü bir şekilde desteklenmiştir.

4.2. Ubikütün Proteazom Sistemi (UPS) Proteinlerinden p97/VCP ve NEDL2 Proteinlerinin Fertil ve İnfertil Bireylere Ait Sperm Hücrelerinde ki Ekspresyonları

Ubikütün Proteazom Sistemi Proteinlerinden p97/VCP, NEDL2 ve PAWP' ın kapasitasyon sürecindeki rolü belirlendikten sonra bu proteinlerin fertil ve infertil bireylerdeki ekspresyon farklılıkları belirlenmiştir. Kapasitasyon deneylerinde çalışılan PAWP molekülü daha öncesinde Dr. Sutovsky laboratuvarında fertil ve infertil bireylerde gösterildiği ve yayın haline getirildiği için tezimin bu aşamasında PAWP değerlendirilmesi fertil ve infertil hasta gruplarındaki çalışmaya dahil edilmemiştir.

Fertil ve İnfertil Bireylerin Semen Parametrelerinin Değerlendirilmesi

Tezimin bu kısmında UPS sistemi ile ilişkili olduğunu düşündüğümüz proteinlerden olan p97/VCP ve NEDL2 proteinlerinin fertil ve infertil bireylerdeki lokalizasyonları ve de ekspresyonları arasında bir fark olup olmadığını tespit etmek amacı ile bu proteinler fertil ve infertil bireylerde karşılaştırmalı olarak çalışılmıştır.

Fertil (n=10) ve infertil (n=10) bireylere ait sperm hücrelerindeki p97/VCP ve NEDL2 proteinlerine ait lokalizasyon immünofloresan yöntemiyle, protein ekspresyonları ise Western blot ve akım sitometrisi yöntemleriyle değerlendirilmiştir. Ayrıca fertil ve infertil bireylerde p97/VCP lokalizasyonu ve ekspresyonu, Prof. Dr. Peter Sutovsky'nin, Missouri Üniversitesi (ABD) Sperm Fizyoloji Laboratuvarında bulunan Görüntülemeli Akım Sitometri yöntemi ile de incelenmiştir.

Fertil (n=10) ve infertil (n=10) bireyler WHO (Dünya Sağlık Örgütü, 2010, Laboratuvar El Kitabı, İnsan semeninin incelenmesi ve işlemlerden geçirilmesi, 5. Baskı, Cambridge Üniversitesi, Cambridge, UK) kriterlerine göre standart semen analizi ve Kruger morfoloji testine tabii tutulmuştur. Cinsel perhiz süresi 2-7 gün arasında olan bireylerden semen örnekleri alınmıştır. Standart semen analizi ile sperm örneğinin hacmi, ejakülatın mililitredeki sperm sayısı, tüm ejakülattaki sperm sayısı, tüm spermilerin hareketlilik yüzdesi, ileri hareketli spermilerin yüzdesi ve likefikasyon süresi gibi kriterlere bakılmıştır ve Tablo 4.13 ve Tablo 4.14' de özetlenmiştir.

Sperm morfolojisi ise Kruger kriterlerine göre bakılmıştır ve her bir sperm hücresi baş, akrozomal bölge, mitokondriyal bölge ve kuyruk bölgesinin morfolojisi açısından değerlendirilmiştir. Kruger morfoloji analizi için her bireye ait sperm yayma preparatları Diff Quik boyama ile boyandıktan sonra 200 hücre morfolojik incelemeye tabii tutulmuştur. Tezimde kullandığım fertil bireylere ait semen analizi ve Kruger test sonuçları tablo 'de ve infertil bireylere ait semen analizi ve Kruger test sonuçları ise tablo 4.15'de verilmiştir.

Öncelikle çalışmaya dahil edilen her bir fertil ve infertil bireye ait semen analiz sonuçları aşağıdaki tablolarda gösterilmektedir. Bu tablolarda fertil ve infertil bireylere ait semen parametrelerine tek tek (Tablo 4.13 ve Tablo 4.14) ve topluca (Tablo 4.15) bakıldığında bu parametrelerin bazılarında fertil ve infertil bireyler arasında istatistiksel olarak farklılıklar gözlenmiştir. Fertil bireylerde, semen hacminin, sperm konsantrasyonunun, sperm hareketliliğinin ve normal morfolojiye sahip sperm yüzdesinin infertil bireylere göre yüksek olduğu saptanmıştır. Fertil bireylerde toplam ejakülatın mililitresinde 58×10^6 olan sperm sayısı infertil bireylerde oldukça düşüş göstermiş olup ortalama $14,5 \times 10^6$ bulunmuştur. Yine bu bulgularla uyumlu olarak fertil bireylerde ortalama %70,3 olan sperm hareketliliği infertil bireylerde %42,6 olarak düşüş göstermiştir. Normal morfolojiye sahip hücrelerin yüzdesi fertil bireylerde %44,6 iken infertil bireylerde %11,2 olarak ciddi bir düşüş göstermiş olup, bazı bireylerde %1, %2 gibi oldukça düşük değerler göstermiştir.

Likefikasyon süresi ve bireylere ait yaş ortalaması ise bu bulgularla negatif korelasyon göstermektedir. Likefikasyon süresi ve yaş ortalaması sonuçlarının ise fertil bireylerde infertil bireylere göre düşük olduğu saptanmıştır.

Tablo 4.13. Fertil bireylere ait standart semen analizi ve Kruger morfoloji sonuçları

	Hacim (ml)	Sperm Sayısı (10 ⁶ x ml)	Toplam Sperm Sayısı (x10 ⁶)	Total Motilite (%)	İleri Hareketli Sperm (%)	Normal Morfoloji (≥4)	Yaş	Likefikasyon Süresi
Fertil 1 (F1)	2	190	380	68,4	63,1	48	42	50 dk.
Fertil 2 (F2)	7	65	455	73,8	69,2	72	30	15 dk.
Fertil 3 (F1)	3	68	204	64,7	61,7	86	36	40 dk.
Fertil 4 (F4)	2,5	30	75	73,30	60	61	29	40 dk.
Fertil 5 (F5)	1,8	70	126	90	87,1	22	32	30 dk.
Fertil 6 (F6)	3	70	210	65,7	60	36	38	20 dk.
Fertil 7 (F7)	6	16	96	75	56,2	28	28	55 dk.
Fertil 8 (F8)	2	40	80	72,5	70	32	40	35 dk.
Fertil 9 (F9)	1,5	20	30	75	60	37	27	45 dk.
Fertil 10 (F10)	4	17	68	45	41	24	22	25 dk.
Fertil (Ortalama)	3,28	58,6	172,4	70,3	62,8	44,6	32,4	35 dk.

Tablo 4.14. İnfertil bireylere ait standart semen analizi ve Kruger morfoloji sonuçları

	Hacim (ml)	Sperm Sayısı (10 ⁶ x ml)	Toplam Sperm Sayısı (x10 ⁶)	Total Motilite (%)	İleri Hareketli Sperm (%)	Normal Morfoloji (≥4)	Yaş	Likefikasyon Süresi
İnfertil 1 (IF1)	3	46	138	60,5	56,5	1	45	40 dk.
İnfertil 2 (IF2)	1	24	48	80	80	3	36	>60 dk.
İnfertil 3 (IF3)	1,8	2	3,6	50	50	1	24	50 dk.
İnfertil 4 (IF4)	5	16	80	68,5	62,5	2	38	40 dk.
İnfertil 5 (IF5)	1,5	5	7,5	60	40	2	37	>60 dk.
İnfertil 6 (IF6)	2,5	8	20	37,5	25	15	32	40 dk.
İnfertil 7 (IF7)	4,5	2	9	50	50	26	35	30 dk.
İnfertil 8 (IF8)	0,75	21	15,75	61,9	57,1	30	39	30 dk.
İnfertil 9 (IF9)	0,5	20	10	15	5	18	41	>60dk.
İnfertil 10 (IF10)	3	1	3	0	0	14	44	>60 dk.
İnfertil (Ortalama)	2,35	14,5	33,5	48,3	42,6	11,2	37	47 dk.

Tablo 4.15. Fertil ve infertil bireylere ait semen parametrelerinin karşılaştırılması. Fertil ve infertil bireylerde semen parametrelerinden yaş ve ejakülat hacmi (Ortalama $\pm$ SEM) haricinde diğer parametrelerde anlamlı düzeyde farklılıklar belirlenmiştir. Bu anlamlılık p değeri ile ifade edilmiş ve $p<0.05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir.

Parametre	İnfertil (n:10)	Fertil (n:10)	P değeri
Yaş (yıl)	37.1 $\pm$ 1.9	32.4 $\pm$ 2	0.1
Konsantrasyon ($\times 10^6$ /ml)	14.5 $\pm$ 4.6	58.2 $\pm$ 16.2	0.007
Motilite (%)	48.3 $\pm$ 7.8	70.3 $\pm$ 3.8	0.02
Total sperm sayısı ($\times 10^6$)	33.5 $\pm$ 13.9	172 $\pm$ 45	0.003
İleri hareketli sperm (%)	42.6 $\pm$ 8	63.83 $\pm$ 3.7	0.03
Morfoloji (%)	6.7 $\pm$ 3.5	28.6 $\pm$ 6.7	= <0,001
Hacim (ml)	2.3 $\pm$ 0.4	3.3 $\pm$ 0.6	0.2

4.2.1. Fertil ve İnfertil Bireylerin Spermlerinde Ubikülin Proteazom Sistemi (UPS) Proteinlerinden p97/VCP' nin Ekspresyonu

p97/VCP proteininin fertil ve infertil bireylerdeki lokalizasyonu immünofloresan yöntemle, ekspresyonu ise Akım Sitometri, Görüntülemeli Akım Sitometri ve Western blot yöntemleri ile incelenmiştir.

4.2.1.1. Fertil ve İnfertil Bireylerin Spermlerinde p97/VCP'nin Lokalizasyonu

p97/VCP'nin fertil ve infertil bireylerin sperm hücrelerindeki lokalizasyonunu karşılaştırmalı olarak incelemek için sperm yayma preparatları indirek immünofloresan yöntemiyle boyanmış floresan mikroskopisi altında incelenmiştir. Öncelikle fertil bireylerden alınan sperm ejakülatlarından yapılan sperm yayma preparatlarında p97/VCP'ye ait primer antikorlar ve floresan işaretli sekonder antikor kullanılarak p97/VCP'nin lokalizasyonuna bakılmıştır.

İmmünofloresan yöntemi uygulanan sperm yayma preparatları incelendiğinde, p97/VCP'nin genel olarak sperm başı, kuyruğu ve bağlantı parçasında lokalize olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.16). Fertil bireylerde immun boyanma göstermeyen sperm

yüzdesi fazla olmasına rağmen, en fazla p97/VCP lokalizasyonunun spermin kuyruk bölgesinde olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4.16. Fertil insan sperminde p97/VCP lokalizasyonu: 10 fertil bireye ait sperm yayma preparatlarında p97/VCP immunlokalizasyonu her preparattan 200 sperm hücresi sayılarak toplamda 2000 spermde değerlendirilmiştir. p97/VCP'nin fertil birey spermelerinde en fazla kuyruk bölgesinde lokalize olduğu saptanmıştır.

p97/VCP immunreaktivitesi (%)	Negatif	Baş	Bağlantı parçası	Kuyruk
Fertil (n=10, 2000 sperm)	55±4,9	15±2,6	10±5,9	20±2,7

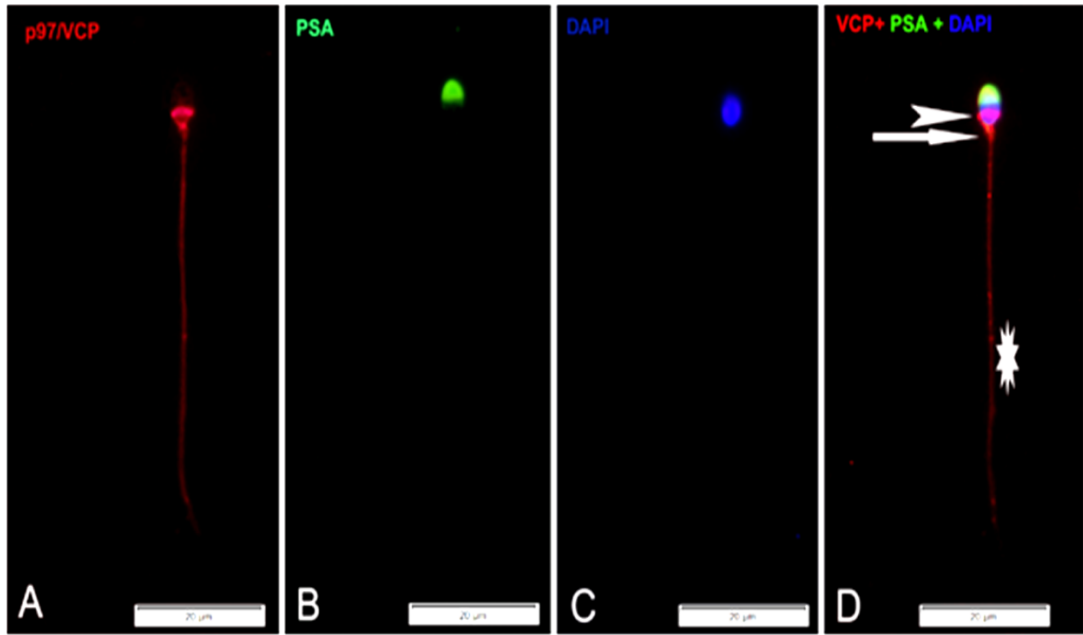
Bu tekli lokalizasyonlara ek olarak, fertil bireylerin sperm hücrelerinde p97/VCP'nin hem baş, hem kuyruk hem de orta parçada birlikte lokalizasyon gösterdikleri üç farklı boyanma şeklinin (paterninin) olduğu görülmüştür. Birinci boyanma paterninde p97/VCP'nin tüm sperm kuyruğu boyunca, bağlantı parçasında ve de başın distal ekvatoryal bölgesinde tek çizgi halinde lokalize olduğu görülmüştür (Şekil 4.39). İkinci boyanma paterninde ise p97/VCP'nin tüm sperm kuyruğu boyunca, bağlantı parçasında ve de distal ekvatoryal bölgede çift çizgi halinde lokalize olduğu izlenmiştir (Şekil 4.40). Üçüncü boyanma paterninde ise p97/VCP'nin sadece tüm sperm kuyruğunda ve bağlantı parçasında lokalize olduğu görülmüştür (Şekil 4.41).

Bu farklı sperm paternlerinin sperm hücreleri arasındaki dağılımını saptayabilmek için 10 fertil bireye ait sperm yayma preparatlarında p97/VCP immunlokalizasyonu her preparattan 200 sperm hücresi sayılarak toplamda 2000 spermde değerlendirilmiştir. Sonuç olarak birinci paternin hücreler arasındaki dağılımı %50, ikinci paternin dağılımı ise % 35 olarak bulunmuştur, üçüncü paternin dağılımı ise % 15 olarak bulunmuştur (Tablo 4.17).

Tablo 4.17. Fertil bireylere ait sperm yayma preparatlarında görülen üç farklı p97/VCP boyanma paternlerinin tüm spermeler içindeki yüzde gösterimi: 10 farklı fertil bireye ait sperm yayma preparatları incelenmiş, her preparattan 200 hücre toplamda 2000 hücre sayılmıştır.

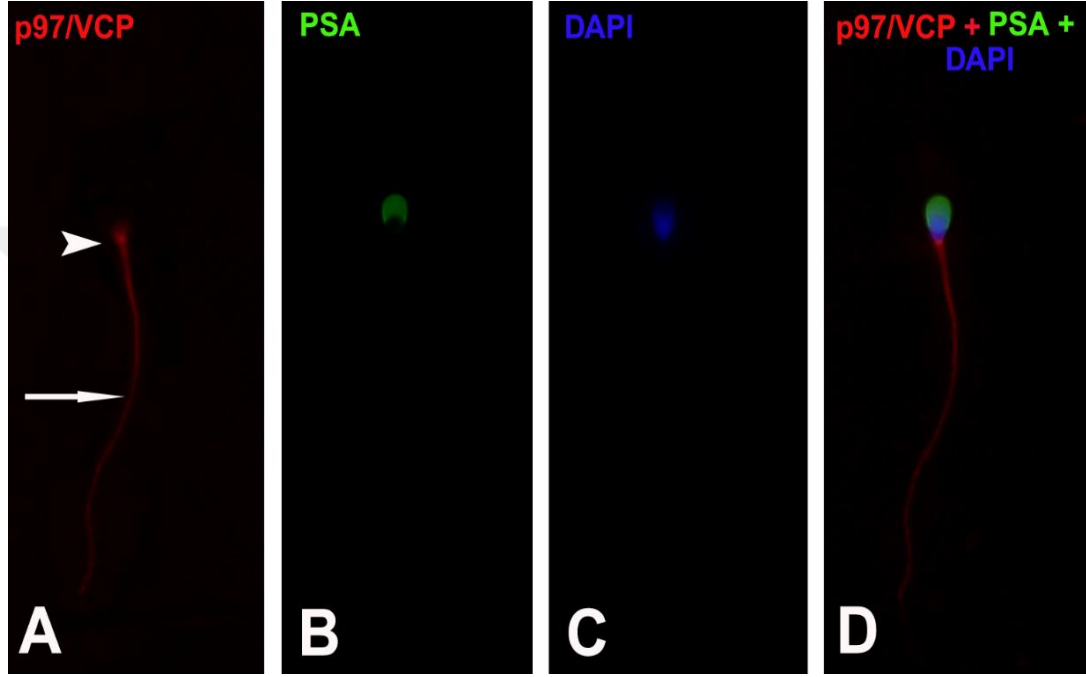
(n=10, 2000 sperm)	1.Boyanma Paterni	2.Boyanma Paterni	3.Boyanma Paterni
p97/VCP Boyanma Paternlerinin Tüm Spermeler içindeki Yüzdesi	50±0,88	35±1,20	15±0,88

Bu boyanma paternlerine sırasıyla ayrıntılı olarak bakarsak, fertil bireylerden alınan sperm hücrelerinde saptanan birinci boyanma paternine göre p97/VCP immunreaktivitesinin tüm sperm kuyruğu boyunca, kuyruktan daha yoğun olarak bağlantı parçasında ve başın distal ekvatoryal bölgesinde belirgin bir şekilde olduğu görülmüştür (Şekil 4.39-A). İmmünofloresan yöntemle p97/VCP lokalizasyonu yanında, sperm hücresinin akrozomal bölgesini görüntüleyebilmek için PSA boyası, baş bölgesi (DNA bölgesini) belirlemek için ise DAPI boyası kullanılmıştır. Akrozomal bölgeyi görüntüleyebilmek için yapılan PSA boyaması sonucunda fertil bireylerde akrozomal bölgenin bütün ve korunmuş bir halde olduğu görülmüştür (Şekil 4.39-B). Yine sperm hücresinin DNA bölgesini görüntüleyebilmek için kullanılan DAPI boyanması sonucunda da fertil bireylerde DNA'nın postakrozomal bölgede normal sperm hücresine ait DNA ile uyumlu morfolojide olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.39-C).



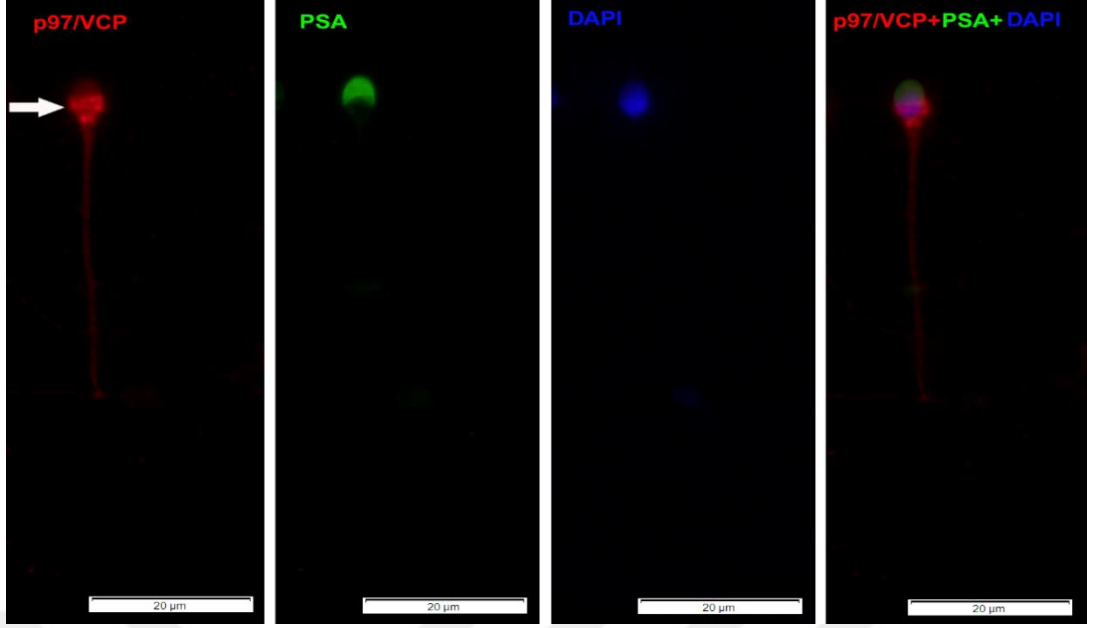
Şekil 4.39. Fertil bireylere ait sperm hücrelerinde görülen birinci boyanma paterninde p97/VCP (A), PSA (B), DAPI (C) ve p97/VCP + PSA + DAPI (D) lokalizasyonları: A: p97/VCP boyanması B: PSA boyaması ile akrozomal bölgenin bütün ve korunmuş bir halde olduğu görülmüştür. C: DAPI boyanmasıyla DNA'nın normal sperm hücresine ait DNA ile uyumlu morfolojide olduğu gözlenmiştir. D: Spermin tüm kuyruğu boyunca (yıldız), kuyruktaki boyanmadan daha yoğun olarak ise bağlantı parçasında (ok) ve distal ekvatoryal bölgede (okbaşı) p97/VCP lokalizasyonu görülmektedir. p97/VCP (Kırmızı), DAPI (Mavi), PSA (Yeşil). Bar:20 µm

Fertil bireylerden alınan sperm hücrelerinde saptanan ikinci boyanma paterninde ise p97/VCP'nin tüm sperm kuyruğu boyunca ve kuyruktan daha yoğun olarak bağlantı parçasında belirgin bir şekilde lokalize olduğu görülmüştür. Baş bölgesinde ise p97/VCP lokalizasyon göstermemiştir (Şekil 4.40-A). Birinci boyanma paterni ile uyumlu olarak ikinci boyanma paterninde de akrozom ve DNA normal morfoloji sergilemiştir.



Şekil 4.40. Fertil bireylere ait sperm hücrelerinde görülen ikinci boyanma paterninde p97/VCP (A), PSA (B), DAPI (C) ve p97/VCP + PSA + DAPI (D) lokalizasyonları: A: p97/VCP boyanması sonucunda spermin tüm kuyruk boyunca (ok), kuyruktaki boyanmadan daha yoğun olarak ise bağlantı parçasında (okbaşı) lokalizasyonu görülmektedir. B: PSA boyanması ile akrozomal bölgenin görüntülenmesi sonucunda akrozomal bölge sınırları düzgün bir yapı sergilemiştir. C: DAPI boyanmasıyla DNA'nın görüntülenmesi. D: p97/VCP, PSA ve DAPI kombinasyonu. p97/VCP (Kırmızı), DAPI (Mavi), PSA (Yeşil). Bar:20 μ m

Üçüncü boyanma paternine ait hücreler de ise p97/VCP'nin tüm sperm kuyruğu boyunca ve kuyruktan daha yoğun olarak bağlantı parçasında belirgin bir şekilde lokalize olduğu görülmüştür. Buna ek olarak baş bölgesinde ise p97/VCP distal ekvatoryal bölgede iki çizgi halinde lokalizasyon göstermiştir (Şekil 4.41-A).



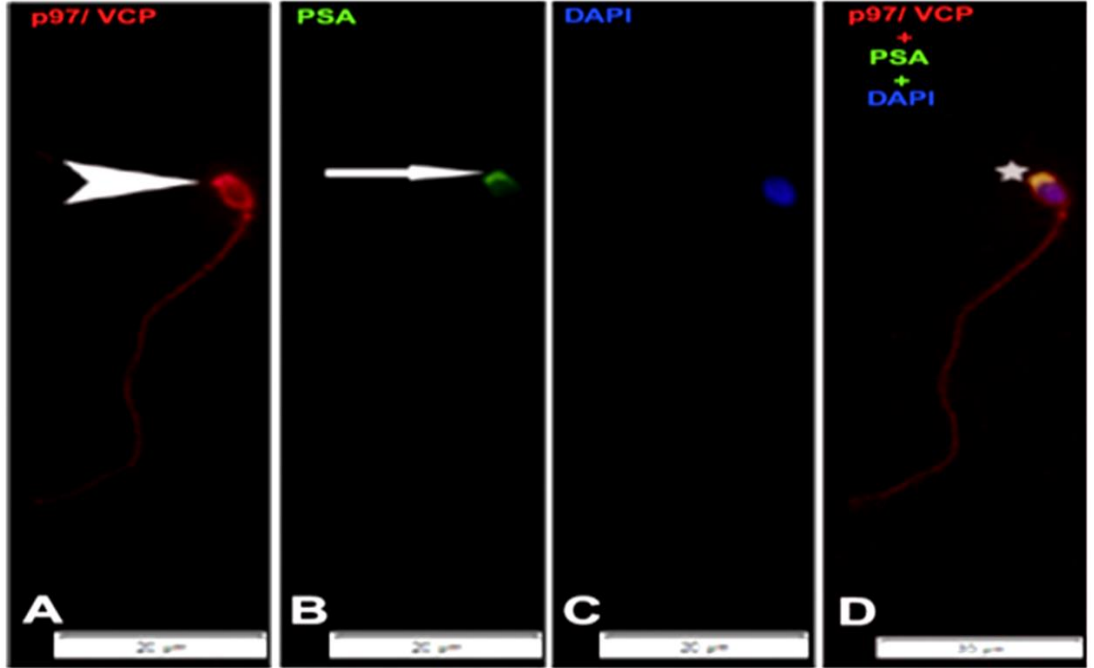
Şekil 4.41. Fertil bireylere ait sperm hücrelerinde görülen üçüncü boyanma paterninde p97/VCP (A), PSA (B), DAPI (C) ve p97/VCP + PSA + DAPI (D) lokalizasyonları: A: p97/VCP boyanması sonucunda spermin tüm kuyruk boyunca (ok), kuyruktaki boyanmadan daha yoğun olarak ise bağlantı parçasında ve de distal ekvatoryal bölgede çift çizgi halinde (ok) lokalize olduğu görülmektedir. B: PSA boyaması ile akrozomal bölgenin görüntülenmesi. C: DAPI boyamasıyla DNA'nın görüntülenmesi. D: p97/VCP, PSA ve DAPI kombinasyonu. p97/VCP (Kırmızı), DAPI (Mavi), PSA (Yeşil). Bar:20 µm

Fertil bireylere ait sperm hücrelerine immünofloresan analizlerini takiben p97/VCP proteininin infertil bireylere ait sperm hücrelerindeki lokalizasyonunu saptamak amacı ile aynı şekilde bu bireylere ait sperm yayma preparatlarında p97/VCP lokalizasyonunu belirlemek için immünofloresan yapılmıştır. İnfertil bireylerde en fazla distal ekvatoryal bölgeye ilave olarak baş bölümünde farklı bölgelerde p97/VCP'nin lokalize olduğu, bunun yanında kuyruk ve bağlantı parçasında da p97/VCP lokalizasyonunun yoğunlaştığı görülmüştür (Tablo 4.18).

Tablo 4.18. İnfertil insan sperminde p97/VCP lokalizasyonu. 10 infertil bireye ait sperm yayma preparatlarında p97/VCP immunlokalizasyonu her preparattan 200 sperm hücresi sayılarak toplamda 2000 spermde değerlendirilmiştir. p97/VCP'nin infertil birey spermlerinde en fazla baş bölgesinde lokalize olduğu saptanmıştır.

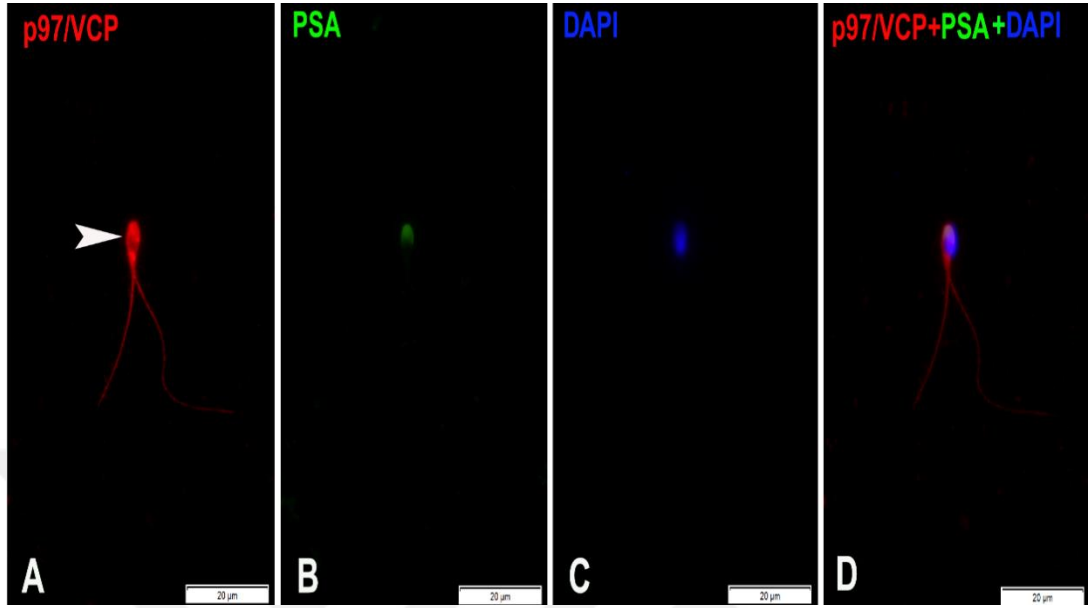
p97/VCP immunreaktivitesi (%)	Negatif	Baş	Bağlantı parçası	Kuyruk
İnfertil (n=10, 2000 sperm)	20±2,4	50±0,88	10±4,7	20±6,2

Üroloji bölümünden infertilite tanısı alan IF1 kodlu bireye (Şekil 4.42) ait sperm yayma preparatlarında sperm hücrelerinin Kruger morfoloji analizi sonucunda % 90'ının amorf baş anomalisine sahip olduğu görülmüştür. Yapılan immüno Floresan çalışmalar sonucunda da bu bireye ait spermilerin çoğunda amorf baş anomali olduğu ve p97/VCP'nin bu bölgelerde immün pozitif olduğu görülmüştür. Şekil 4.42 'de de görüldüğü gibi tüm sperm kuyruğu boyunca p97/VCP immüno Floresan boyanma verirken başın neredeyse tümünde özellikle de başın anterior kısmında yoğun bir şekilde p97/VCP immün reaktivitesi saptanmıştır (Şekil 4.42-A). Yine bu sperm hücresinin PSA boyaması sonucunda akrozomal bölgesinde düzgün bir yapıya sahip olmadığı görülmüştür (Şekil 4.42-B). DAPI boyanması sonucunda da infertil bireylerde DNA'nın postakrozomal bölgede olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.42-C). p97/VCP+PSA+DAPI kombinasyonu sonucunda p97/VCP proteininin akrozomal bölgede PSA boyası ile birlikte kolokalize olduğu ve bu bölgenin sarı renkte ışıma verdiği görülmüştür (Şekil 4.42-D).



Şekil 4.42. Amorf baş anomali olan sperm hücresinde p97/VCP (A), PSA (B), DAPI (C) ve p97/VCP + PSA + DAPI (D) lokalizasyonları: A: Spermin baş bölgesinde ise özellikle morfolojik olarak defekt bulunan anterior kısımda (okbaşı) ise bir p97/VCP lokalizasyonu görülmektedir. B: Akrozomal bölgede ki düzensizlik dikkat çekmektedir (ok) D: p97/VCP ve PSA birlikte kolokalize olmuştur (yıldız). p97/VCP (Kırmızı), DAPI (Mavi), PSA (Yeşil). Bar:20 µm

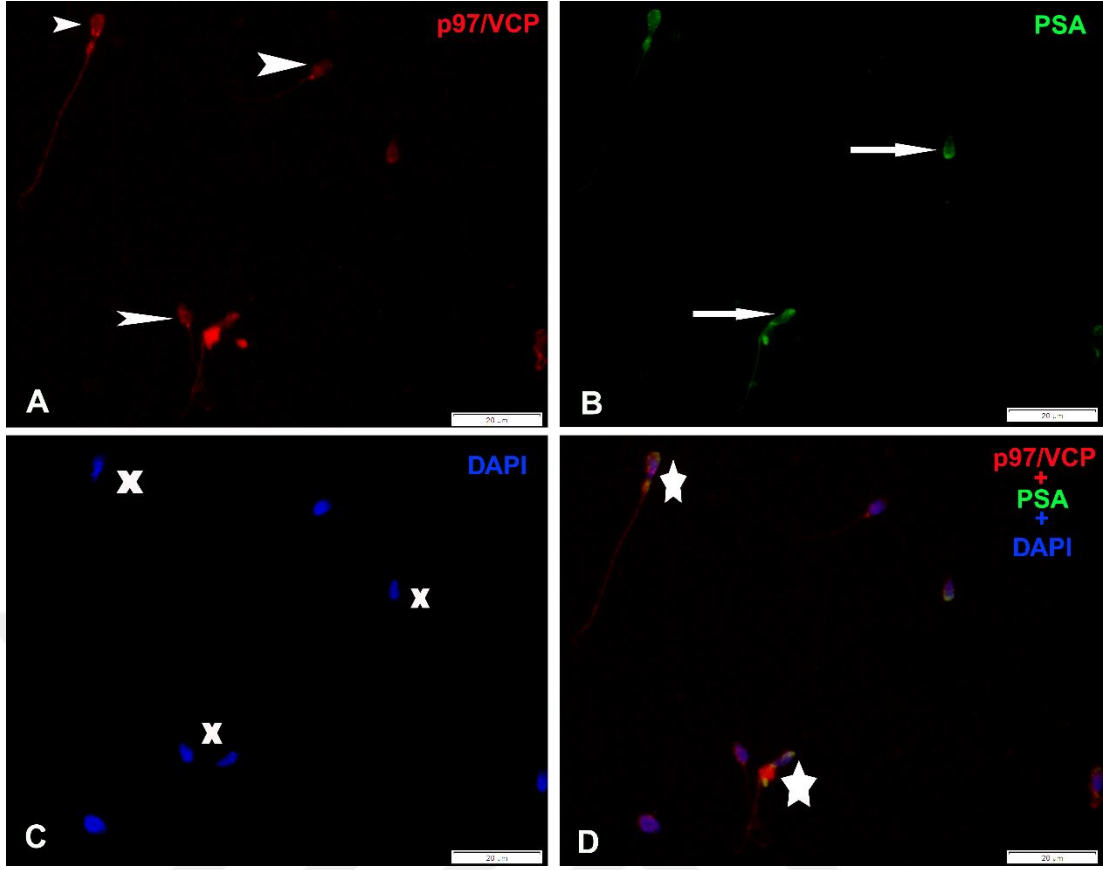
Aynı infertil bireye ait sperm yayma preparatında çift kuyruklu ve küçükbaş morfolojisine sahip spermelerde p97/VCP'nin baş bölgesinde, özellikle anterior



Şekil 4.43. Çift kuyruk anomalisi olan infertil bireye ait sperm hücresinde p97/VCP (A), PSA (B), DAPI (C) ve p97/VCP + PSA + DAPI (D) lokalizasyonları: Çift kuyruk anomalisi olan bu hücrede kuyruk boyunca görülen p97/VCP ekspresyonunun arttığı görülmektedir. Baş bölgesinde ise özellikle anterior kısımda (okbaşı) ise yine belirgin bir p97/VCP lokalizasyonu görülmektedir. p97/VCP (Kırmızı), DAPI (Mavi), PSA (Yeşil). Bar:20 µm

kısımında ekspresyonu izlenmiştir. DAPI boyanması sonucunda da başın normalden daha küçük ve uzamış bir yapıya sahip olduğu görülmektedir (Şekil 4.43-C).

Üroloji bölümünden infertilite tanısı alan IF2 kodlu bireye ait sperm yayma preparatlarında ise yapılan Kruger morfoloji analizi sonucunda sperm hücrelerinin %85'inde akrozomal bölgede morfolojik farklılıklar saptanmıştır. Kruger morfoloji analizi sonuçlarına uyumlu olarak yapılan immünofloresan çalışmaları sonucunda da PSA boyanması ile bu hücrelerin yaklaşık %20'sinde akrozomal bölgenin hiç olmadığı geri kalan 80%'ninde ise akrozomal bölgenin bir bütün olmadığı ve sınırlarının düzgün bir yapıya sahip olmadığı görülmüştür. Bu durum akrozomal bölgedeki çok zayıf PSA boyanması ile de doğrulanmıştır (Şekil 4.44-B). Ayrıca bu bireye ait sperm hücrelerinde DAPI boyanması sonucunda da hücre baş yapılarının normal boyutundan daha büyük ve düzensiz morfoloji sergiledikleri saptanmıştır (Şekil 4.44-C).

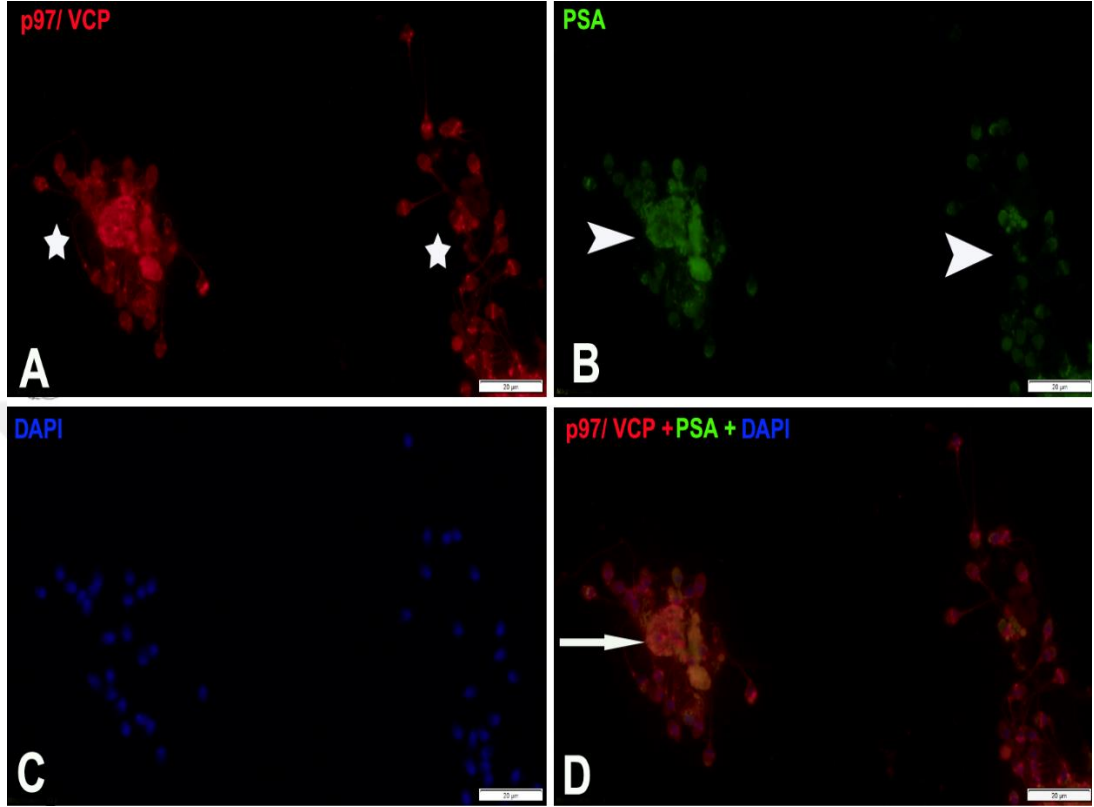


Şekil 4.44. İnfertil bireye ait akrozomal anomalisi olan sperm hücresinde p97/VCP (A), PSA (B), DAPI (C) ve p97/VCP + PSA + DAPI (D) lokalizasyonları: A: Morfolojik olarak bozuk yerlerde özellikle akrozomal anomalinin bulunduğu yerlerde p97/VCP lokalizasyonu dikkat çekmektedir (okbaşı). B: PSA boyaması ile morfolojik olarak bozuk olduğu görülen akrozomal bölge oldukça zayıf bir sinyal vermiştir (ok). C: DAPI boyaması sonucunda hücrelerin bozuk morfolojiye sahip DNA içerdikleri görülmektedir (x). D: Akrozomal anomalinin olduğu yerlerde PSA ve p97/VCP kolokalizasyon göstermiştir (yıldız). p97/VCP (Kırmızı), PSA (Yeşil), DAPI (Mavi). Bar:20 µm

Yine bu bireye ait sperm hücrelerinde p97/VCP tüm sperm kuyruğu boyunca ve de baş kısmının büyük bir bölümünde lokalize olmuştur (Şekil 4.44-A). Bazı hücrelerde mitokondriyal bölgedeki yoğun p97/VCP tutulumu da dikkat çekmektedir. Akrozomal anomalisi olan bu bireyin sperm hücrelerinin akrozomal bölgesinde p97/VCP lokalizasyonu dikkat çekmektedir. Bu bölgelerde PSA ve p97/VCP kolokalize olarak sarı renkli ışıma vermişlerdir (Şekil 4.44-D).

İnfertilite tanısı almış bir diğer birey olan IF3 kodlu donorün sperm yayma preparatlarında ise sperm hücreleri arasında yoğun bir şekilde aglütinasyon gözlenmiştir. Bu hücrelerde p97/VCP'nin normal sperm hücrelerinde tüm sperm kuyruğunda ve de daha yoğun olarak bağlantı parçası ve de başın distal ekvatoryal bölgesinde olduğu saptanmıştır (Şekil 4.45-A). Yine bu hücrelerin büyük bir

çoğunluğunda akrozomal bölge normal hücelere göre daha geniş bir alanda PSA ışıması vermiş ve de akrozomal yapının sınırları düzgün, bütün bir halde olmadığı görülmüştür.

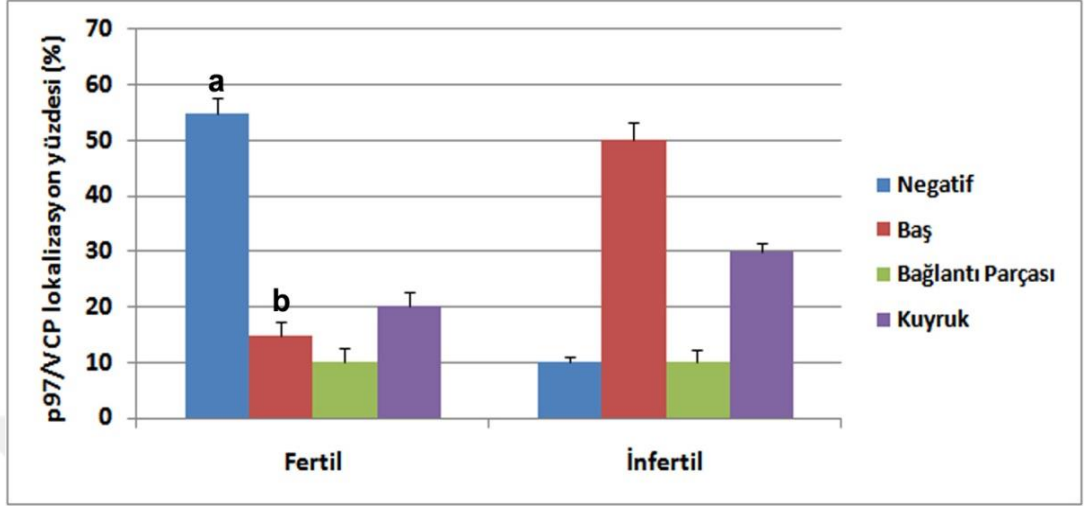


Şekil 4.45. İnfertil bireyin aglütinasyon gösteren sperm hücelerinde p97/VCP (A), PSA (B), DAPI (C) ve p97/VCP + PSA + DAPI (D) lokalizasyonları: A:Yoğun aglütinasyon gösteren sperm hücelerinin baş kısımlarındaki artmış p97/VCP ekspresyonu dikkat çekmektedir (yıldız). B: Bu hücelerin akrozomal bölgeleri normal hücelere göre daha zayıf bir PSA boyanması vermiştir (okbaşı) C: Morfolojik olarak bozuk bölgelerde p97/VCP kolokalizasyonu dikkat çekmektedir. p97/VCP (Kırmızı), DAPI (Mavi), PSA (Yeşil). Bar:20 µm

p97/VCP ve PSA'nın baş kısmında kolokalizasyon olması da akrozomal bölgede ki anomaliyi doğrulamaktadır. (Şekil 4.45-D).

Fertil ve infertil bireylere ait sperm yayma preparatlarına uygulanan immüno Floresan sonuçlarından elde ettiğimiz özet bulgu Şekil 4.46'da gösterilmektedir. Fertil ve infertil bireylere ait boyanan hücre yüzdeleri karşılaştırıldığında, infertil bireylerde p97/VCP negatif hücre sayısı anlamlı derecede azalmış ve p97/VCP immunreaktivitesinin baş bölgesinde yoğunlaştığı izlenmiştir

(Şekil 4.46). Fertil bireylere ait sperm hücrelerinde ise p97/VCP immunpozitivitesinin kuyruk bölgesinde yoğunlaştığı saptanmıştır.

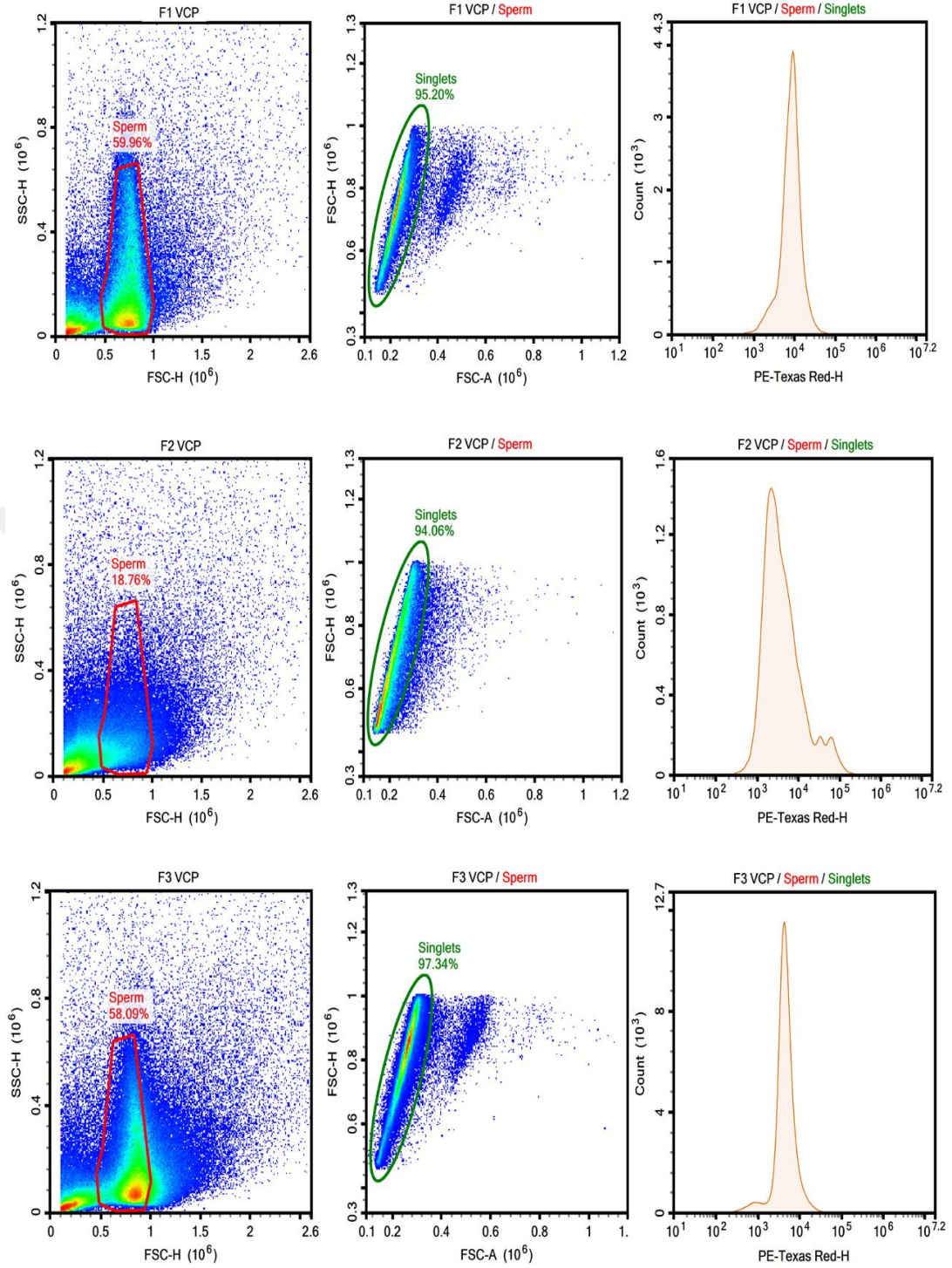


Şekil 4.46. Fertil (n:10) ve infertil (n:10) bireylere ait sperm hücrelerinde p97/VCP immunoreaktivitesinin dağılımı: a ve b: $p < 0.001$ fertil vs infertil.

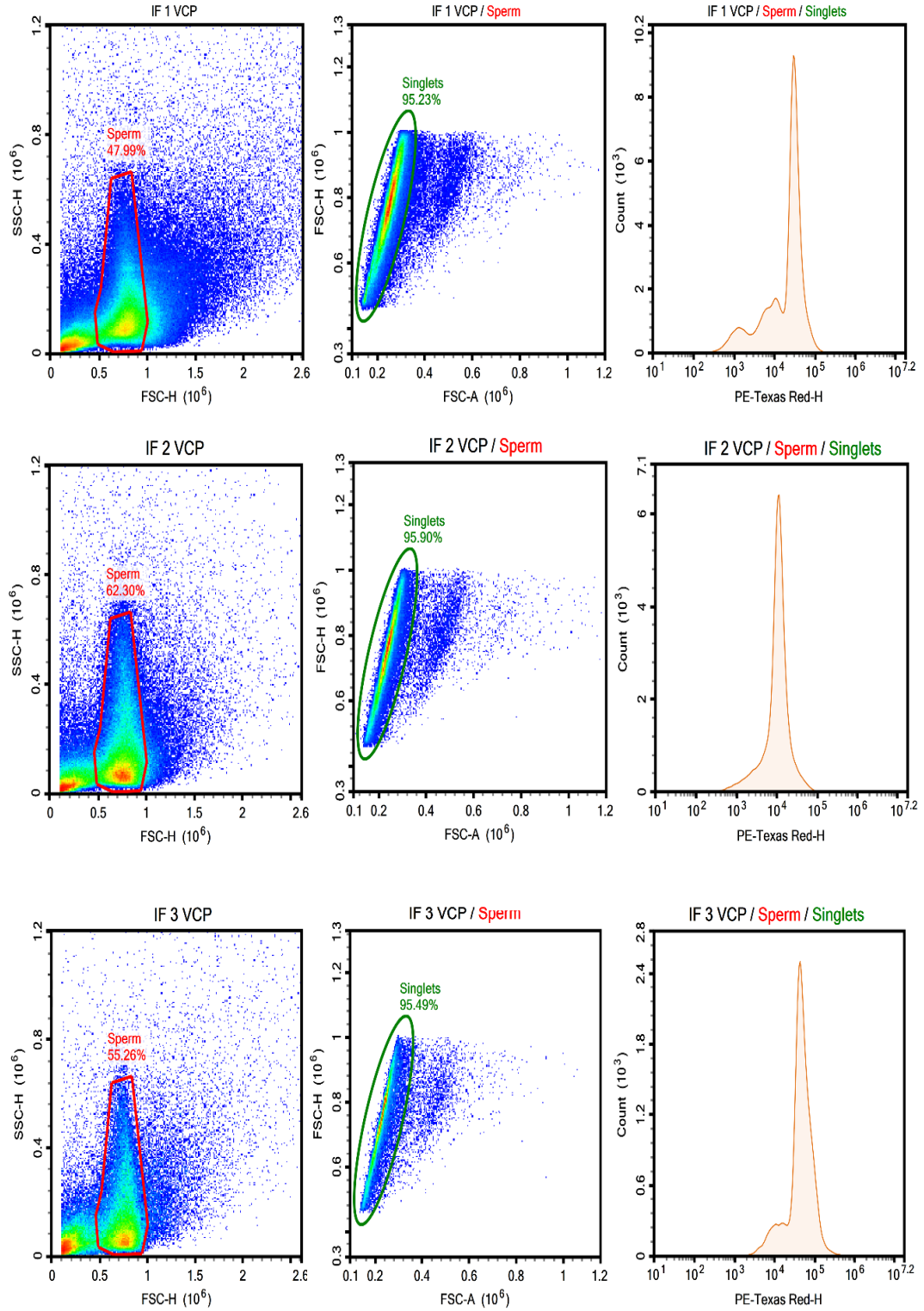
4.2.1.2. Fertil ve İnfertil Bireylerin Spermlerinde p97/VCP Ekspresyonunun Akım Sitometrisi ve Görüntülü Akım Sitometrisi ile Değerlendirilmesi

p97/VCP proteininin fertil ve infertil bireylere ait sperm hücrelerindeki lokalizasyonlarını belirledikten sonra bu proteinin ekspresyon derecesini belirlemek için akım sitometrisi yöntemiyle deneylere devam edilmiştir. Analizler esnasında sperm hücresinin boyutu göz önüne alınarak öncelikle hücre popülasyonumuz seçilmiş, daha sonra ise bu popülasyon içerisinde başka hücrelerle birleşip hatalı ışıma verecek hücreleri elemek amacıyla akım sitometri cihazı içerisindeki akış kabininden tek tek ışıma vererek geçen hücreler seçilmiş ve de bu hücrelerin yoğunluğu ölçülmüştür.

Akım sitometri deneyleri sonucunda yaptığımız analizler sonucunda p97/VCP antikoru ile işaretlenen infertil bireylere ait sperm hücrelerinin fertil bireylere göre daha yoğun bir ekspresyon verdiği görülmüştür. Akım sitometrisi deneylerinde 10 fertil ve 10 infertil bireyle çalışılmış fakat bu bireyden örnek olarak seçtiğimiz üç bireyin akım sitometrisi görüntüleri Şekil 4.47 ve Şekil 4.48’de izlenmektedir.

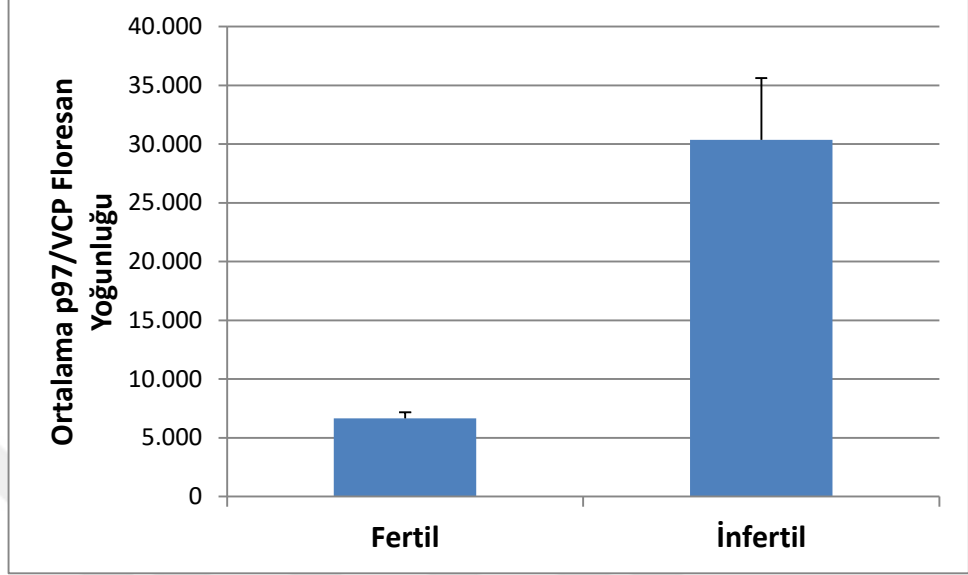


Şekil 4.47. Fertil bireylerde akım sitometrik analizler ile p97/VCP ekpresyonunun gösterilmesi: Üç farklı fertilden alınan sperm örnekleri ile yapılan flow sitometrik analizler sonucunda belirlediğimiz sperm populasyonuna ait grafik (solda), bu populasyonlar içerisinde tek sıra halinde akış kabini içerisinden akan hücrelere ait sperm populasyonuna ait grafik (ortada) ve bu hücrelere ait p97/VCP ekspresyonuna ait grafik(sağda) görülmektedir.



Şekil 4.48. İnfertil bireylerde akım sitometrik analizler ile p97/VCP ekpresyonunun gösterilmesi: Üç farklı infertil bireyden alınan sperm örnekleri ile yapılan flow sitometrik analizler sonucunda belirlediğimiz sperm popülasyonuna ait grafik (solda), bu popülasyonlar içerisinde tek sıra halinde akış kabini içerisinde bulunan hücrelere ait sperm popülasyonuna ait grafik (ortada) ve bu hücrelere ait p97/VCP ekspresyonuna ait grafik(sağda) görülmektedir.

Analizler sonucunda p97/VCP ortalama floresan yoğunluğunun infertil bireylerin (n:10) sperm hücrelerinde fertil bireylerin (n:10) spermeleriyle karşılaştırıldığında anlamlı derecede arttığı görülmüştür (Şekil 4.49).

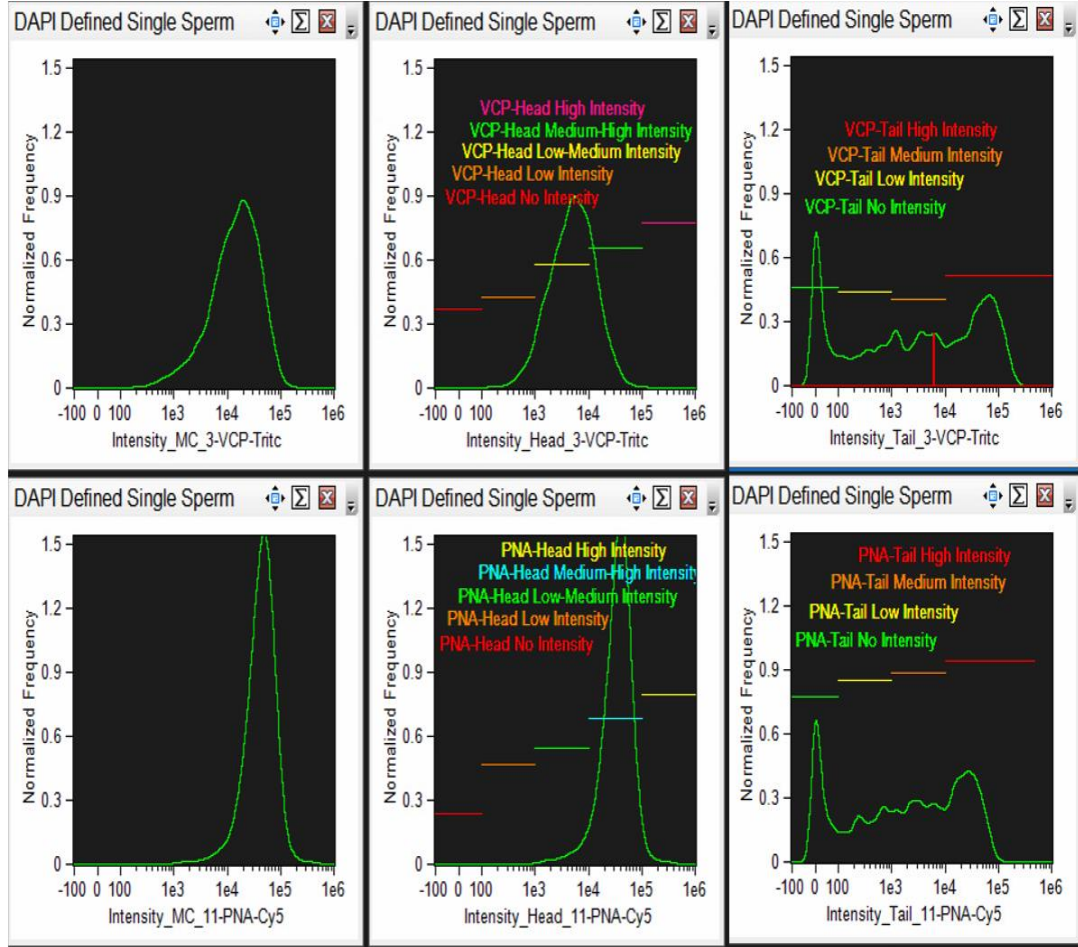


Şekil 4.49. p97/VCP ekspresyonunun fertil ve infertil bireylerde akım sitometrik yöntemle karşılaştırmalı olarak değeri: Bu proteinin ekspresyonunda infertil bireylerde fertil bireylere göre anlamlı bir artış saptanmıştır ($p<0.001$).

Fertil ve infertil bireylerde sperm hücrelerindeki p97/VCP ekspresyonunu ve akrozom boyanmasını (PNA ile) görüntüleyebilmek için Prof. Dr. Peter Sutovsky'nin laboratuvarında görüntülemeli akım sitometri yöntemiyle de bakılmıştır. Görüntülemeli akım sitometri cihazı ile DAPI ile işaretlenmiş sperm hücreleri akış kabininden geçerken hücreler DAPI boyasının verdiği sinyal ile tek tek tanınarak diğer akım sitometri cihazlarından farklı olarak her bir sperm hücresinin görüntüsü alınmıştır. Ayrıca görüntülü akım cihazı geleneksel akım sitometri cihazlarından farklı olarak sperm hücresinin baş ve kuyruk bölgesindeki protein ekspresyonlarını ayrı ayrı tanımlayabilme özelliğine sahiptir.

Missouri Üniversitesi Üreme Tıbbı ve Fertilite Kliniğinde Internal Review Board (MU IRB) protokolüne uygun bir şekilde yeni baba olmuş fertil ve de infertilite tanısı alan bireylerden alınan semen örnekleri toplanmıştır. p97/VCP ile işaretlenen sperm hücrelerinin baş ve kuyruk kısımlarındaki ekspresyonları ayrı ayrı değerlendirilmiştir. (Şekil 4.50). 11052 kodlu fertil donöre ait analizler sonucunda p97/VCP'nin ekspresyonu başta ve kuyrukta ayrı ayrı değerlendirilmiş: 1- Spermin

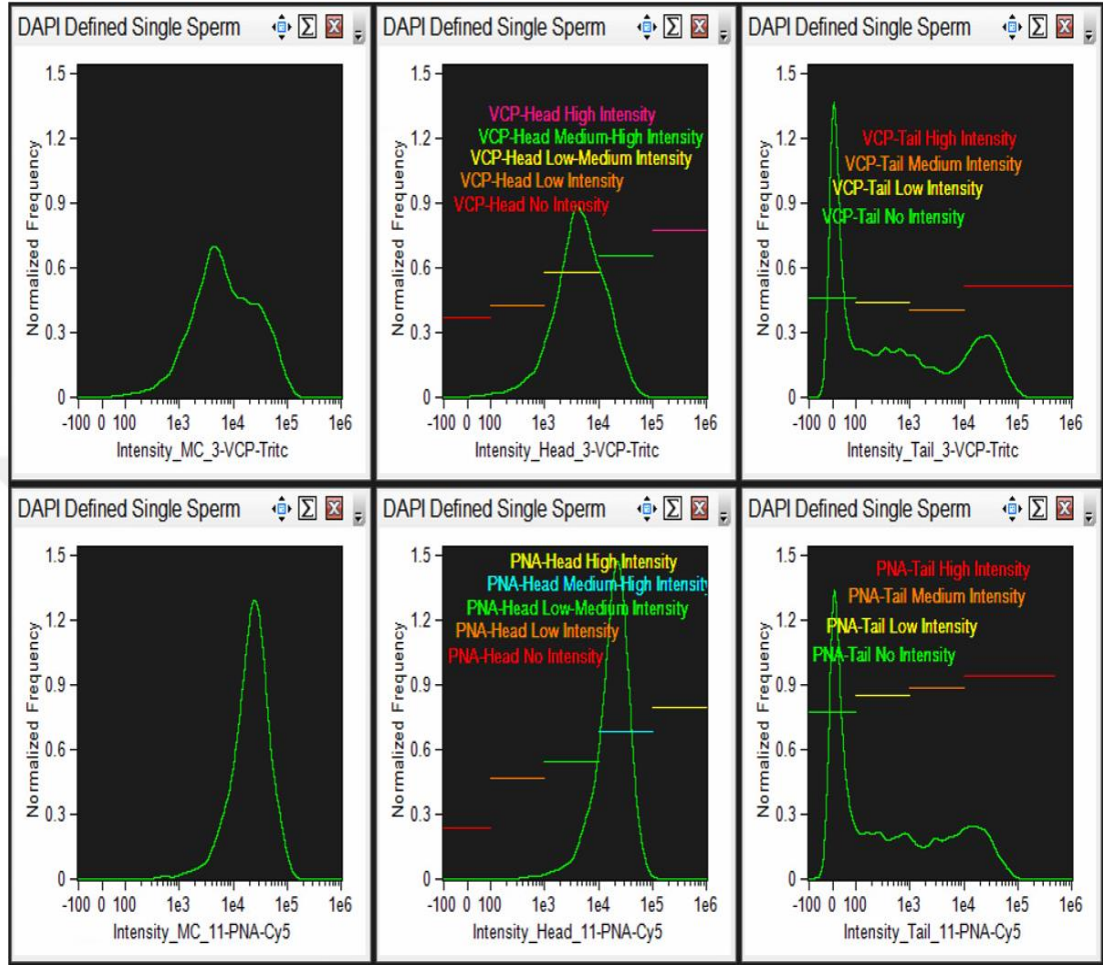
baş kısmında tek populasyon halinde düşük-orta şiddetten orta-yüksek şiddete doğru ekspre olduğu bir populasyon 2-Spermin kuyruk kısmında p97/VCP'nin ekspre olmadığı bir populasyon, düşük şiddetli ekspresyon gösteren bir populasyon, orta şiddetli bir populasyon ve yüksek şiddetli ekspresyon gösteren bir populasyon olmak üzere dört farklı populasyon görülmüştür. PNA ekspresyonunun ise tek bir populasyon halinde başta orta-yüksek şiddette olduğu görülmektedir (Şekil 4.50).



Şekil 4.50. 11052 kodlu fertil bireye ait sperm hücrelerinin baş ve kuyruk bölümlerindeki p97/VCP ve PNA ekspresyonları: Sperm hücrelerinde p97/VCP ekspresyonu başta ve kuyrukta ayrı ayrı değerlendirilmiş ve başta düşük-orta şiddetli bir populasyon, kuyrukta ise p97/VCP boyanmasına ait dört farklı populasyon görülmüştür.

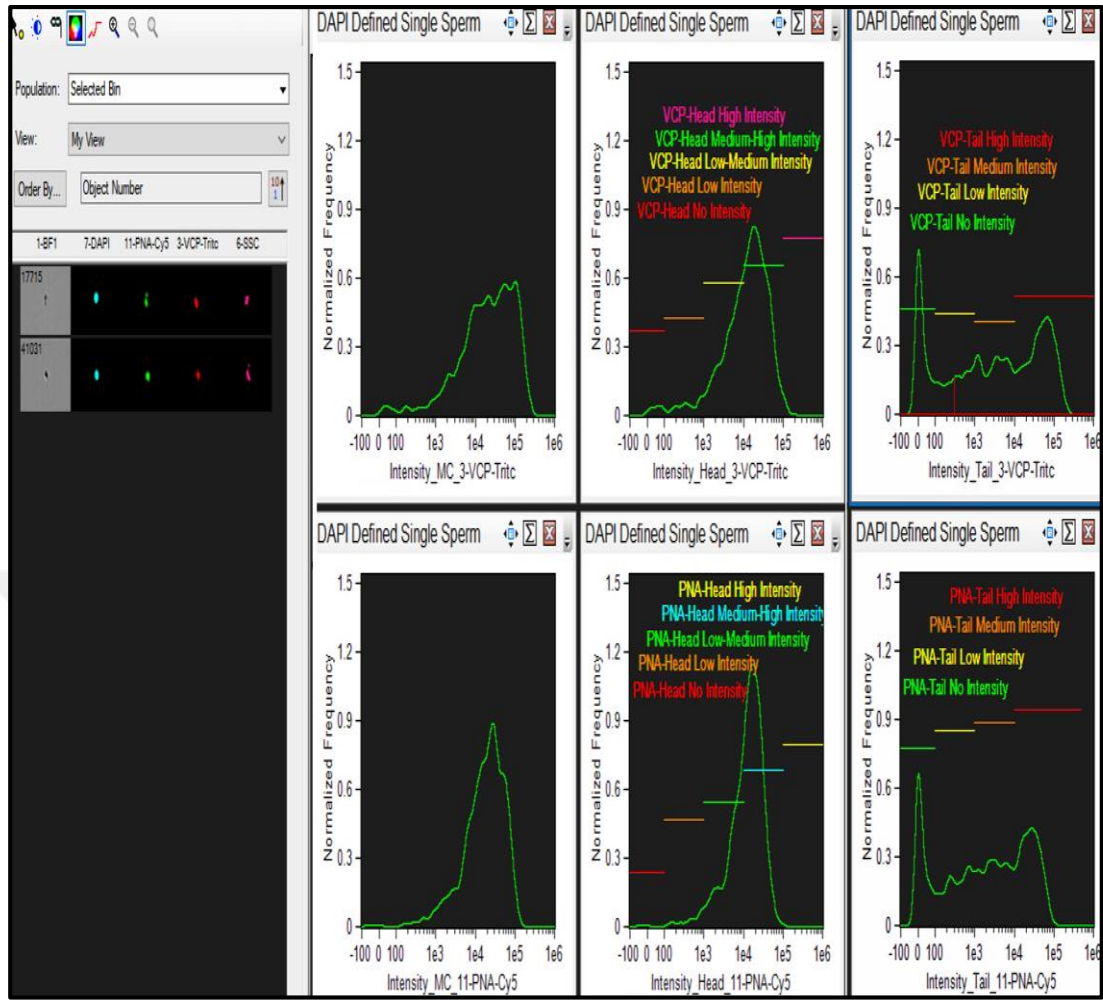
11060 kodlu donöre ait analizler sonucunda p97/VCP'nin spermin baş kısmında tek populasyon halinde düşük-orta şiddette ekspre olduğu, kuyruk kısmında ise p97/VCP ekspresyonunun olmadığı bir populasyon ve de orta-yüksek şiddette ve düşük-orta şiddette olmak üzere 3 farklı populasyonda ekspre olduğu görülmüştür.

PNA ise ekspresyonu ise önceki örnekte olduğu gibi başta tek populasyon göstermiş ve bu populasyonun da orta-yüksek şiddette olduğu görülmektedir (Şekil 4.51).



Şekil 4.51. 11060 kodlu fertil bireye ait sperm hücrelerinin baş ve kuyruk bölümlerindeki p97/VCP ve PNA ekspresyonları: Sperm hücrelerinde p97/VCP ekspresyonu başta ve kuyrukta ayrı ayrı değerlendirilmiş ve başta düşük-orta şiddetli, kuyrukta ise p97/VCP boyanmasına ait üç farklı populasyon görülmüştür.

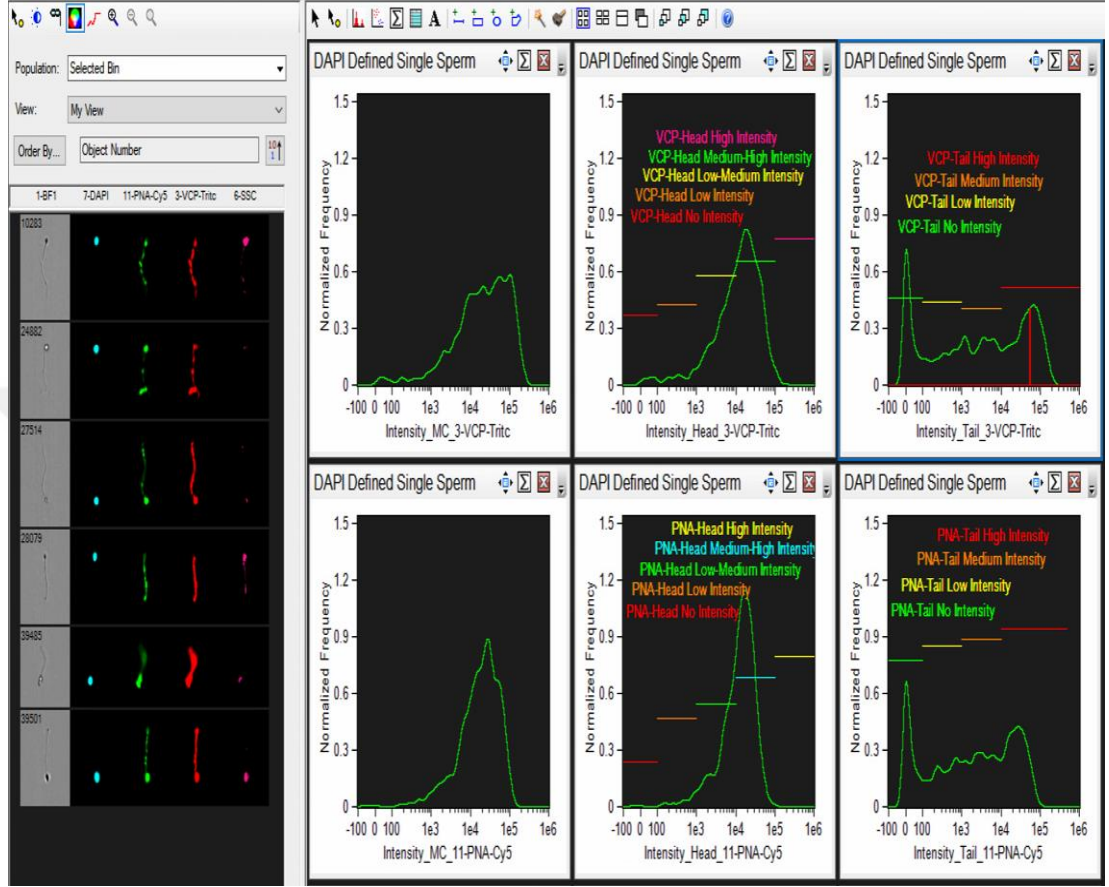
Görüntülemeli akım cihazı ile incelediğimiz bir diğer fertil birey olan 11052 kodlu donöre ait analizler sonucunda p97/VCP'nin spermin baş kısmında düşük-orta şiddetten orta-yüksek şiddete doğru tek populasyonda ekspre olduğu görülmüştür. Kuyruk kısmında ise görüntü alınan 17.715 ve 41.031 nolu hücrelerde olduğu gibi kuyruk boyanmasının olmadığı bir populasyon, düşük şiddetli bir populasyon, orta şiddetli bir populasyon ve de yüksek şiddetli olmak üzere dört farklı populasyon görülmüştür. PNA ekspresyonu ise önceki örnekte olduğu gibi başta tek populasyon göstermiş ve bu populasyonun da orta-yüksek şiddette olduğu görülmektedir (Şekil 4.52).



Şekil 4.52. 11052 kodlu fertil bireye ait sperm hücrelerinin baş ve kuyruk bölümlerindeki p97/VCP ve PNA ekspresyonları: Sperm hücrelerinde p97/VCP ekspresyonu başta ve kuyrukta ayrı ayrı değerlendirilmiş ve başta düşük-orta şiddette ekspre olduğu görülmüştür.

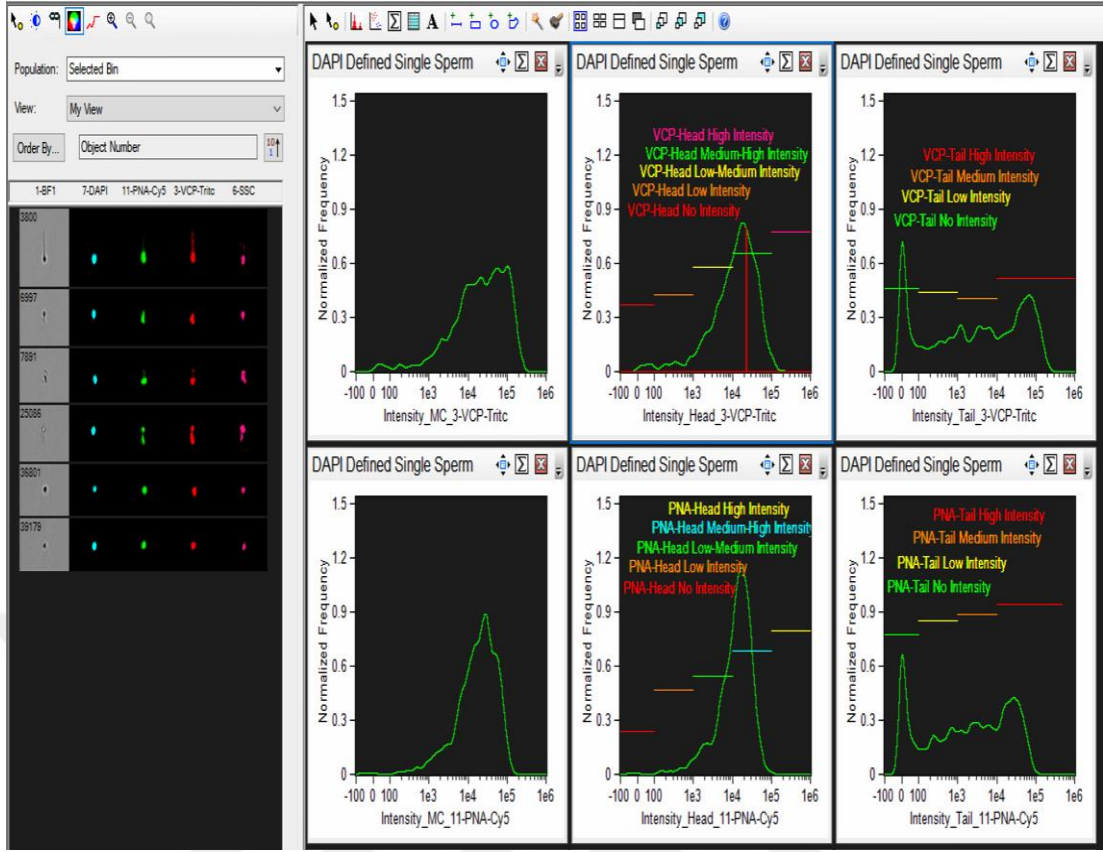
Fertil bireyleri takiben infertil tanısı almış bireylerde de p97/VCP ve PNA ekspresyonlarına görüntülemeli akım sitometri cihazı ile bakılmıştır. İnfertilite tanısı almış 11045 kodlu bireyin baş bölgesinde p97/VCP ekspresyonunun fertil bireylere göre şiddetinin artarak tek populasyon halinde orta-yüksek şiddette ekspre olduğu, kuyrukta ise p97/VCP'nin yine fertil bireylerde görüldüğü gibi farklı hücrelerde farklı şiddetli ekspresyonlar göstererek dört farklı populasyon oluşturduğu görülmektedir. Bu bireyde kuyruktaki p97/VCP ekspresyonu fertil bireylere göre artmış, özellikle kuyruktaki şiddetli p97/VCP ekspresyonu gösteren populasyona ait hücrelerin sayısı fertil bireylere göre artış göstermiştir. Bu bulgumuzu destekleyen bir şekilde akış kabininden geçerken görüntüsü alınan 39.485 nolu hücrede görüldüğü gibi p97/VCP ekspresyonunun kuyrukta çok yoğun bir şekilde ekspre olduğu görülmektedir. PNA

boyasının ise fertil bireylerde sadece orta-yüksek şiddette olan ekspresyonunun bu bireye ait sperm hücrelerinde düşük-orta şiddete doğru kayarak azalma gösterdiği görülmektedir (Şekil 4.53).



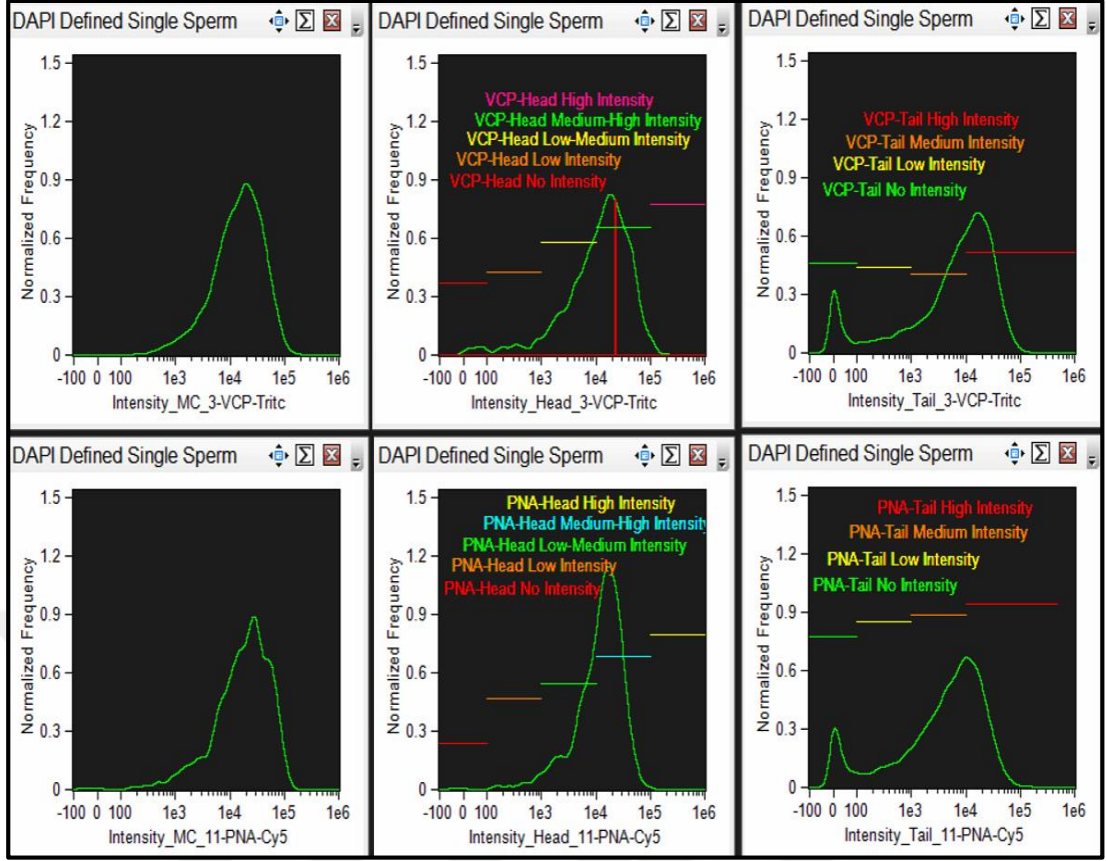
Şekil 4.53. 11045 kodlu infertil bireye ait sperm hücrelerinin baş ve kuyruk bölümlerindeki p97/VCP ve PNA ekspresyonları: Sperm hücrelerinde p97/VCP ekspresyonu başta ve kuyrukta ayrı ayrı değerlendirilmiş ve başta düşük-orta şiddetli, kuyrukta ise orta-yüksek şiddette ekspre olduğu görülmüştür.

İnfertilite tanısı almış 11022 kodlu bireyin baş bölgesinde p97/VCP ekspresyonunun fertil bireylere göre şiddetinin artarak tek populasyon halinde orta-yüksek şiddette ekspre olduğu görülmektedir. Görüntüsü alınan hücrelerde de izlendiği gibi infertil bireylerde p97/VCP özellikle hücrelerin baş kısmında yoğun bir şekilde ekspre olmaktadır. Kuyrukta ise p97/VCP'nin yine fertil bireylerde görüldüğü gibi farklı hücrelerde farklı şiddetli ekspresyonlar göstererek dört farklı populasyon oluşturduğu ve bu populasyonlar içerisinde kuyrukta şiddetli ekspresyon gösteren populasyonun fertil bireylere göre artış gösterdiği görülmektedir (Şekil 4.54).



Şekil 4.54. 11045 kodlu infertil bireye ait sperm hücrelerinin baş ve kuyruk bölümlerindeki p97/VCP ve PNA ekspresyonları: Sperm hücrelerinde p97/VCP ekspresyonu başta ve kuyrukta ayrı ayrı değerlendirilmiş ve başta düşük-orta şiddetli, kuyrukta ise orta-yüksek şiddette ekspre olduğu görülmüştür.

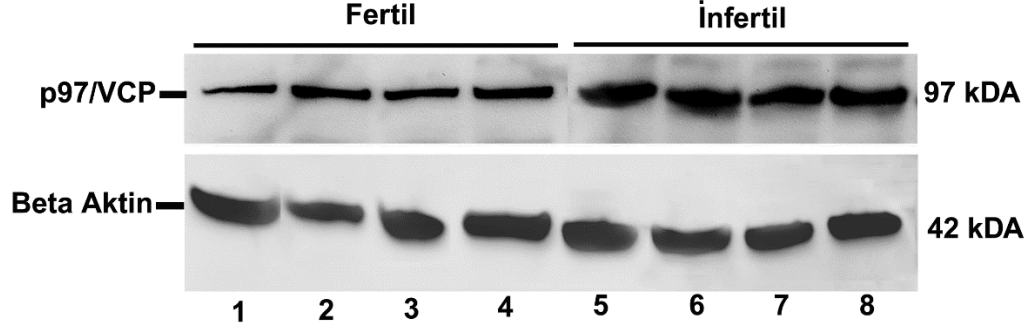
İnfertilite tanısı almış 11018 kodlu bireye ait sperm hücrelerinde de fertil bireylere göre p97/VCP ekspresyonunda artış görülmüştür. Bu bireyde özellikle kuyruk bölgesinde fertil bireylere göre yüksek şiddetli popülasyonda artış görülmüştür. Bu bireyde kuyruk bölgesine ait iki popülasyon görülmüş ve de orta şiddetten yüksek şiddete doğru p97/VCP ekspresyonu gösteren popülasyonda fertil bireylere göre şiddetinin dikkat çekici bir şekilde artarak tek popülasyon halinde ekspre olduğu, kuyrukta boyanma olmayan popülasyonun ise fertil bireylere göre oldukça azalma gösterdiği görülmektedir. Baş bölümündeki p97/VCP ekspresyonunun ise önceki infertil bireylerde olduğu gibi fertil bireylere göre artış göstererek orta-yüksek şiddette ekspresyon gösteren tek popülasyon olarak ifade olmuştur. PNA boyasının ise tek popülasyon halinde olup, şiddetinin ise yüksek-orta şiddetten, orta-düşük şiddete doğru kayma gösterdiği görülmektedir (Şekil 4.55).



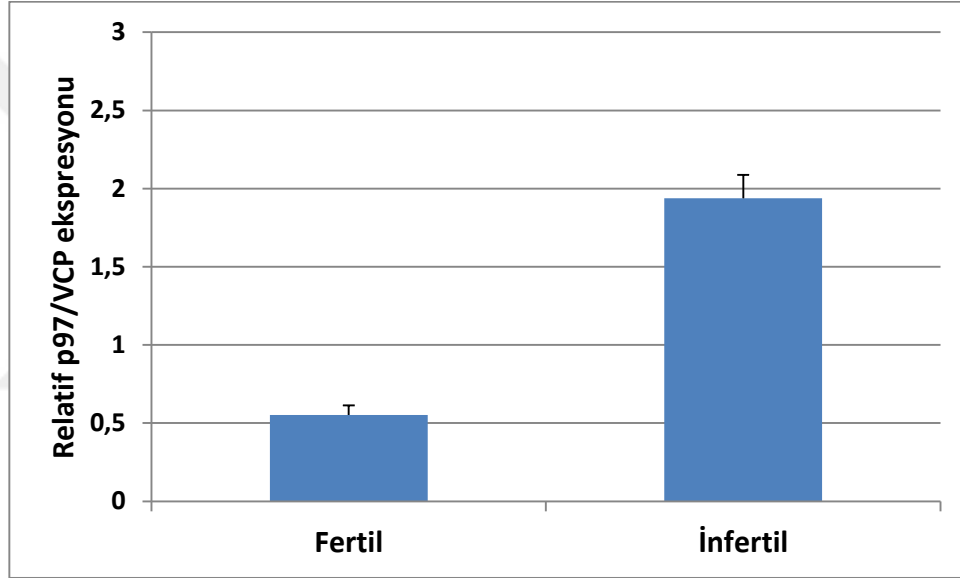
Şekil 4.55. 11018 kodlu infertil bireye ait sperm hücrelerinin baş ve kuyruk bölümlerindeki p97/VCP ve PNA ekspresyonları: Sperm hücrelerinde p97/VCP ekspresyonu başta ve kuyruksa ayrı ayrı değerlendirilmiş ve başta orta-yüksek şiddetli, kuyruksa ise orta-yüksek şiddetle ekspre olduğu görülmüştür.

4.2.1.3. Fertil ve İnfertil Bireylerin Spermlerinde p97/VCP Ekspresyonunun Western Blot ile Değerlendirilmesi

İmmüno Floresan ve akım sitometrik analizlerini desteklemek amacı ile Western blot analizi ile fertil (n:10) ve infertil (n:10) bireylere ait sperm hücresi ekstratlarında p97/VCP'nin ekspresyon derecesini belirlemek amacıyla yapılmıştır. Fertil ve infertil bireylere ait sperm ekstratları jelde yürütülüp, yarı kuru blotlama yöntemiyle membrana aktarıldıktan sonra, nitroselüloz membranının p97/VCP antikoru ile inkubasyonu sonucunda p97/VCP (97 kDa) ve beta aktin (yükleme kontrolü, 42 kDa) proteinine karşılık gelen bantlar görüntülenmiştir (Şekil 4.56).



Şekil 4.56. p97/VCP ekspresyonunun Western blot yöntemi ile gösterilmesi: Fertil (1-4 nolu bandlar) ve infertil (5-8 nolu bandlar) bireylere ait sperm hücre ekstraktlarının Western blot yöntemi sonrası UVP cihazı altında görüntülenmesi (Fertil vs. İnfertil $p<0.001$).



Şekil 4.57. p97/VCP ekspresyonunun fertil (n:10) ve infertil (n:10) bireylerde Western blot analizi ile değerlendirilmesi. P97/VCP'ye ve Beta aktine (yüklem kontrolü) karşılık gelen bandların densiteleri İmage J (NIH) programında okunup, Beta aktin proteine oranlanarak (p97/VCP densitesi/Beta aktin densitesi), relatif p97/VCP densitesi belirlenmiştir. Relatif p97/VCP ekspresyonunun infertil bireylerde fertil bireylere göre anlamlı bir artış gösterdiği saptanmıştır ($p<0.001$).

4.2.2. Fertil ve İnfertil Bireylerin Spermelerinde Ubikülin Proteazom Sistemi (UPS) Proteinlerinden NEDL2 Proteininin Ekspresyonu

NEDL2 proteininin fertil ve infertil bireylerdeki lokalizasyonu immüno Floresan yöntemle, ekspresyonu ise Akım Sitometri, Görüntülemeli Akım Sitometri ve Western blot yöntemleri ile incelenmiştir.

4.2.2.1. Fertil ve İnfertil Bireylerin Spermlerinde NEDL2 Lokalizasyonu

NEDL2'nun fertil ve infertil bireylerin sperm hücrelerindeki lokalizasyonunu karşılaştırmalı olarak incelemek için sperm yayma preparatları indirek immünofloresan yöntemi uygulandıktan sonra floresan mikroskopisi altında incelenmiştir. Bu amaçla öncelikle fertil bireylerden alınan sperm ejakülatlarından yapılan sperm yayma preparatlarında NEDL2'ya ait primer antikorlar ve floresan işaretli sekonder antikor kullanılarak NEDL2'nun lokalizasyonuna bakılmıştır.

İmmünofloresan yöntemi uygulanan sperm yayma preparatları incelendiğinde, NEDL2'nun genel olarak sperm kuyruğunda fakat spermin farklı bölümlerinde farklı şiddetlerde lokalize olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.19). Fertil bireylerde immün boyanma göstermeyen sperm yüzdesi çok düşük olmasına rağmen, en şiddetli NEDL2 lokalizasyonunun spermin kuyruk orta parçasında olduğu belirlenmiştir.

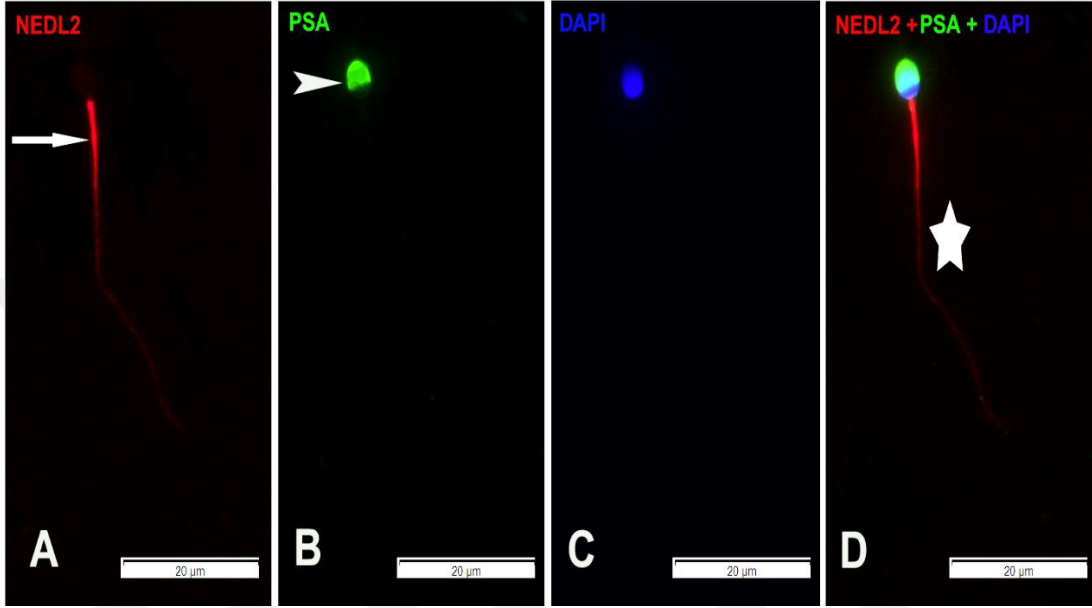
Tablo 4.19. Fertil insan sperminde NEDL2 lokalizasyonu: 10 fertil bireye ait sperm yayma preparatlarında NEDL2 immünlökalizasyonu her preparattan 200 sperm hücresi sayılarak toplamda 2000 spermde değerlendirilmiştir. NEDL2'nun fertil birey spermalarında kuyruk bölgesinde lokalize olduğu saptanmıştır.

NEDL2 immünlöaktivitesi (%)	Negatif	Baş	Bağlantı parçası	Kuyruk
Fertil (n=10, 2000 sperm)	4.9±9.2	0	0	94.8±8.9

Bu tekli lokalizasyonlara ek olarak, fertil bireylerin sperm hücrelerinde NEDL2'nun iki farklı boyanma şeklinin (paterninin) olduğu görülmüştür. Birinci boyanma paterninde NEDL2'nun spermin son parçası hariç tüm sperm kuyruğu boyunca mitokondriyal bölgeden son kısma doğru azalan bir şiddetle lokalize olduğu görülmüştür (Şekil 4.58). İkinci boyanma paterninde ise NEDL2'nun spermin son parçası hariç tüm sperm kuyruğu boyunca aynı şiddetle lokalize olduğu görülmüştür (Şekil 4.59).

Bu farklı sperm paternlerinin sperm hücreleri arasındaki dağılımını saptayabilmek için 10 fertil bireye ait sperm yayma preparatlarında NEDL2 immünlökalizasyonu her preparattan 200 sperm hücresi sayılarak toplamda 2000 spermde değerlendirilmiştir. Sonuç olarak birinci paternin hücreler arasındaki dağılımı % 91, ikinci paternin dağılımı ise % 9 olarak bulunmuştur (Tablo 4.19).

Bu boyanma paternlerine sırasıyla ayrıntılı olarak bakarsak, fertil bireylerden alınan sperm hücrelerinde saptanan birinci boyanma paternine göre NEDL2 sperm hücresinin baş ve bağlantı parçasında lokalizasyon göstermeyip, spermin son parçası hariç tüm sperm kuyruğu boyunca lokalize olmuştur ve mitokondriyal bölgeden son kısma doğru da ekspresyonunun azaldığı dikkati çekmektedir.



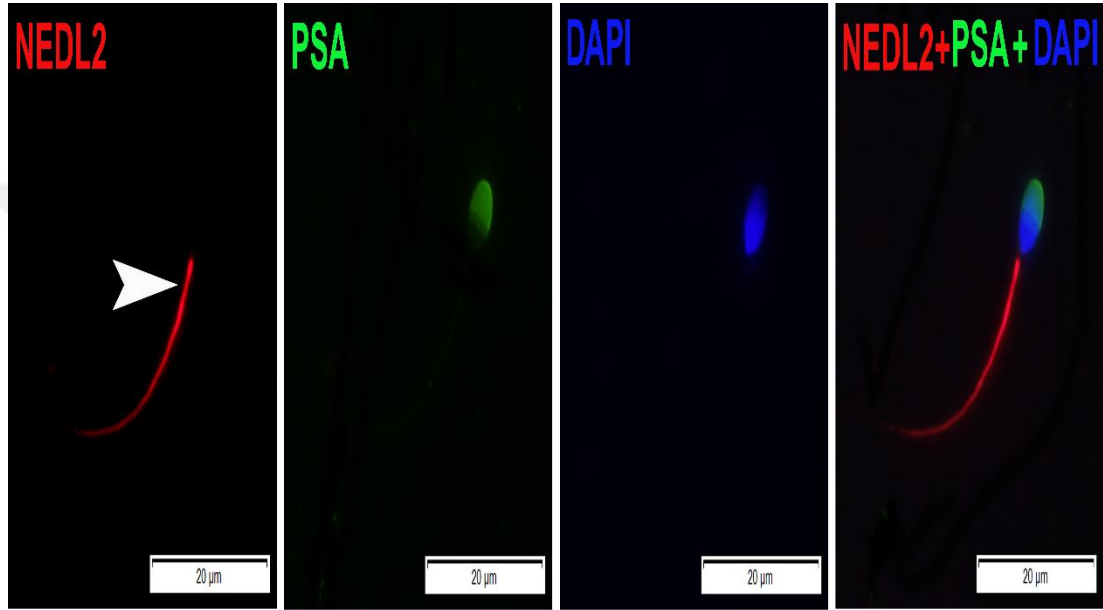
Şekil 4.58. Fertil bireye ait normal morfolojiye sahip sperm hücresinde birinci boyanma paternine göre NEDL2 (A), PSA (B), DAPI (C) ve p97/VCP + PSA + DAPI (D) lokalizasyonları: A: Fertil bireye ait sperm hücresinin kuyruk bölgesinde son parça hariç tüm sperm kuyruğu boyunca NEDL2 lokalizasyonu vardır. Mitokondriyal bölgede yoğun bir şekilde görülen NEDL2 lokalizasyonu dikkat çekmektedir (ok). B: Akrozomal bölgenin düzgün bir yapıya sahip olduğu görülmektedir. C: DNA normal morfolojiye sahiptir. D: NEDL2 mitokondriyal bölgeden kuyruk son parçasına doğru azalma göstermiştir (yıldız). NEDL2 (Kırmızı), PSA (Yeşil), DAPI (Mavi). Bar:20 µm

Birinci boyanma paternine göre en dikkat çeken nokta şekil 4.58’de net bir şekilde görüldüğü gibi bu proteinin bağlantı parçasında lokalizasyon göstermeyip, sperm kuyruğunun özellikle mitokondriyal bölgesinde yoğun bir lokalizasyon göstermesidir (Şekil 4.58-A).

İkinci boyanma paternine göre ise NEDL2 sperm hücresinin baş ve bağlantı parçasında lokalizasyon göstermeyip, spermin son parçası hariç tüm sperm kuyruğu boyunca lokalize olmuştur fakat birinci paternden farklı olarak son parça hariç tüm kuyruk boyunca lokalizasyon gösteren NEDL2 ekspresyonu kuyruk orta parça ve esas parça da immünfloresan olarak aynı şiddette ekspre olmaktadır.

Tablo 4.20. Fertil bireylere ait sperm yayma preparatlarında görülen iki farklı NEDL2 boyanma paternlerinin tüm spermier içindeki yüzde gösterimi: 10 farklı fertil bireye ait sperm yayma preparatları incelenmiş, her preparattan 200 hücre toplamda 2000 hücre sayılmıştır.

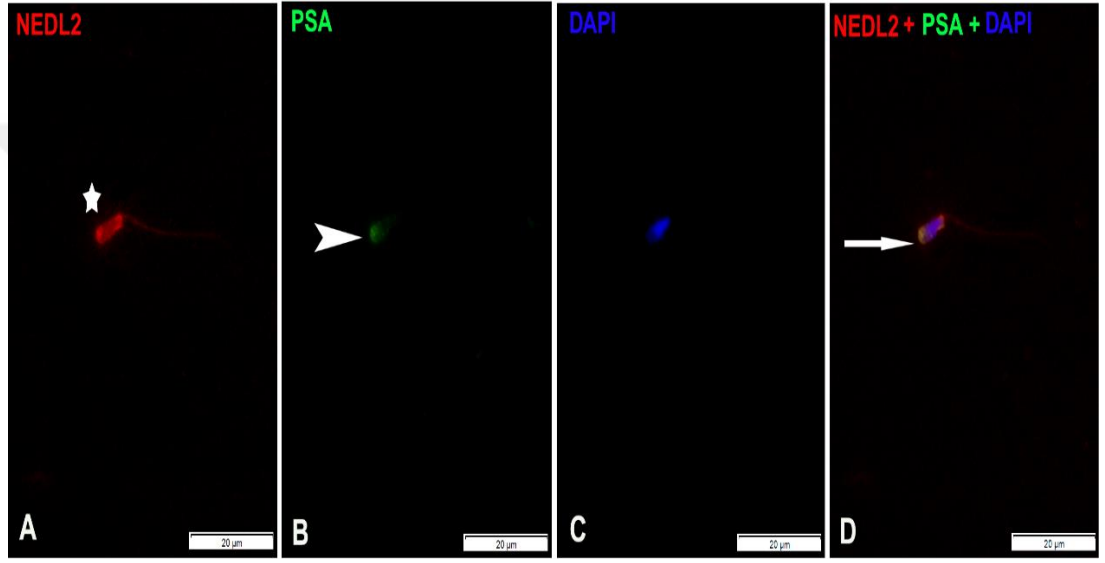
(n=10, 2000 sperm)	<u>1.Boyanma Paterni</u>	<u>2.Boyanma Paterni</u>
NEDL2 Boyanma Paternlerinin Tüm Spermier içindeki Yüzdesi	90,66±0,88	9,33±0,88



Şekil 4.59. Fertil bireye ait normal morfolojiye sahip sperm hücresinde ikinci boyanma paternine göre NEDL2 (A), PSA (B), DAPI (C) ve p97/VCP + PSA + DAPI (D) lokalizasyonları: A: Sperm hücresinin kuyruk bölgesinde son parça hariç tüm sperm kuyruğu boyunca immünfloresan olarak eşit şiddetli NEDL2 lokalizasyonu vardır (okbaşı) B: Akrozomal bölgenin PSA ile boyanması C: Çekirdek normal morfolojiye sahiptir. D: NEDL2+PSA+DAPI kombinasyonu. NEDL2 (Kırmızı), PSA (Yeşil), DAPI (Mavi). Bar: 20 µm

Fertil bireylere ait sperm hücrelerine immünofloresan analizleri takiben NEDL2 proteininin infertil bireylere ait sperm hücrelerindeki lokalizasyonunu saptamak amacı ile bu bireylere ait sperm yayma preparatlarında NEDL2 lokalizasyonunu belirlemek için immünofloresan yapılmıştır. İnfertil bireylerde kuyruk bölümünde görülen NEDL2 ekspresyonunun ise fertil bireylere ait normal sperm hücrelerine göre azaldığı ve de bu azalmanın özellikle mitokondriyal bölgede olduğu dikkati çekmektedir. Bununla birlikte baş bölgesinde morfolojik olarak anomali olan özellikle akrozomal anomalisi olan sperm hücrelerinin akrozomal bölgesinde de NEDL2'nun pozitif boyanma verdiği görülmektedir.

Üroloji bölümünden infertilite tanısı alan IF1 kodlu bireye (Şekil 4.60) ait sperm yayma preparatlarında daha önce tespit edildiği gibi sperm hücrelerinin Kruger morfoloji analizi sonucunda % 90'ının amorf baş anomalisine sahip olduğu görülmüştür. Yapılan immüno Floresan çalışmalar sonucunda bu bireye ait baş anomalisine sahip sperm hücrelerinde kuyruk kısmında özellikle de orta parçada NEDL2 ekspresyonunun azaldığı dikkati çekmektedir. Bu bireye ait belirgin amorf baş anomali olan sperm hücrelerinin çoğunda sperm hücrelerinin baş kısmında da NEDL2 lokalizasyonu belirgin olarak görülmektedir (Şekil 4.60-A).

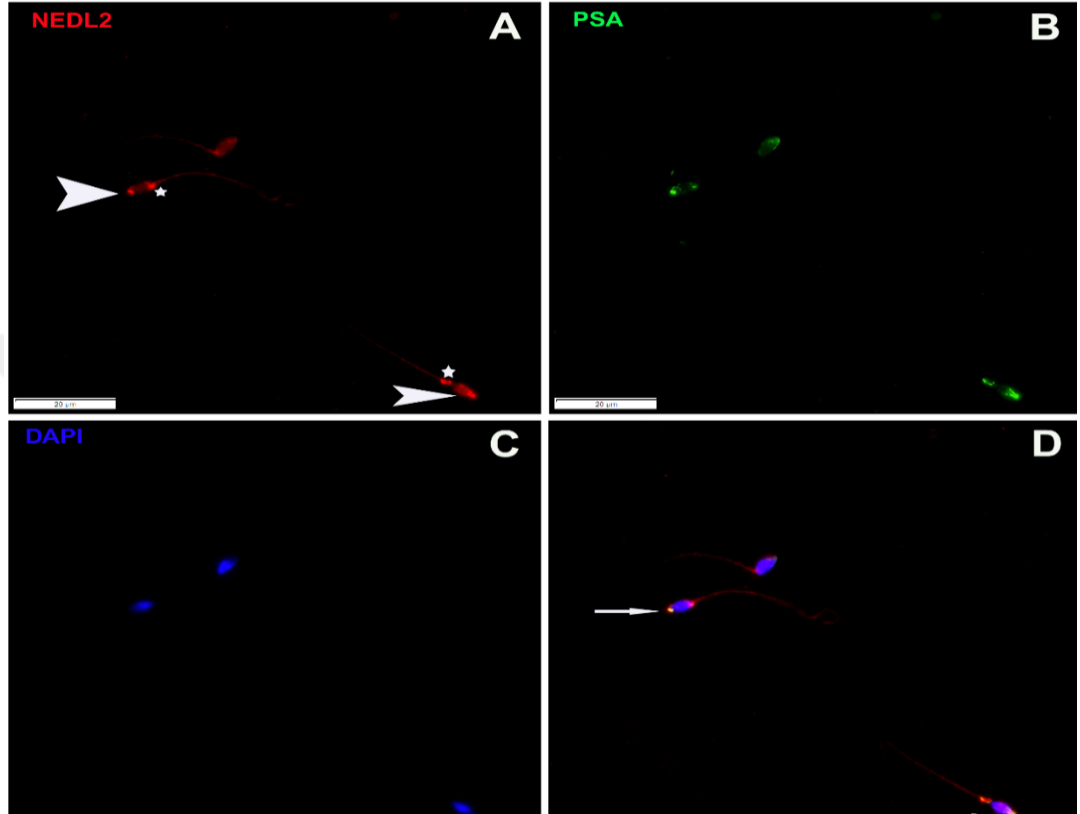


Şekil 4.60. Baş anomali olan sperm hücresinde NEDL2 (A), PSA (B), DAPI (C) ve p97/VCP + PSA + DAPI (D) lokalizasyonları: A: Spermin baş bölgesinde ise özellikle morfolojik olarak bozuk anterior kısımda (yıldız) NEDL2 lokalizasyonu görülmektedir. B: Akrozomal bölgede ki düzensizlik ve zayıf boyanma dikkat çekmektedir (okbaşı) D: NEDL2 ve PSA birlikte kolokalize olmuştur (ok). NEDL2 (Kırmızı), DAPI (Mavi), PSA (Yeşil). Bar:20 µm

Bu hücrelerin akrozomal bölgelerinin (Şekil 4.60-B) ve de çekirdek yapılarında düzgün bir yapıya sahip olmadığı görülmüştür (Şekil 4.60-C). NEDL2+PSA+DAPI kombinasyonu sonucunda NEDL2 proteininin akrozomal bölgede PSA boyası ile birlikte kolokalize olduğu ve bu bölgenin sarı renkte ışıma verdiği görülmüştür (Şekil 4.60-D).

Üroloji bölümünden infertilite tanısı alan IF2 kodlu bireye ait sperm yayma preparatlarında daha önce yapmış olduğumuz p97/VCP boyamasında olduğu gibi sperm hücrelerinin büyük bir çoğunluğunda akrozomal bölgenin morfolojik olarak

düzgün olmadığı görülmüştür. Şekil 4.61-A'da da görüldüğü gibi infertilite tanısı almış bu bireye ait hücrelerde NEDL2 ekspresyonu oldukça azalmış, fertil bireylerde sadece kuyrukta görülen NEDL2 lokalizasyonu akrozomal anomali görülen sperm hücrelerinin baş kısmında anomali bulunan bölgelerde de lokalizasyon göstermiştir.

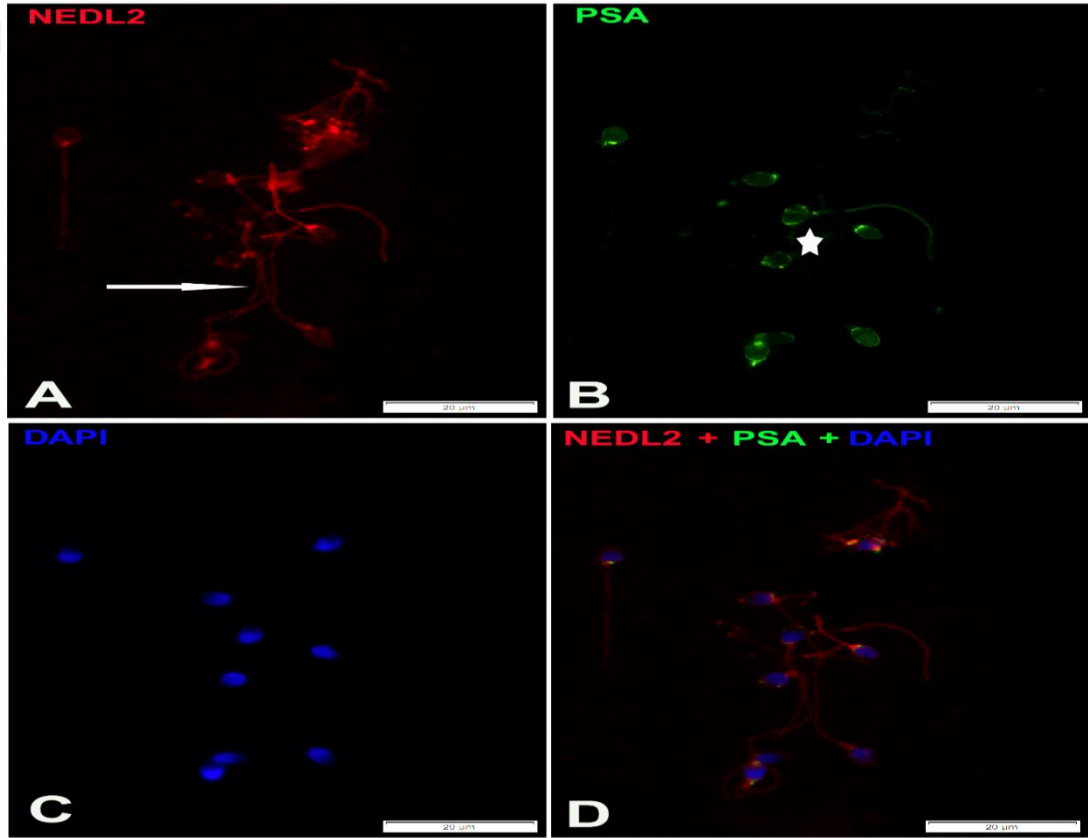


Şekil 4.61. Akrozomal anomali olan sperm hücrelerinde NEDL2 (A), PSA (B), DAPI (C) ve NEDL2 + PSA + DAPI (D) lokalizasyonları: A: Akrozomal anomali bulunan infertil bireye ait sperm hücrelerinin kuyruk bölgesinde NEDL2 ekspresyonunun oldukça azaldığı dikkat çekmektedir. Ayrıca bu hücrelerin baş bölümünün anterior kısmında özellikle akrozomal anomalinin bulunduğu bölgelerde NEDL2 lokalize olmuştur (okbaşı). Yine bu hücrelerde defekt görülen bağlantı parçasında ve de başın posterior bölgesinde de NEDL2 lokalize olmuştur (yıldız). Akrozomal anomalinin olduğu bölgelerde PSA ve NEDL2 birlikte kolokalize olarak sarı renkli ışıma vermişlerdir (ok). NEDL2 (Kırmızı), PSA (Yeşil), DAPI (Mavi). Bar:20 µm

Akrozomal anomaliye sahip hücrelerin %20'sinde akrozomal bölgenin hiç olmadığı diğer hücrelerde ise akrozomal bölgenin bir bütün olmadığı, akrozomal alana ait baş bölümünün hasarlı olduğu PSA boyaması sonucu görülmüştür. Ayrıca akrozomal bölgedeki zayıf PSA boyanması da bu bölgenin morfolojik olarak düzgün bir yapıya sahip olmadığını doğrulamaktadır (Şekil 4.61-B). Aynı zamanda bu hücrelerin normal morfolojiye sahip çekirdek yapısına da sahip olmadığı görülmüştür.

(Şekil 4.61-C). Yine şekil D’da görüldüğü gibi fertil bireylere ait normal morfolojiye sahip sperm hücrelerinde başın posterior bölgesinde ve bağlantı parçasında görülmeyen NEDL2 lokalizasyonu bu infertil bireye ait amorf baş anomaliği görülen sperm hücrelerinde defekt görülen bağlantı parçasında ve de başın posterior bölgesinde de lokalize olmuştur. Bu bölgelerde NEDL2 ve PSA kolokalizasyon göstermiş ve bu bölgeler sarı renkli ışımaya vermiştir (Şekil 4.61-D).

İnfertilite tanısı almış bir diğer birey olan IF3 kodlu donörün sperm yayma preparatlarında p97/VCP boyamasında da belirlendiği gibi sperm hücreleri arasında yoğun bir şekilde aglütinasyon gözlenmiştir (Şekil 4.62).



Şekil 4.62. Aglütinasyon gösteren sperm hücrelerinde NEDL2 (A), PSA (B), DAPI (C) ve NEDL2 + PSA + DAPI (D) lokalizasyonları: A: Yoğun aglütinasyon gösteren sperm hücrelerinin kuyruk bölgesinde NEDL2 ekspresyonunun oldukça azaldığı dikkat çekmektedir. Bu hücrelerin baş kısımlarındaki artmış NEDL2 ekspresyonu dikkat çekmektedir (ok). B: Bu hücrelerin akrozomal bölgesinde çok yaygın PSA sinyali dikkati çekmektedir (yıldız). Bu hücrelerin akrozomal bölgeleri normal hücrelere göre daha zayıf bir PSA boyanması vermiştir. C: Morfolojik olarak hücrelerin DNA yapısının da normal morfolojiye sahip olmadığı görülmüştür. D: Yine bu hücrelerde defekt görülen bağlantı parçasında ve de başın posterior bölgesinde de NEDL2 lokalize olmuştur. NEDL2 (Kırmızı), DAPI (Mavi), PSA (Yeşil). Bar:20 µm

Bu hücrelerde normal sperm hücrelerinde kuyruk son parça hariç tüm sperm kuyruğunda görülen NEDL2 lokalizasyonu bu bireye ait sperm hücrelerinin de son bölüm hariç tüm kuyruk bölümünde lokalizedir fakat ekspresyon oldukça azalmıştır. Bu bireye ait bazı hücrelerin baş kısmında da NEDL2 lokalizedir (Şekil 4.62-A).

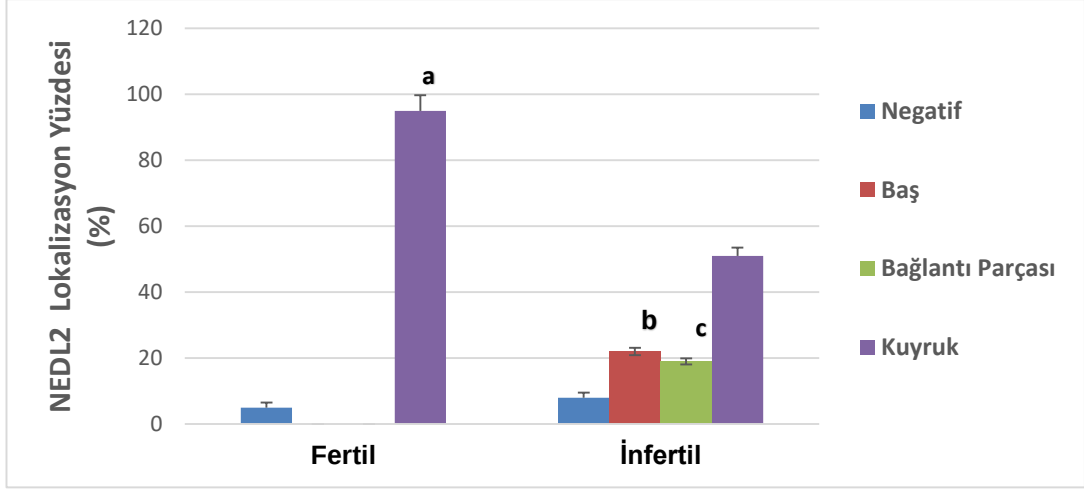
Yine bu hücrelerin büyük bir çoğunluğunda akrozomal bölgeyi görüntüleyebilmek için yapılan PSA boyaması sonucunda akrozomal bölgenin çok zayıf sinyal verdiği, akrozomal bölgenin düzenli ve bütün halde bir yapıya sahip olmadığı görülmüştür (Şekil 4.62-B). Hücrelerin bir kısmında ise boyut ve yapı açısından bozuk morfolojiye sahip çekirdek görülmektedir (Şekil 4.62-C).

NEDL2+PSA ve DAPI kombinasyonu ile yapılan boyamalar sonucunda ise NEDL2'nun akrozomal bölgede PSA ile birlikte kolokelize olması ve fertil bireylerde bağlantı parçasında görülmeyen NEDL2 lokalizasyonunun bu hücrelerde bağlantı parçasında da lokalize olması NEDL2'nun bozuk morfolojiye sahip sperm hücrelerinde anomalinin olduğu yerlerde pozitif lokalizasyon verdiğini destekleyen bulgular arasında yer almaktadır (Şekil 4.62-D).

Fertil ve infertil bireylere ait sperm yayma preparatlarına uygulanan immüno Floresan sonuçlarından elde ettiğimiz özet bulgu Tablo 4.19 ve 4.21'de gösterilmektedir. Fertil ve infertil bireylere ait boyanan hücre yüzdeleri karşılaştırıldığında, infertil bireylerde NEDL2 immunreaktivitesinin sperm kuyruğunun orta parçasında anlamlı bir şekilde azaldığı izlenmiştir (Şekil 4.63).

Tablo 4.21. İnfertil (n:10) bireylere ait sperm hücrelerinde NEDL2 lokalizasyonu: 10 fertil bireye ait sperm yayma preparatlarında NEDL2 immunlokalizasyonu her preparattan 200 sperm hücresi sayılarak toplamda 2000 spermde değerlendirilmiştir. NEDL2'nun infertil birey spermelerinde kuyruk bölgesine ek olarak bağlantı parçası ve baş kısmında da lokalize olduğu saptanmıştır.

NEDL2 immunreaktivitesi (%)	Negatif	Baş	Bağlantı parçası	Kuyruk
İnfertil (n=10, 2000 sperm)	29±9.2	15±5.8	14±4.7	42±8.9

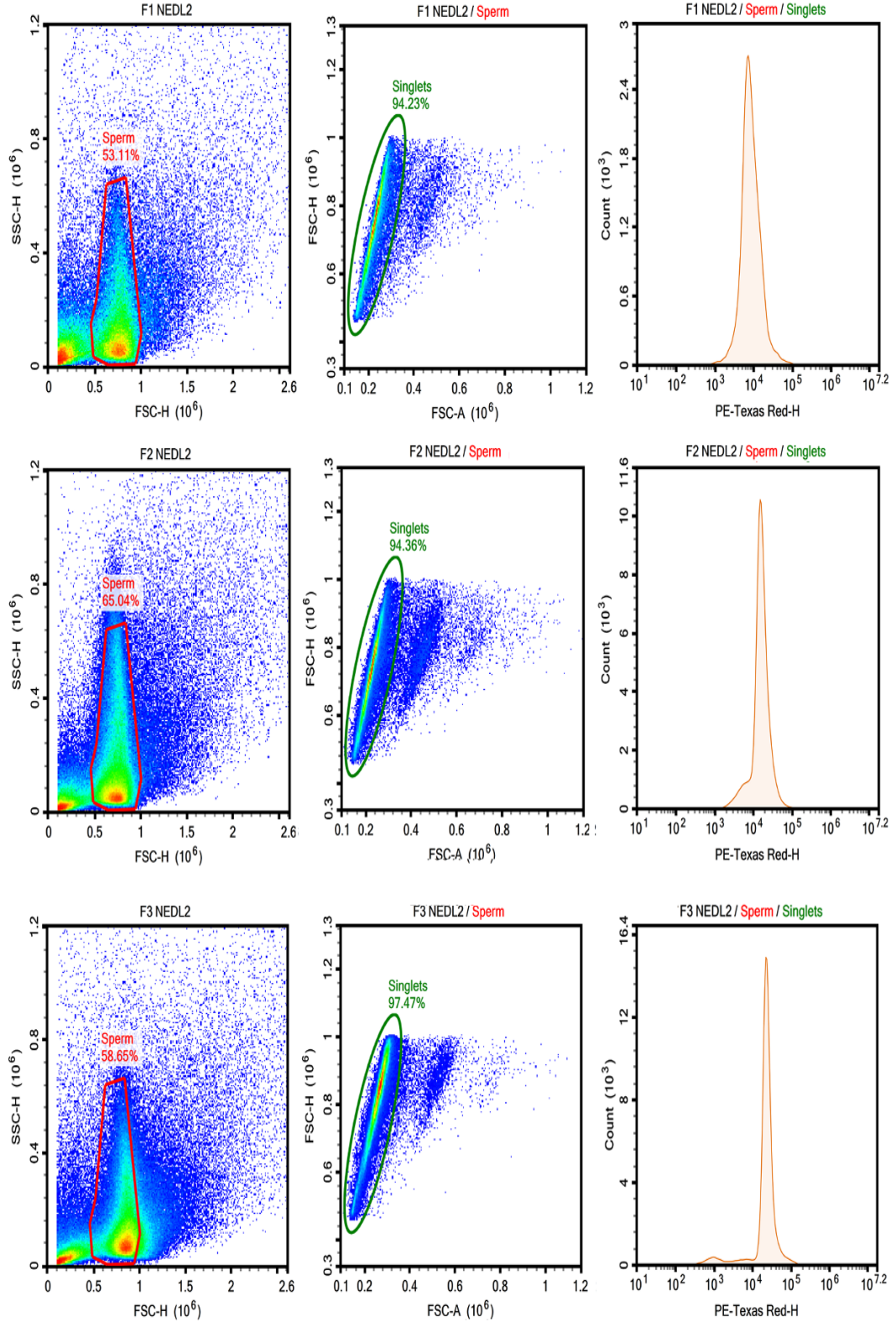


Şekil 4.63. Fertil (n:10) ve infertil (n:10) bireylere ait sperm hücrelerinde NEDL2 immunoreaktivitesinin dağılımı: a, b, c $p < 0.001$ fertil vs infertil.

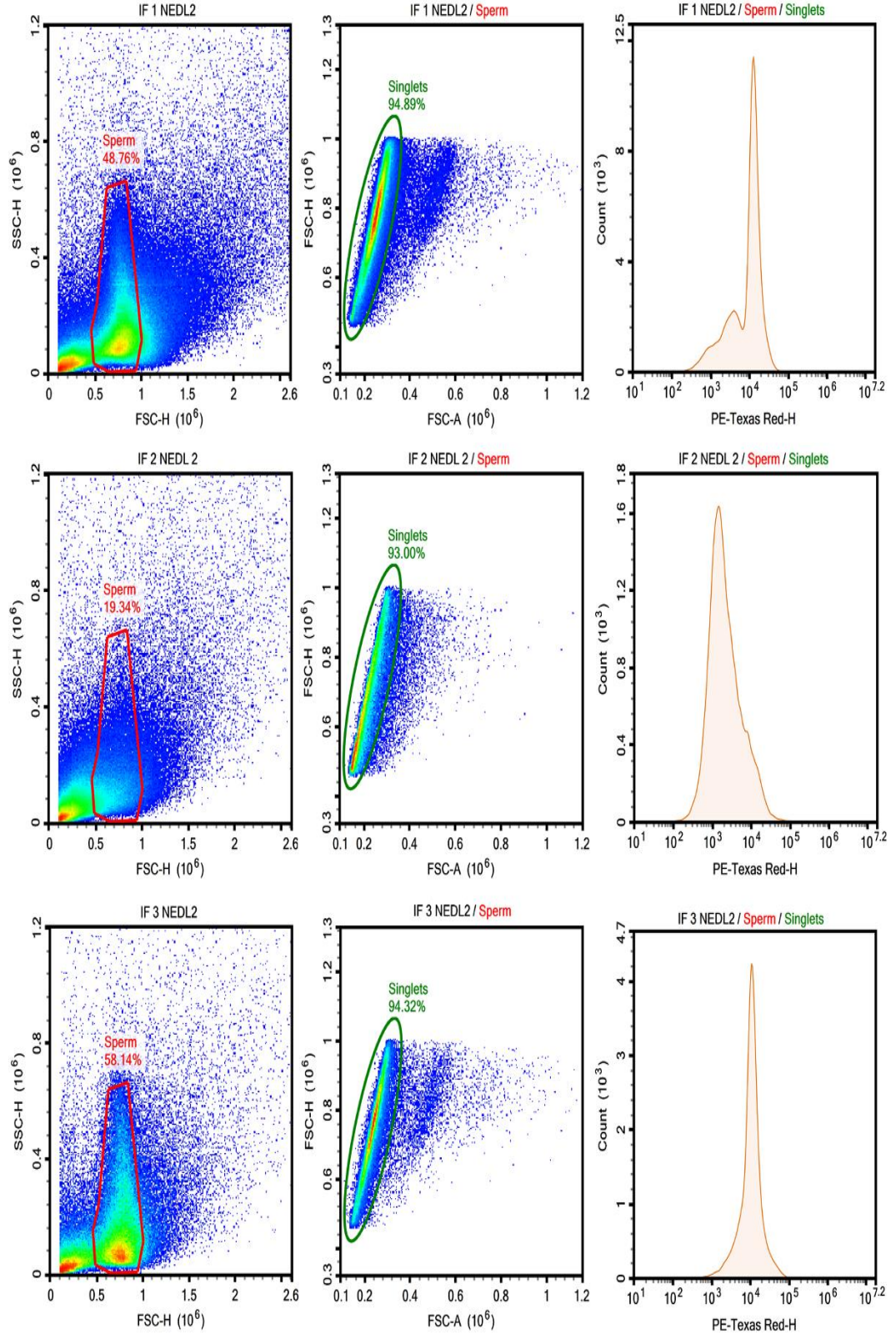
4.2.2.2. Fertil ve İnfertil Bireylerin Spermelerinde NEDL2 Ekspresyonunun Akım Sitometrisi ile Değerlendirilmesi

NEDL2 proteininin fertil ve infertil bireylere ait sperm hücrelerindeki lokalizasyonlarını belirledikten sonra bu proteinin ekspresyon derecesini belirlemek için akım sitometrik yöntemle deneylere devam edilmiştir. Bu amaçla daha önce belirlediğimiz ve p97/VCP ile ilgili akım sitometri deneylerinde uyguladığımız gibi öncelikle sperm hücresinin boyutu göz önüne alınarak öncelikle hücre popülasyonumuz seçilmiş, daha sonra ise bu popülasyon içerisinde başka hücrelerle birleşip hatalı ışıma verecek hücreleri elemek amacıyla akım sitometri cihazı içerisindeki akış kabininden tek tek ışıma vererek geçen hücreler seçilmiş ve de bu hücrelerin yoğunluğu ölçülmüştür.

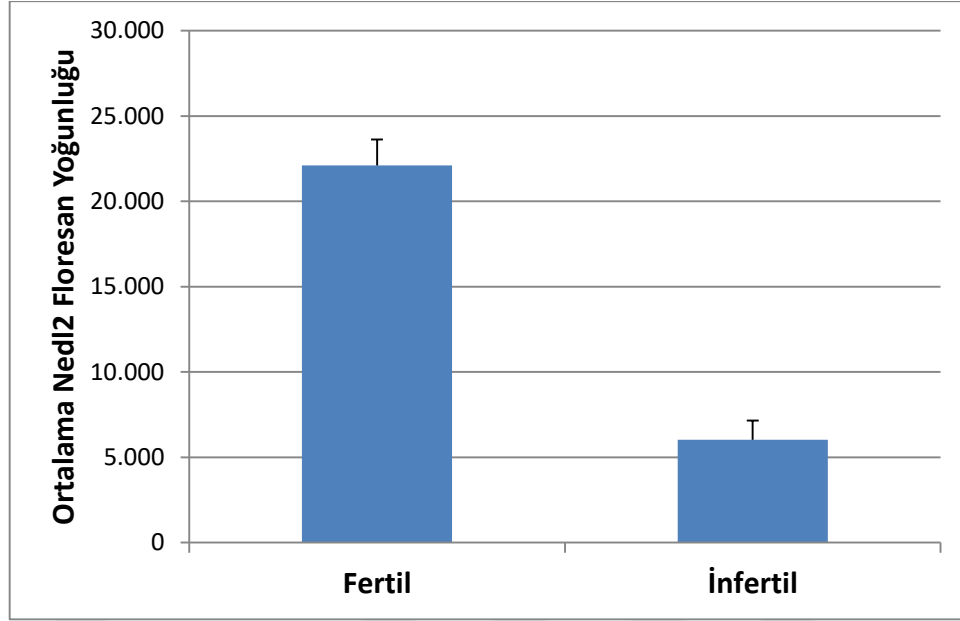
Akım sitometri deneyleri sonucunda yaptığımız analizler sonucunda NEDL2 antikoruna ile işaretlenen fertil bireylere ait sperm hücrelerinin infertil bireylere göre daha yoğun bir ekspresyon verdiği görülmüştür. Akım sitometrisi deneylerinde 10 fertil ve 10 infertil bireyle çalışılmış fakat bu bireylerden örnek olarak seçtiğimiz üç bireyin flow sitometri sonuçları Şekil 4.64 ve 4.65’de görülmektedir.



Şekil 4.64. Fertil bireylerde akım sitometrik analizler ile NEDL2 ekpresyonunun gösterilmesi: Üç farklı fertil bireyden alınan sperm örnekleri ile yapılan flow sitometrik analizler sonucunda belirlediğimiz sperm popülasyonuna ait grafik (solda), bu popülasyonlar içerisinde tek sıra halinde akış kabini içerisinden akan hücrelere ait sperm popülasyonuna ait grafik (ortada) ve bu hücrelere ait NEDL2 ekspresyonuna ait grafik (sağda) görülmektedir.



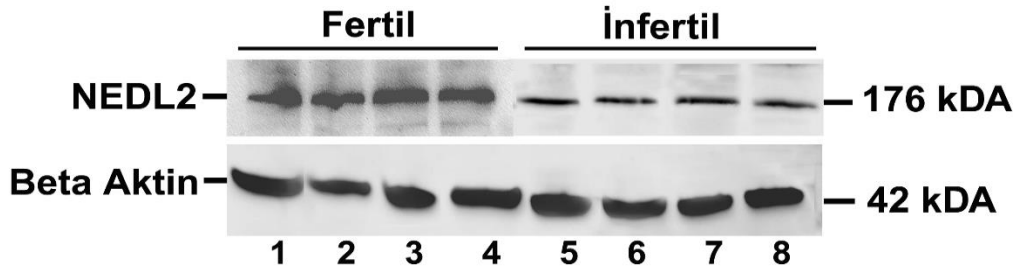
Şekil 4.65. İnfertil bireylerde akım sitometrik analizler ile NEDL2 ekpresyonunun gösterilmesi: Üç farklı infertil bireyden alınan sperm örnekleri ile yapılan flow sitometrik analizler sonucunda belirlediğimiz sperm populasyonuna ait grafik (solda), bu populasyonlar içerisinde tek sıra halinde akış kabini içerisinden akan hücelere ait sperm populasyonuna ait grafik (ortada) ve bu hücelere ait NEDL2 ekspresyonuna ait grafik (sağda) görülmektedir.



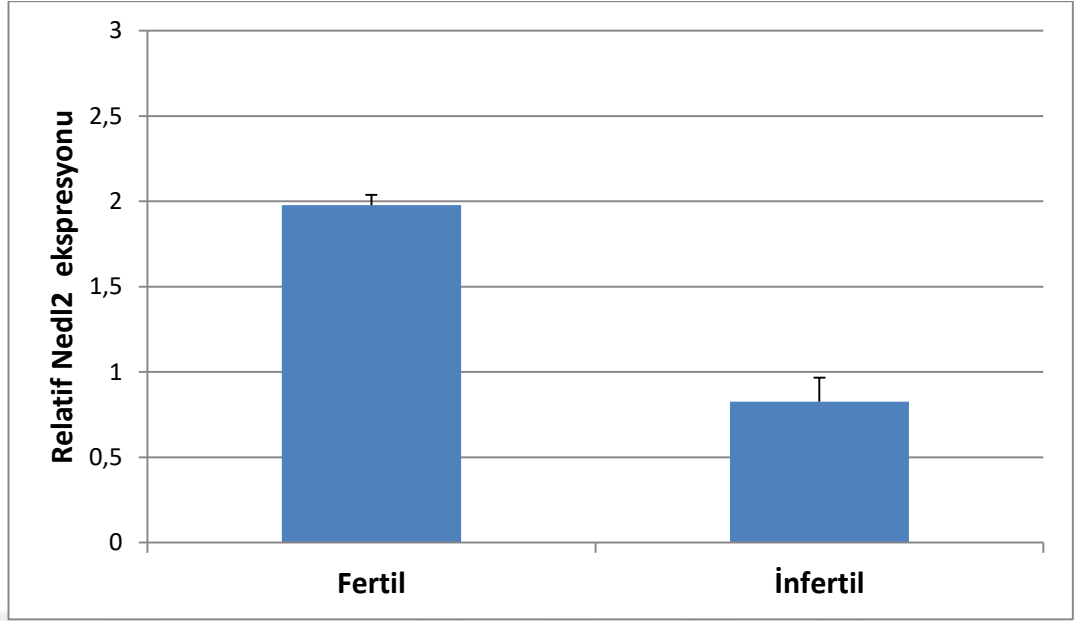
Şekil 4.66. NEDL2 ekspresyonunun fertil ve infertil bireylerde akım sitometrik yöntemle karşılaştırmalı olarak değeri: Bu proteinin ekspresyonunda infertil bireylerde fertil bireylere göre anlamlı bir azalma saptanmıştır ($p < 0.001$).

4.2.2.3. Fertil ve İnfertil Bireylerin Spermlerinde NEDL2 Ekspresyonunun Western Blot ile Değerlendirilmesi

İmmüno Floresan ve flow sitometrik analizleri kantitatif olarak desteklemek amacı ile western blot analizi yapılmıştır. Fertil ve infertil bireylere ait sperm ekstraktları ile yapılan western blot analizi sonucunda elde edilen membranın NEDL2 antikoru ile muamelesi sonucunda NEDL2 (176 kDa) proteinine karşılık gelen bantların fertil bireylerde infertil bireylere göre daha yüksek dansitometriye sahip olduğu saptanmıştır (Şekil 4.68). Yani, NEDL2 fertil bireylerin spermelerinde daha fazla ekspre edilmektedir.



Şekil 4.67. NEDL2 ekspresyonunun western blot yöntemi ile gösterilmesi: Dört fertil ve de dört infertil bireyin sperm ekstraktlarından yapılan western blot sonucuna göre NEDL2 proteinine ait bantlar fertil gruplarda infertil bireylere ait bantlara göre yüksek dansitometreye sahiptir.



Şekil 4.68. NEDL2 ekspresyonunun fertil (n:10) ve infertil (n:10) bireylerde western blot analizi ile karşılaştırmalı olarak değeri: Bu proteinin ekspresyonunda infertil bireylerde fertil bireylere göre anlamlı bir azalma saptanmıştır ($p<0.001$).

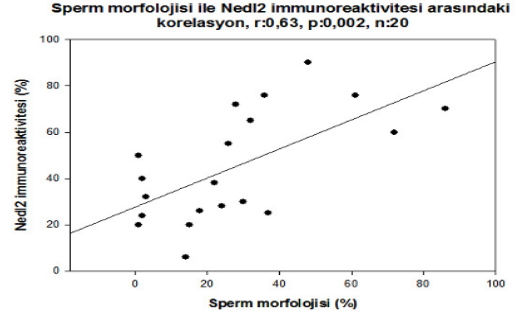
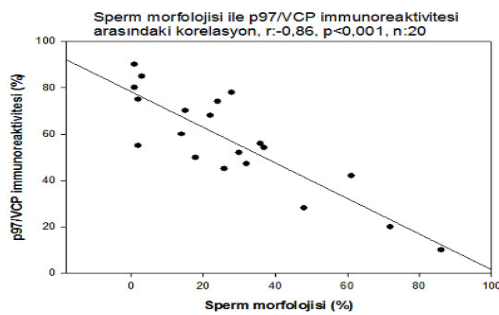
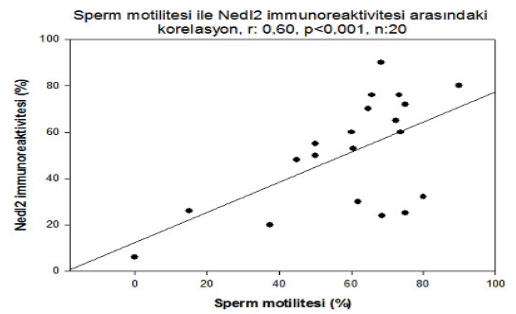
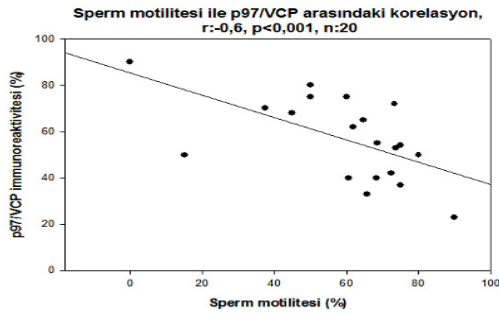
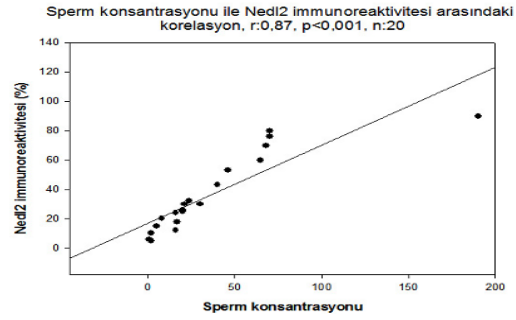
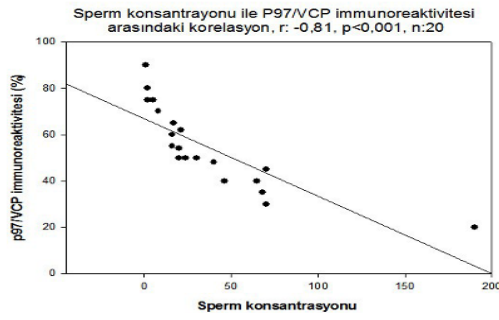
4.3. Ubikütün Proteazom Sistemi (UPS) Proteinlerinden p97/VCP ve NEDL2 Proteinlerinin Semen Parametreleri ile İlgili İlişkisi

Tezimde fertil ve infertil bireyden alınan semen örnekleri öncelikle WHO (2010) kriterlerine göre analiz edildi (Tablo 4.22). Semen parametreleri ile p97/VCP ve NEDL2 ekspresyonları arasında bir ilişki olup olmadığını saptamak amacıyla sperm konsantrasyonu, sperm motilitesi ve sperm morfolojisi yüzdeleri ile p97/VCP ve NEDL2 ekspresyonlarına ait yüzdeleri arasında Pearson korelasyonuna bakıldı. p97/VCP (Şekil 4.69) ekspresyon yüzdeleri, sperm konsantrasyonu, motilitesi ve sperm morfolojisi ile negatif korelasyon gösterdiği saptanmıştır.

NEDL2 ekspresyon yüzdeleri, sperm konsantrasyonu, motilitesi ve sperm morfolojisi ile pozitif korelasyon gösterdiği saptanmıştır.

Tablo 4.22. Fertil ve infertil bireylere ait semen analizi ve Kruger morfoloji analizi sonuçları

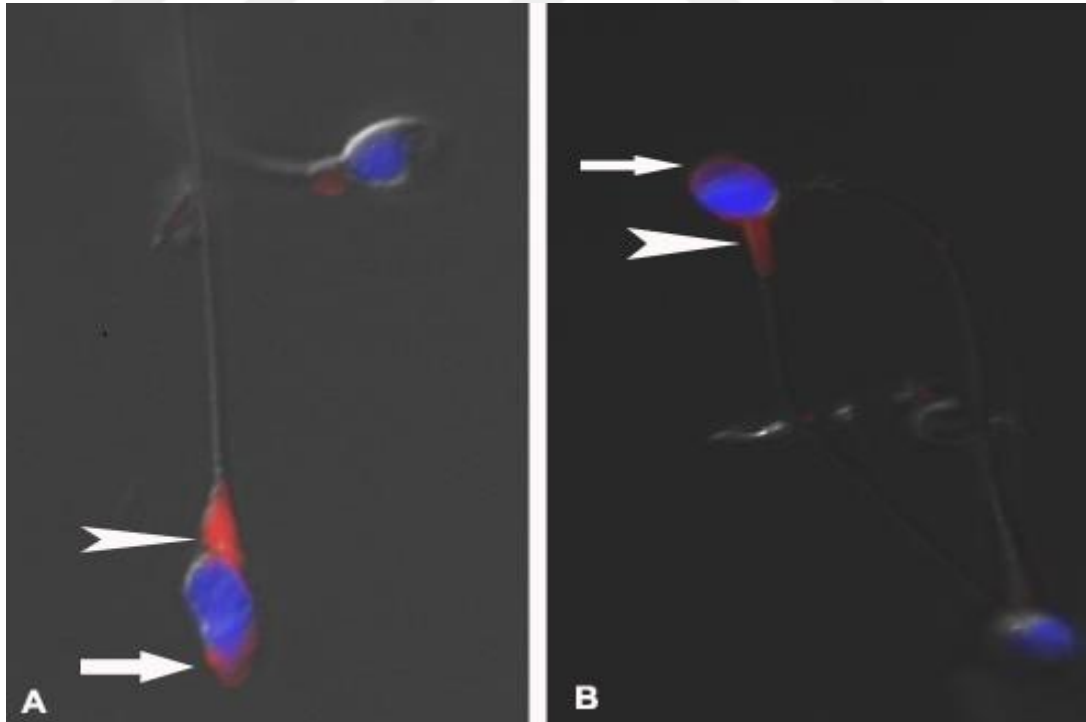
	FERTİL	İNFERTİL
Ejakulat hacmi (ml)	3,28	2,35
Sperm konsantrasyonu ($\times 10^6$)	58,6	14,5
Toplam Sperm Sayısı ($\times 10^6$)	172,4	33,5
Motilite (%)	70,3	48,3
İleri hareketli sperm (%)	62,8	42,6
Normal morfoloji (%)	44,6	11,2
Yaş	32,4	37
Likefikasyon Süresi (dk.)	35	47



Şekil 4.69. p97/VCP ve NEDL2'nun insan sperm konsantrasyonu, motilitesi ve morfolojisi ile olan ilişkisi: p97/VCP'nin insan sperm konsantrasyonu, motilitesi ve morfolojisi ile negatif korelasyon gösterirken, NEDL2 insan sperm konsantrasyonu, motilitesi ve morfolojisi ile pozitif korelasyon göstermektedir.

4.4. Ubikütün Proteazom Sistemi (UPS) Proteinlerinden p97/VCP ve NEDL2 ve Agrezomlar Arasındaki İlişki

Ayrıca infertilite tanısı alan bireylere ait sperm yayma preparatlarında morfolojik olarak normal sperm hücresi ile uyum göstermeyen ve de baş, bağlantı parçası, kuyruk anomalisine sahip spermelerde oluşan ubikütünlenmiş proteinlerin stres-indüklü agregatları olan agrezomları görüntüleyebilmek için agrezom belirleme kiti ile immünofloresan uygulanmıştır. Sonuç olarak ubikütünlenmiş proteinlerin stres-indüklü agregatları olan agrezomlar kırmızı sinyal vermiştir. İnfertilite tanısı konmuş, amorf baş yapısına sahip ve de belirgin boyun anomalisi olan bir bireyden alınan sperm örneği ile yapılan agrezom belirleme yöntemi sonucunda sperm hücrelerinin anomalinin bulunduğu baş ve boyun kısımlarında kümelenen agrezomlar dikkati çekmektedir (Şekil 4.70-A). Yine infertilite tanısı almış yuvarlak baş yapısına sahip ve de boyun kısmında kalınlaşma görülen bir diğer bireye ait sperm hücrelerinin anomalinin bulunduğu baş ve boyun kısımlarında agrezomlar yoğun kırmızı sinyal vermiştir (Şekil 4.70-B).



Şekil 4.70. Agrezom belirleme yöntemi ile agrezomların (kırmızı) gösterilmesi: Agrezomlar ubikütünlenmiş proteinlerin stres-indüklü agregatlarıdır ve burada ProteoStat kiti ile işaretlendiklerinde mitokondriyal kılıfta (okbaşı) ve de baş kısmında (ok) kırmızı sinyal verdikleri görülmektedir.

p97/VCP ve NEDL2 proteinlerinin fertil bireylerde morfolojik olarak bozuk sperm hücrelerinin anomalinin baskın olduğu bölgelerde kümelenmesi sonucu ile agrezom belirleme yöntemi sonucunda agregatların da yine bu anomalinin olduğu yerlerde baskın olarak lokalize olması sonucu uyumluluk göstermektedir.

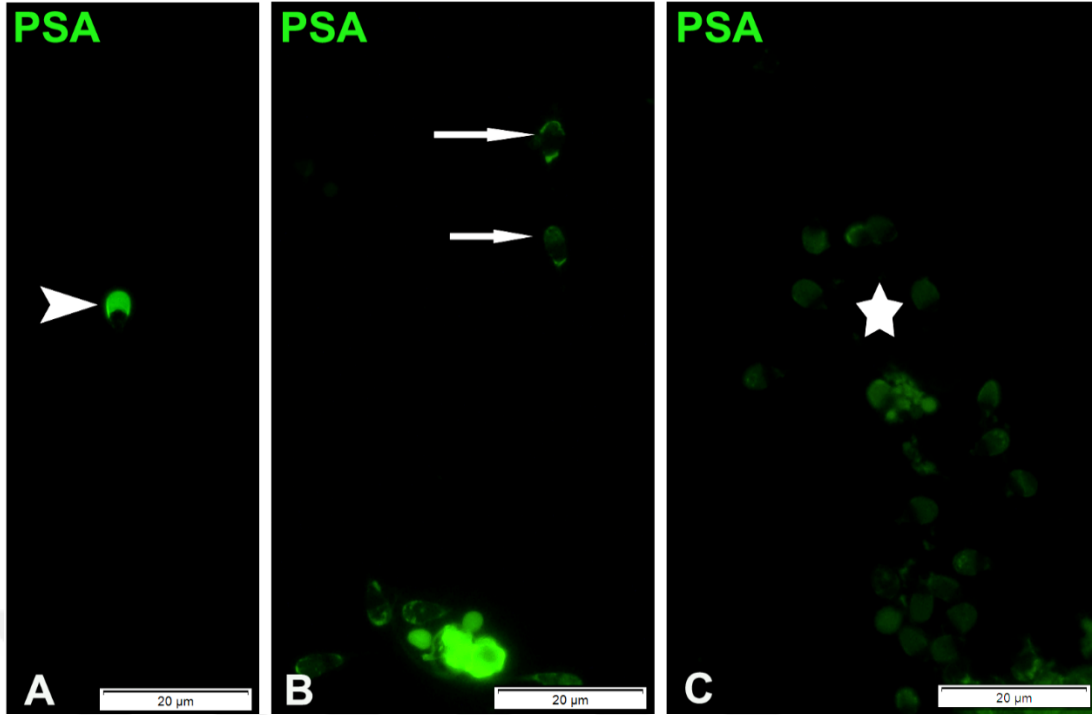
4.5. İnfertilite ve PSA Arasındaki İlişki

Fertil ve infertil bireylerde p97/VCP ve NEDL2 ile yapılan immünfloresan deneylerinde bu primer antikorlara ek olarak uygulanan PSA ve DAPI boyamaları sonucunda PSA immünreaktivitesinin fertil ve infertil bireylerde değişkenlik gösterdiği gözlenmiştir. Bu amaçla fertil ve infertil bireylere ait sperm yayma preparatlarına sadece PSA boyası uygulanarak daha detaylı olarak inceleme yapılmış ve takiben bu bireylere ait sperm hücrelerine sadece PSA eklenerek akım sitometri analizleri yapılmıştır.

4.5.1. Fertil ve İnfertil Bireylerin Spermelerinde PSA İmmünlokalizasyonu

Sperm hücrelerinin akrozomal bölgelerini görüntüleyebilmek için kullandığımız PSA boyaması sonucunda fertil bireylere ait normal sperm morfolojisi ile uyumlu hücrelerin sadece akrozomal bölgesinin güçlü bir şekilde PSA ile boyandığı görülmüştür (Şekil 4.71-A). İnfertil bireylere ait sperm yayma preparatları incelendiğinde ise akrozomal bölgenin çoğunlukla fertil bireylerde olduğu kadar güçlü bir boyanma göstermediği görülmüştür.

Kruger morfoloji analizi sonucu akrozomal anomaliye sahip olduğu tespit edilen IF2 kodlu bireye ait sperm hücrelerinin %90'ının PSA boyası ile çok zayıf sinyal verdiği hatta bazı hücrelerde ise sinyal vermediği görülmüştür. Akrozomal anomaliye sahip bu bireye ait sperm hücrelerinin akrozomal bölgesinin normal morfolojiye sahip olmayıp sınırlarının da düzgün olmadığı görülmektedir (Şekil 4.71-B).



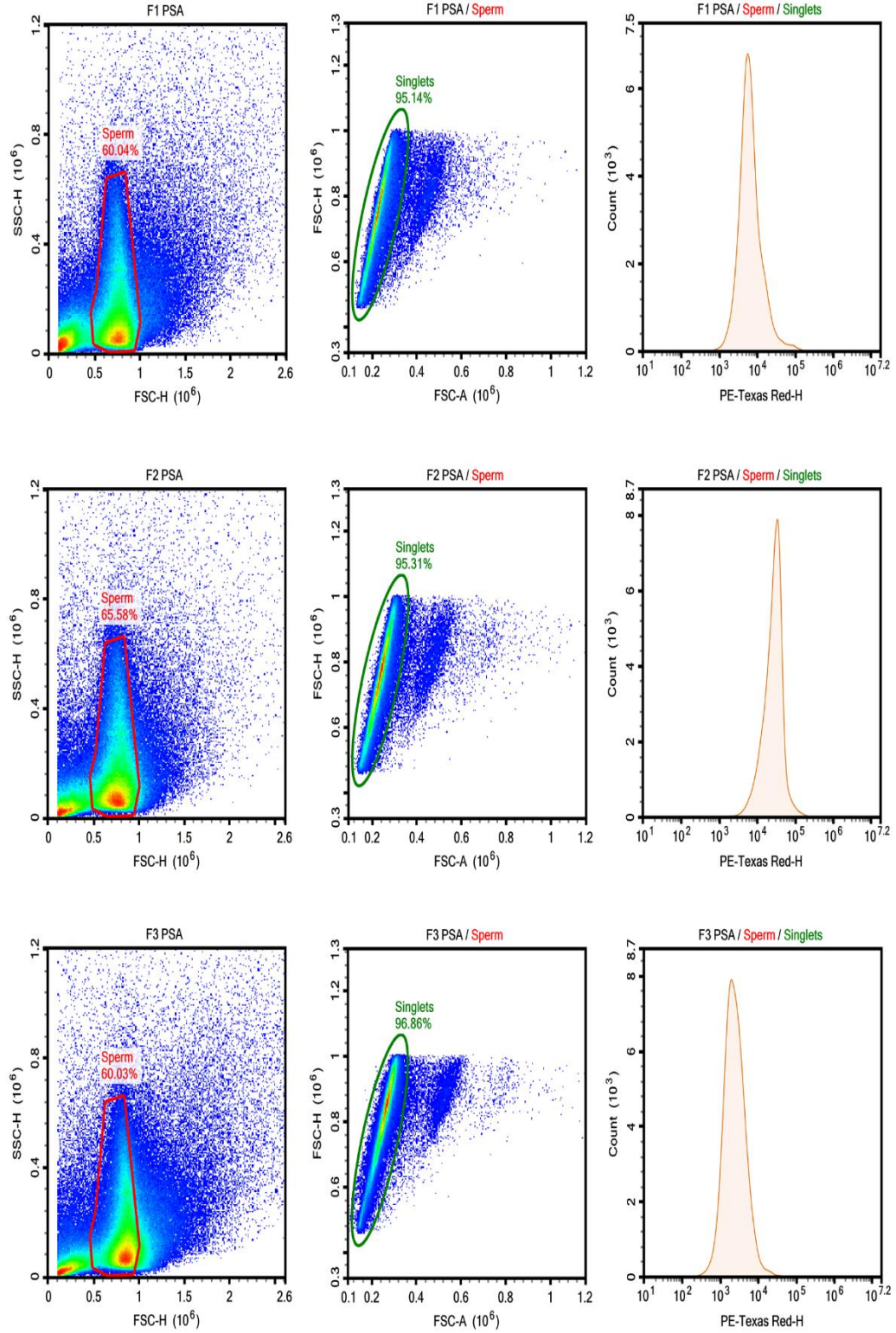
Şekil 4.71. Fertil ve infertil bireylere ait sperm hücrelerinin PSA ile boyanması: A: Fertil bir bireye ait normal morfolojideki sperm hücresinin PSA boyanması sonucunda sadece akrozomal bölgesinin güçlü bir şekilde boyandığı görülmektedir (okbaşı). B: Akrozomal anomaliye sahip infertil hücrelerin çok zayıf PSA boyanması verdiği ve bu hücrelerde akrozomal bölgenin sınırları düzgün, normal bir yapıya sahip olmadığı görülmüştür (ok). C: Aglütinasyon problemi olan bu bireye ait sperm hücrelerinin ise akrozomal bölgelerinin çoğunlukla normal ve düzgün sınırlara sahip olduğu fakat fertil bireylere göre daha zayıf PSA boyanması gösterdiği görülmüştür (yıldız). Bar:20 µm

Bununla birlikte infertil bireylere ait normal morfolojiye sahip olmayan baş, bağlantı parçası ya da kuyruk anomalisine sahip ya da aglütinasyon gibi daha farklı problemlere sahip hücrelerin normal morfolojiye sahip hücrelere göre daha zayıf bir PSA boyanması verdiği görülmüştür. Bu bulgumuza örnek gösterebileceğimiz IF3 kodlu bireye ait sperm yayma preparatlarında sperm hücreleri arasında yoğun bir aglütinasyon görülmüş ve de bu sperm hücrelerinin akrozomal bölgesinin fertil bireylere ait normal morfolojideki hücrelere göre daha zayıf bir boyanma gösterdikleri görülmüştür (Şekil 4.71-C).

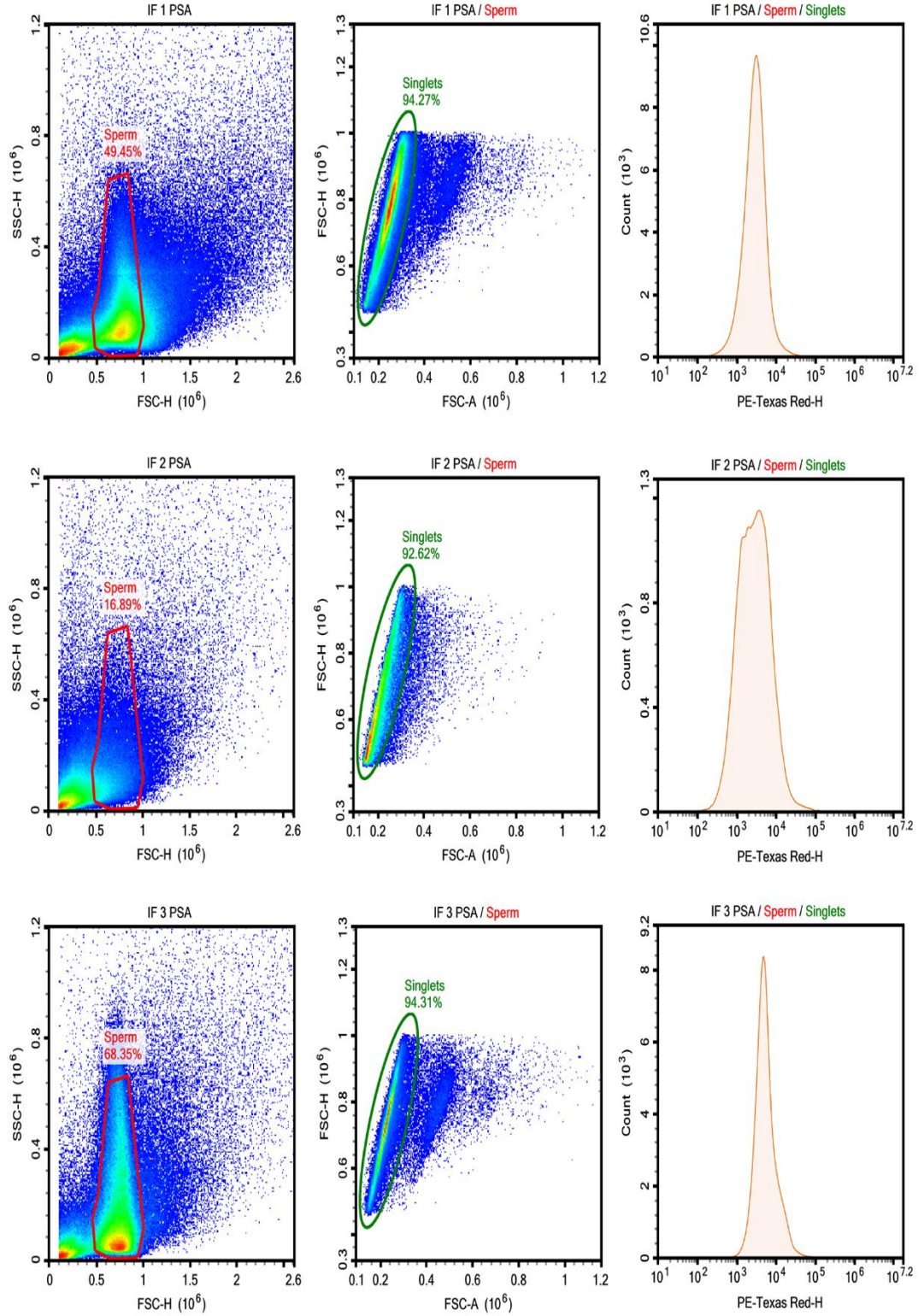
İmmüno Floresan analizler sonucu elde ettiğimiz tüm bu bulgulara dayanarak sonuç olarak diyebiliriz ki PSA fertil bireylerde akrozom yapılarının düzgün olması nedeniyle infertil bireylere göre daha güçlü bir boyanma gösterir.

4.5.2. Fertil ve İnfertil Bireylerin Spermelerinde PSA Ekspresyonunun Akım Sitometrisi ile Değerlendirilmesi

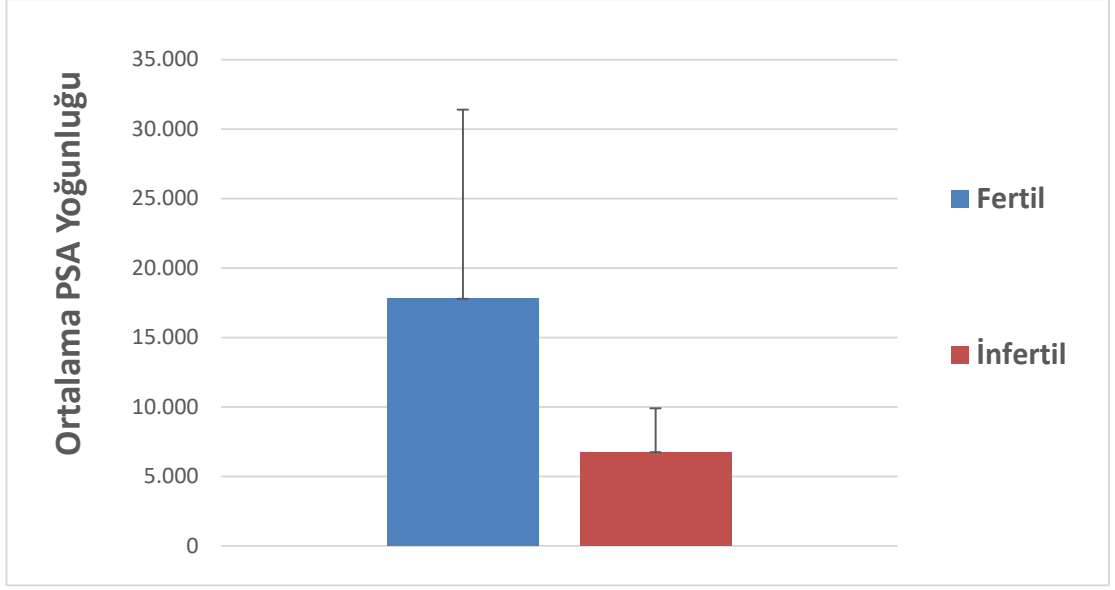
İmmünfloresan deneyler sonucunda elde ettiğimiz bulguların doğruluğunu kanıtlamak için immünofloresan çalışmalara ek olarak akım sitometrik deneylerle fertil ve infertil bireylerde PSA ekspresyonu karşılaştırmalı olarak çalışılmıştır. Bu amaçla daha önce belirlediğimiz ve p97/VCP ile ilgili akım sitometri deneylerinde uyguladığımız gibi öncelikle sperm hücresinin boyutu göz önüne alınarak öncelikle hücre popülasyonumuz seçilmiş, daha sonra ise bu popülasyon içerisinde başka hücrelerle birleşip hatalı ışımaya verecek hücreleri elemek amacıyla akım sitometri cihazı içerisindeki akış kabininden tek tek ışımaya vererek geçen hücreler seçilmiş ve de bu hücrelerin PSA yoğunluğu ölçülmüştür (Şekil 4.72 ve 4.73).



Şekil 4.72. Fertil bireylerde akım sitometri yöntemi ile PSA ekspresyonunun belirlenmesi: Üç farklı fertil bireyden alınan sperm örnekleri ile yapılan flow sitometrik analizler sonucunda belirlediğimiz sperm popülasyonuna ait grafik (solda), bu popülasyonlar içerisinde tek sıra halinde akış kabini içerisinde bulunan hücrelere ait sperm popülasyonuna ait grafik (ortada) ve bu hücrelere ait PSA ekspresyonuna ait grafik (sağda) görülmektedir.



Şekil 4.73. İnfertil bireylerde akım sitometrik analizler ile PSA ekpresyonunun gösterilmesi: Üç farklı infertil bireyden alınan sperm örnekleri ile yapılan flow sitometrik analizler sonucunda belirlediğimiz sperm popülasyonuna ait grafik (solda), bu popülasyonlar içerisinde tek sıra halinde akış kabini içerisinden akan hücelere ait sperm popülasyonuna ait grafik (ortada) ve bu hücelere ait PSA ekspresyonuna ait grafik (sağda) görülmektedir.

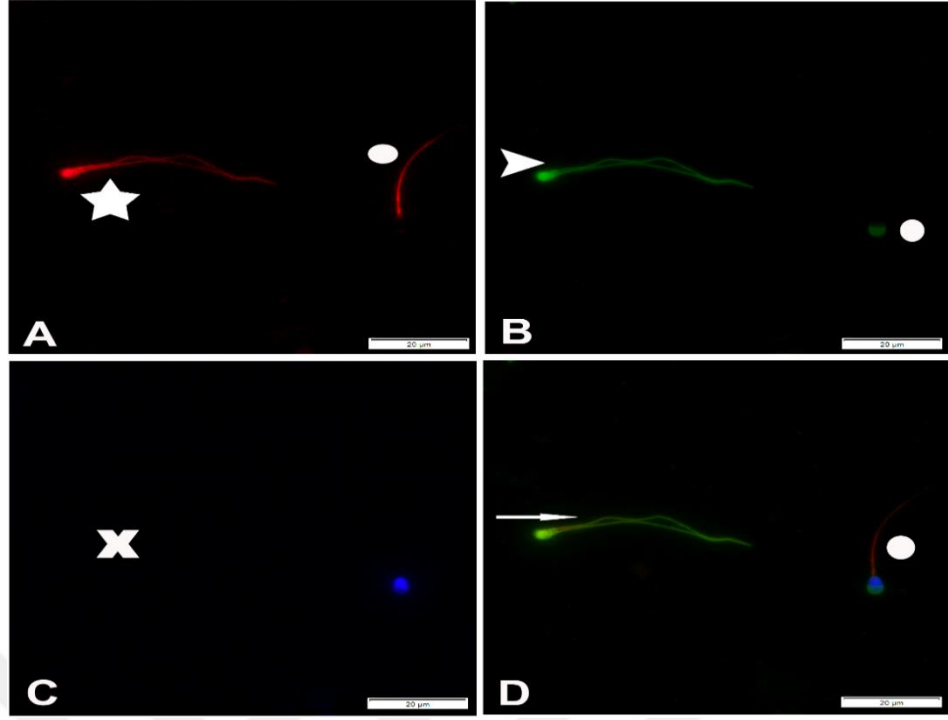


Şekil 4.74. PSAekspresyonunun fertil ve infertil bireylerde akım sitometrik yöntemle karşılaştırmalı olarak değeri: Bu proteinin ekspresyonunda infertil bireylerde fertil bireylere göre anlamlı bir azalma saptanmıştır ($p<0.001$).

İnfertilite ile PSA arasında elde ettiğimiz bu önemli bulguya ek olarak PSA ile yaptığımız immünofloresan çalışmalar sonucunda ikinci bir bulgu daha elde edilmiştir. İnfertilite tanısı alan bireylere ait sperm hücrelerinde baş, bağlantı parçası ya da kuyruk anomalisine sahip sperm hücrelerinin büyük bir kısmında normal hücrelerde sadece akrozomal bölgeyi boyayan PSA boyasının morfolojik olarak bozuk, anomalili hücrelerde özellikle anomalinin olduğu bölgelerde ve hatta bazı hücrelerde tüm kuyruk boyunca da boyanma verdiği elde ettiğimiz ikinci önemli bulgudur.

İnfertilite tanısı almış IF5 kodlu bireyde sperm hücrelerinin %22'sinde çift kuyruk ve amorf baş anomaliği görülmüştür. Çift kuyruğa sahip bu hücrelerin büyük bir çoğunluğunda ise kuyruğunda PSA boyaması ile sinyal verdiği görülmüştür (Şekil 4.75).

NEDL2+PSA+DAPI kombinasyonu uygulanan bu bireye ait sperm hücrelerinde NEDL2 normal morfolojiye sahip hücrelerde mitokondriyal bölgeden kuyruk son kısma kadar pozitif lokalizasyon göstermiştir. Amorf baş anomaliği ve çift kuyruk anomalisi olan bu hücrelerde NEDL2 ile ilgili daha önce elde ettiğimiz bulgularla uyumlu olarak NEDL2 anomalinin olduğu baş bölgesinde de yoğun bir şekilde lokalize olmuş ayrıca çift kuyruk anomalisi olan bu hücrede NEDL2 kuyruk son kısım dahil lokalizasyon göstermiştir (Şekil 4.75-A).



Şekil 4.75. Çift kuyruk anomalisi olan sperm hücresinde PSA+NEDL2+DAPI boyaması sonucunda kuyrukta PSA lokalizasyonunun gösterilmesi: A: NEDL2 boyaması sonucunda normal morfolojiye sahip sperm hücresinde NEDL2 sadece kuyruk kısmında lokalize iken (yuvarlak) çift kuyruklu hücrede amorf morfolojideki baş kısmında yoğun bir şekilde ve de kuyruk son kısım dahil tüm kuyruk boyunca lokalize olmuştur (yıldız). B: Amorf baş anomalisine sahip olan hücrede baş kısmında ve tüm kuyruk boyunca yoğun bir PSA boyaması varken (okbaşı), normal morfolojiye sahip hücrede sadece akrozomal bölgede pozitif PSA boyanması görülmüştür. C: DAPI boyanması sonucunda amorf baş anomali olan hücre sinyal vermemiştir (x) D: Anomalili hücrede NEDL2 ve PSA özellikle baş kısmında kolokelize olarak sarı renkli sinyal vermiştir(ok). Bar:20 µm

Akrozomal bölgeyi görüntülemek için kullandığımız PSA boyaması sonucunda ise baş ve kuyruk anomalisi olan bu hücrenin tamamında yoğun bir PSA boyanması görülmesi dikkat çekici bir bulgudur (Şekil 4.75-B). Ayrıca DAPI boyanması sonucunda amorf baş anomali olan hücrenin sinyal vermemesi de bu hücrenin baş anomalisini doğrulamaktadır (Şekil 4.75-C). NEDL2 +PSA+DAPI kombinasyonu sonucunda ise NEDL2 ve PSA anomalinin olduğu bölgelerde kolokelize olarak sarı renkli sinyal vermiştir (Şekil 4.75-D).

Bu bulgulardan yola çıkarak PSA boyasının sağlıklı bireylere ait normal sperm hücrelerinde sadece akrozomal bölgede, infertil bireylerde ise morfolojik olarak bozuk sperm hücrelerinin anomalinin olduğu bölgelerinde de lokalizasyon göstermesi sonucu PSA boyasının infertilite için bir belirteç adayı olabileceği bulgularımız arasındadır.

5. TARTIŞMA

Ubikitin Proteazom Sistem (UPS) ubikütinlenme (76 aminoasitlik ubikütin moleküllerinin yıkılacak substarata bağlanması) ile proteinlerin şaperonlar yardımıyla 26S proteazoma taşınması, bağlanması ve yıkımını hedefleyen ATP bağımlı enzimatik bir makinedir. UPS'in insan ve hayvan fertilizasyonu boyunca spermin vitellin örtüye bağlanması olayında, sperm kapasitasyonunda ve akrozomal reaksiyonda rol aldığı bilinmektedir (113). Sperm kapasitasyonu oviduktal sperm rezervinden spermin ayrılmasına, zona indüklü akrozomal ekzositoz sonucu akrozomal yüzeyin yeniden şekillenmesine ve sperm membranlarının oolemma ile füzyonuna hazırlanması olarak ana üç olaya hizmet eder (114-116). UPS'in bu olaylara katıldığına dair kanıtlar vardır ki bunlar hem fonksiyonel çalışmalardan hem de sperm proteomunun ve özellikle sperm fosfoproteomunun analizlerinden elde edilen sonuçlardır (113).

Tirozin kinaz ve serin/treonin rezidüleri üzerindeki protein fosforilasyonu kapasitasyon olayının ayırıcı özelliğidir ve kapasite olmuş sperm proteozomu ile ilgili çalışmalar çeşitli proteinlerin memelilerde kapasitasyon boyunca fosforilasyona uğradığını kanıtlar (117). Proteazomal aktivite direkt ya da indirekt olarak sperm kaynaklı protein kinazların aktivitesi ile kontrol edilebilir. Bu olaylar sadece spermin akrozomunda değil aynı zamanda spermin kuyruğunun temel parçasında da olabilir.

Sperm kapasitasyonu ile ilgili çalışmalar sonucunda UPS ile ilişkili birçok protein tanımlanmıştır. Bu proteinler ubikütin aktive edici enzim, çoklu proteazomal altüniteler ve Valosin içeren protein (VCP)'i kapsamaktadır. Kapasitasyona katılan bu proteinler, ubikütinlenmiş proteinleri 26S proteazoma taşıma olaylarına katılırlar ya da kendilerini de ubikütinleyebilirler (11, 78, 118). Tüm bu çalışmalara ait bilgiler UPS'in ve sperm proteazomunun sperm kapasitasyonunu düzenleyici bir rolünün olduğuna dair güçlü kanıtlar içermektedir.

UPS'in sperm kapasitasyonuna etkisi ile ilgili literatürdeki tüm bu çalışmaların yanı sıra infertilite süreci üzerine de etkilerinin araştırıldığı birçok çalışma mevcuttur (11, 12, 14, 17, 18, 78). Literatürde ayrıca sperm parametreleri ve UPS ile birlikte çalışan proteinler arasındaki korelasyonu gösteren çalışmalar da mevcuttur (119-122). Klinik semen parametreleri ve infertilite arasındaki korelasyon her zaman yüksek

seviyelerde olmadığı için infertiliteyi daha iyi aydınlatabilmek için ek objektif belirteçler aranmaktadır.

Literatürde ki bu bilgiler ışığında; tezimde insan sperm kapasitasyonunda ve infertilite sürecinde UPS'in rolünü aydınlatmak ve literatürdeki eksiklikleri tamamlayabilmek amacı ile insan sperm örnekleri ile çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarım sırasında immünfloresan, flow sitometri, görüntülemeli flow sitometri ve Western blot metodları kullanılmıştır.

Ubikütün Proteazom Sisteminin İnsan Sperm Kapasitasyonundaki Rolü

Tezimde insan sperm kapasitasyonunda UPS'in rolünü daha açık bir şekilde aydınlatmak amacı ile insan spermi ile kapasitasyon deneyleri yapılmıştır. Bu amaç ile Prof. Dr. Peter Sutovsky'nin ve Prof. Dr. Sevil Çaylı'nın birçok makalesine kaynaklık eden ve UPS ile ilişkisi literatürde kanıtlanmış olan bir protein olan p97/VCP (Valosin içeren protein), yine Sutovsky ve arkadaşlarının yıllardır çalıştıkları ve fertilizasyonda önemli fonksiyonlarının olduğu bilinen PAWP ve PAWP'nin etkileştiği ve PAWP'ye bağlandığı düşünülen UPS proteinlerinden NEDL2 (NEDD4-like ubiquitin ligase 2) hedef proteinlerimiz olarak seçilmiştir. Literatürde p97/VCP ile ilgili farklı alanlarda çok fazla çalışma olmasına rağmen insan sperm kapasitasyonu ve proteazomal inhibitörler ile p97/VCP arasındaki ilişkiye dair literatürde eksiklikler vardır. Daha önce insan sperm kapasitasyonu ile ilgili literatürde NEDL2 ve PAWP ile ilgili çalışma olmaması da literatürde ki bir diğer eksikliktir. İnsan sperm kapasitasyon sürecinde NEDL2 ve PAWP ile ilgili çalışma olmaması ve de insan sperm kapasitasyonu ve p97/VCP ile ilgili kısıtlı sayıda çalışma bulunması açısından tezimin ilk aşamasını oluşturan kapasitasyon deneylerine ait bölümü orijinal bulgular içermektedir.

UPS'e ait p97/VCP, NEDL2 ve PAWP proteinlerinin sperm kapasitasyonuna olan etkisinin hangi saatlerde gerçekleştiğini anlayabilmek ve de bu süreçte bu proteinlerin lokalizasyonlarındaki değişikliklerini de ortaya çıkarabilmek amacı ile 0., 5. ve 18. saatler kullanılarak deneyler yapılmış ve de takiben UPS'in kapasitasyon sürecine olan etkisini daha iyi aydınlatabilmek amacı ile de proteazomal inhibitörlerinden olan MG-132, Epoksimisin ve CLBL kullanılarak deneylere devam edilmiştir. Fertilizasyon boyunca proteazomal proteoliz gereksinimi, çeşitli proteazom

spesifik inhibitörlerin ve antikörlerin uygulanmasıyla gösterilmiştir. Proteazom bağımlı fertilizasyon mekanizmasını destekleyen çalışmaların bir kısmı memeli fertilizasyonunun özel inhibitörler ve anti-proteazom antikörlerle inhibisyonu ile ilgili çalışmaları kapsar (113). Sonuç olarak proteazomal inhibitörler ve antikör, peptid ve mutant ubikütin gibi sperm fonksiyonu ile ilgili ajanlar etkili bir şekilde memeli fertilizasyonunu tamamen inhibe ederler (123-125).

MG-132, 26S proteazomun 20S öz kısmının kemotripsin benzeri aktivitesinin inhibisyonu için yaygın olarak kullanılan bir inhibitördür ve memeli olmayan *H. roretzi* (126) ve *Cionaintestinalis* (127) gibi deniz hayvanlarında, *Anthocidariscrassispina* (128) ve *Pseudocentrotusdepressus* (129) gibi denizkestanesi türlerinde proteazom sistemini inhibe etmektedir. Memeli türlerinde, domuz (130-132), inek (133) ve farede (134) MG-132'nin proteazom sistemini inhibe ettiği gösterilmiştir. Fonksiyonel çalışmalarda 20S proteazomal özün kemotripsin benzeri aktivitesinin insan sperm kapasitasyonu boyunca arttığı ve çeşitli proteazomal altünitelerin hem tirozin kinaz hem de serin/treonin rezidüleri üzerindeki fosforilasyonu ile bu aktivasyonun eşzamanlı olduğu ispatlanmıştır (113). Sonuç olarak, 20S özün kemotripsin benzeri aktivitesi kapasitasyon medyumuna tirozin kinaz ve serin/treonin kinazlara özel inhibitörlerin eklenmesiyle azaltılır (75).

CLBL (Clasto-Lactacystin β - Lactone) bir prekürsör olarak görev yapan ve proteazom ile etkileşime giren, proteazomun 20S öz kısmının enzimatik aktivitesini inhibe eden geri dönüşümsüz bir proteindir. Sutovsky ve ekibinin bu inhibitörle ilgili önemli bulgular içeren çalışmaları vardır (131). Spermatozoada hem ZP kaynaklı hem de progesteron kaynaklı akrozomal reaksiyon CLBL tarafından inhibe edilmiştir (62, 135).

Epoksimisin'in ise insan sperm kapasitasyonu boyunca serin fosforilasyonunu önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir (136). UPS sistemi ve sperm kapasitasyonu ile ilgili başka bir çalışmada ise MG-132 ve epoksimisinin kapasitasyonu önemli ölçüde değiştirdiği ve akrozomal reaksiyonu önlediği belirtilmiştir (15). Literatürde proteazom sistemi ile ilgili çok çeşitli çalışmalar olmasına rağmen proteazom sisteminin inhibisyonu ile insan sperm kapasitasyonu sürecinde p97/VCP, NEDL2 ve PAWP proteinlerinin ekspresyon ve lokalizasyonlarındaki değişiklikleri de içeren herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Proteazomal inhibitörlerin akrozomal ekzositoz üzerine etkisi ve akrozomal kılıfların yeniden şekillenmesi floresan yöntemlerle akrozomal dış membranın vezikülasyonu ve akrozomal örtünün yeniden şekillenmesi domuz sperminde çalışılmıştır. Zimmerman ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada akrozomal örtülerin solid bir matriksi olmadığı için kolaylıkla parçalanabildiği ve serbest kalan bu örtülerin floresan özellikli PNA (Peanut Agglutinin Lectin) ile gözlemlenebileceğine dair bulguları vardır (3). Ayrıca proteazomal sistemin MG-132, CLBL ya da laktasitin gibi inhibitörler tarafından inhibe edildiğinde akrozomal örtünün yeniden şekillenmesinin önlendiğine dair bulguları olan çalışmaları da vardır (137). Özet olarak akrozomal ekzositozun düzenlenmesinde proteazomal proteolizin etkili olduğuna dair güçlü bulguları olan birçok çalışma vardır (137-139). Bu bilgiler ışığında tezimde insan sperm kapasitasyonu boyunca akrozomal ekzositoz süreci hakkında bilgi edinebilmek ve de proteazomal inhibitörlerin akrozomal ekzositoz üzerine etkisini araştırabilmek için PSA(Pisum Sativum Agglutinin) ekspresyonunun flow sitometrik yöntemlerle belirlenmesi sağlanmıştır.

p97/VCP sperm hücrelerinin kapasitasyon sürecinden önce 0. saatte sperm kuyruk, bağlantı parçası ve başın distal ekvatoryal bölgesinde üç farklı boyanma paterni göstermiştir. NCM (Kapasite Etmeyen Medyum) grubundan itibaren p97/VCP'nin sperm başının anteriyor bölgesinde lokalizasyon gösterdiği yeni bir boyanma paterni NCM grubunda %3 oranında görülürken 5.saatte NCM grubuna göre anlamlı bir artış göstererek %11 oranında görülmeye başlamıştır. 18. saatte ise 5. saat grubuna göre anlamlı ve dikkat çekici bir artış göstererek %22 oranında görülmeye başlanmıştır. İn vitro koşullarda insan sperm kapasitasyonu için gerekli olan sürenin 18 saat olduğuna Sutovsky labında farklı zaman süreleri (0s,1s,4s,6s,18s) kullanarak yaptığımız kapasitasyon deneyleri sonucunda karar verilmiştir. Ayrıca literatürde de sperm kapasitasyonu ile ilgili çalışmalarda inkübasyon süresi olarak 18 saat kullanılmıştır (75, 140). Spermin kapasitasyon sürecini başarılı bir şekilde tamamlaması için gerekli olan 18 saatlik sürenin sonunda spermin baş bölgesinin akrozomal bölümünde özellikle de anteriyor ring dediğimiz bölgede belirgin bir şekilde artan p97/VCP lokalizasyonu dikkat çekici bir bulgudur. Bu bulgular ile p97/VCP'nin insan sperm kapasitasyon sürecindeki rolü belirlenmiştir.

Sperm başının akrozomal bölgesinde görülmeye başlanan p97/VCP lokalizasyonuna paralel olarak özellikle 5. saatten itibaren distal ekvatoryal bölgede azalmaya ya da kaybolmaya başlayan p97/VCP lokalizasyonu da önemli bulgularımız arasında yer almaktadır. p97/VCP'nin başın distal ekvatoryal bölgesinden anterior bölgesine doğru kayması, p97/VCP'nin akrozomal reaksiyonda rol almak üzere akrozomal bölgeye doğru yönelmesi şeklinde yorumlanmıştır. Ficarro ve ark. yaptıkları çalışmada kapasitasyon sürecinden önce p97/VCP'nin spermin boyun bölgesinde, kapasitasyon sürecinden sonra ise tüm anterior baş bölgesinde floresan boyanma gösterdiğini bildirmişlerdir (141). Boyun bölgesinde azalan p97/VCP ekspresyonu ile eş zamanlı olarak başın anterior kısmında p97/VCP ekspresyonunun artması ise bizim sonuçlarımızla uyumlu bir bulgudur. Yine bu çalışmadan elde edilen sonuç bizim çıkarımlarımızla uyumlu olarak şu şekilde açıklanmıştır; kapasitasyon süreci spermi ligand bağımlı ekzositoz geçirmesi için hazırlar ve p97/VCP membran füzyon olayında rol oynar. Bu bulgu p97/VCP'nin kapasitasyon ve akrozomal reaksiyon olayları arasında bir bağlantı sağlayan protein olduğunu desteklemektedir (141).

Literatürde p97/VCP'nin memeli hücrelerinde ve maya hücrelerinde birçok membran füzyon olayında etkili olduğuna dair çalışmalar da mevcuttur (11, 141). Literatürdeki tüm bu bilgiler ışığında tezimde p97/VCP hakkında elde ettiğimiz sonuçlardan biri de, sperm hücrelerinin kapasitasyondan akrozomal reaksiyona geçmesinde p97/VCP'nin katkısı vardır şeklindedir.

Kapasitasyon sürecinde p97/VCP ile ilgili elde ettiğimiz bir diğer önemli bulgu ise sperm kuyruğundaki ekspresyonun 0. saatten 18. saate değişiklik göstermesidir. 0. saatte tüm kuyruk boyunca görülen p97/VCP ekspresyonu, akrozomal bölgesinde p97/VCP lokalizasyonu gösteren hücrelerde 5. saatte minimal bir azalma göstermiş, 18. saatte ise yine akrozomal bölgesinde p97/VCP ekspresyonu olan hücrelerde dikkat çekici bir şekilde artmıştır. Kapasitasyon sürecini tamamlamış olduğunu düşündüğümüz bu hücrelerin kuyruk bölgelerindeki bu artışın tirozin fosforilasyonundan kaynaklandığını düşünmekteyiz. Literatürde proteazomla ilişkili olduğu bilinen p97/VCP'nin tirozin fosforilasyonu geçirdiğine dair güçlü kanıtları olan çalışmalar vardır (11, 15, 75). Ficarro ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada insan spermi yaklaşık 18 saat kapasitasyon medyumuna ile inkübe edildiğinde, kapasitasyon

sürecinden önce sadece tüm spermin %18'inde sadece spermin kuyruğunda görülen fosfotirozin, kapasitasyon sürecinden sonra belli sayıda spermin baş bölgesinde de görülmeye başlamıştır. Yaptıkları immünfloresan çalışmalar sonucunda fosfotirozin proteininin kapasitasyon sürecinden önce sperm hücrelerinin %18'inde kuyruk bölgesinde, % 1'inde ise baş bölgesinde zayıf floresan sinyal verdiği görülürken, kapasitasyon sürecinden sonra sadece kuyrukta %26, baş bölgesinde ise %23 oranında çok güçlü fosfotirozin floresan sinyali görülmüştür (141). Bizim çalışmalarımız sonucunda da 18 saatlik inkübasyon sonucunda sperm hücrelerinin yaklaşık %22'sinde akrozomal bölgede p97/VCP lokalizasyonu görülmüş ve bu lokalizasyona kuyruk kısmında güçlü p97/VCP floresan sinyali eşlik etmiştir.

Ficarro ve arkadaşları bu bulgular ışığında fosfotirozin sinyalinin kuyrukta ve başta güçlü bir şekilde arttığı göstererek bu hücrelerin kapasitasyon sürecini başarılı bir şekilde geçiren hücreler olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca p97/VCP ve α -PY (Fosfotirozin) sinyalinin korele artışını da p97/VCP'nin kapasitasyon süresince fosforillendiğini destekler şekilde açıklamışlardır (141). Geussova ve ark. cAMP aktivasyonunu tetikleyen ilaçlar kullanarak yaptıkları kapasitasyon deneyleri sonucunda ise p97/VCP ve α -PY ekspresyonunun korele bir şekilde artışını p97/VCP'nin sperm hücrelerinde cAMP-bağımlı tirozin kinaz yolağında aktif rol oynadığı şekline açıklamışlardır (11). Bu bulgular tezimin p97/VCP ile ilgili bulgularıyla oldukça uyumludur. Kapasitasyon memeli sperminin fertilizasyonu gerçekleştirebilmesi için gereklidir. Bu olay sırasında birçok proteinin tirozin kuyrukları fosforile olur ve bu sırada spermin hareketinin arttığı gözlenmiştir. Kapasitasyon akrozomal reaksiyon için de gereklidir. Bu derece fertilizasyon için önemli bir olayda p97/VCP'nin de fosforile olduğunu bilmek, bu proteinin kapasitasyon için ne kadar önemli bir protein olduğunu göstermektedir. Biz de çalışmamızda sperm hücrelerinde p97/VCP'nin özellikle de baş ve kuyruk bölgelerinde var olduğunun gösterilmesiyle literatürde kanıtlanmaya çalışılan insan sperm kapasitasyonu, tirozin fosforilasyonu ve p97/VCP arasındaki ilişkiyi destelemiş olduk.

Tezimde kapasitasyon deneyleri sonucunda p97/VCP ile ilgili elde ettiğimiz sonuç; p97/VCP insan sperm kapasitasyonu sürecinde ve akrozomal reaksiyonda rol oynar ve kapasitasyon süresince p97/VCP'nin fosforile olduğunu destekler şeklindedir.

p97/VCP'nin insan sperm kapasitasyonunda rol oynadığına dair ön bulgular elde ettikten sonra, bu bulguları doğrulamak ve bu proteininin UPS ile ilişkisini ispatlamak amacı ile kapasitasyon deneylerine UPS inhibitörleri ile devam edilmiştir. UPS inhibitörlerinden MG-132, Epoksimisin ve CLBL aynı oranlarda kullanılarak bir inhibitör karışımı elde edilmiş ve böylece proteazom sisteminin hem tripsin, hem kemotripsin hem de kaspaz aktivitesi inhibe edilmesi hedeflenmiştir. Proteazom inhibitörlerinin hangi dozda daha etkin olduğunu anlayabilmek için düşük (10 mM) ve yüksek (100 mM) olmak üzere iki farklı konsantrasyon belirlenmiştir. Bu inhibitör konsantrasyonları Sutovsky labında birlikte çalıştığımız Kerns ve ark. (140), Zigo ve ark. (142) ve yine Zigo ve ark. (143) yaptıkları çalışmalar referans alınarak belirlenmiştir.

Zigo ve ark. yaptıkları çalışmada (143) UPS ile ilişkisi olduğu bilinen P47/laktadherin proteininin kapasitasyon boyunca UPS sistemi ile ilişkisini ortaya koyabilmeyi hedeflemiştir. Bu çalışmada, kapasitasyon ile laktadherinin ekspresyonunun arttığını, proteazom inhibitörlerin etkisi ile de bu ekspresyonda bir düşüş olduğu ve de bu düşüşün 100 mM konsantrasyon inhibitör kullanıldığında daha fazla olduğu vurgulanmıştır. P47/laktadherin'in kapasitasyondan sonra akrozomal dış membrandan izole edildiğini gösteren çalışmalar sonucunda (144-148), bu proteinin kapasitasyon ve akrozomal ekzositoz için gerekli olaylar zincirini ve akrozomal matriks kırılmasını tetiklemede rol oynadığını göstermişlerdir. Bu proteinin kapasitasyon sürecindeki ekspresyon artışı ve proteazomal inhibitörler varlığındaki ekspresyonun azalması, bizim p97/VCP ve kapasitasyon süreci ile elde ettiğimiz bulgular ile uyumludur. Kısacası, laktadherin gibi p97/VCP de kapasitasyon sürecinde rol oynayan bir proteindir.

p97/VCP'nin kapasitasyon sürecinde rol oynadığını gösteren bulgularımızı daha da güçlendirmek amacı ile kapasitasyon deneylerinde proteazom inhibitörlerine ek olarak p97/VCP'nin spesifik inhibitörü olan DBEQ kullanılmıştır. Literatürde DBEQ'nun p97/VCP'nin aktivitesini inhibe ettiğine dair birçok çalışma vardır fakat p97/VCP ve DBEQ'nun sperm kapasitasyon süreci ile ilişkisini açıklayan herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Hem literatürde ki bu eksikliği kapatmak hem de p97/VCP ve DBEQ'nun sperm kapasitasyon süreci ile ilişkisini ortaya koyabilmek amacı ile sperm hücrelerinde kapasitasyonu indüklemek için yapılan deneylerde kapasitasyon

medyumuna düşük (10 mM) ve yüksek (100 mM) konsantrasyonlarda DBEQ eklenmiştir. Sonuç olarak p97/VCP'nin ekspresyonunun kapasitasyon sürecinde arttığını gösteren immünfloresan, flow sitometrik ve Western blot çalışmalarımızın yanı sıra DBEQ kullanılan gruplarda p97/VCP ekspresyonunun azaldığı özellikle de yüksek konsantrasyonlu DBEQ kullanıldığında bu azalmanın oldukça anlamlı olduğu görülmüştür. Kapasitasyon sürecinde aktivasyonunun DBEQ ile inhibe edilmesi ile ekspresyonunun dikkat çekici bir şekilde azalması p97/VCP'nin insan sperm kapasitasyonu sürecinde rol oynadığını bir kez daha kanıtlamıştır.

Tezimden elde ettiğimiz şu ana kadar yukarıda açıkladığım bulgular ışığında p97/VCP'nin insan sperm kapasitasyonu sürecinde rol oynadığı ve de bu süreçte UPS ile etkileşime girip 26S proteazom ile birlikte çalıştığı bilgisi literatüre kazandırılmıştır.

UPS sistemi ve kapasitasyon süreci arasındaki ilişkiyi aydınlatmak amacı ile yaptığımız kapasitasyon deneyleri çalışmalarına p97/VCP'den sonra ikinci hedef proteinimiz olan NEDL2 ile devam edilmiştir. NEDL2 ile ilgili literatürde sadece beş yayın bulunmakta ve bu yayınlardan üç tanesi sinir sistemi ile ilgili çalışmalar olup erkek üreme sisteminde bu proteinin fonksiyonu ile ilgili bir bilgi bulunmamaktadır (100-104). Literatürde ki var olan çalışmaların sonucunda NEDL2'nin enterik sinir sistemi ve gelişiminde (102, 104), Hirschsprung hastalığında (101), böbrek gelişiminde (102), mitozun sonunu ve yeni G1 fazının başlangıcını belirten önemli bir geçiş noktası olarak adlandırılan mitotik çıkış olayında (103), metefazdan anafaza geçiş olayında düzenleyici olarak (103), tümörögenizde (103), p73 geninin aktivasyonunda (100) rol oynadığı görülmektedir. Lu ve ark. yaptıkları çalışma sonucunda NEDL2'nin mitotik çıkış olayı boyunca APC/C-Cdh1 geni tarafından yıkıldığını ve ubikütilendiğini vurgulamışlardır (103). Sutovsky ve ekibinin yaptıkları henüz yayınlanmamış çalışmalarında ise NEDL2'nin gametogenez ve fertilizasyonda rol oynayabileceği ve de sperm/oosit proteinlerinin bağlanmasında PAWP gibi ya da PAWP ile birlikte rol oynayabileceği söylenmiştir. Tüm bu bilgiler ışığında literatürde ki NEDL2 ve üreme sistemi arasındaki ilişki hakkındaki bilgi eksikliğini tamamlayabilmek adına tezimde kapasitasyon sürecinde NEDL2'nin de rol alabileceği araştırılmıştır.

Kapasitasyon sürecinden önce NEDL2'nin sperm hücrelerinde sadece spermin kuyruğunda olmak üzere iki farklı boyanma paterni gösterdiği görülmüştür. NEDL2'nin kapasitasyon sürecinde hangi saatlerde nasıl bir değişiklik geçirdiğini anlamak için ise CM kullanılarak 5 ve 18 saat olmak üzere iki farklı inkübasyon süresi kullanılmıştır. Bu gruplara ek olarak spontan olarak kapasitasyona giren sperm hücrelerinde ki NEDL2 ekspresyon ve lokalizasyonunu görmek için ise sperm hücreleri 18 saat NCM ile inkübe edilmiştir. 0. saatte bazı hücrelerde kuyruk esas parçasına göre kuyruk orta parçasında daha yoğun olarak gözlenen NEDL2 ekspresyonu, bazı hücrelerde ise kuyruk esas parça ve kuyruk orta parçada eşit şiddette ekspresyon göstermiştir. NEDL2'nin ilk defa NCM grubunda tüm sperm hücrelerinin %2'sinde olmak üzere 0. saatten farklı olmak üzere yeni bir boyanma paterni gösterdiği görülmüştür. NEDL2'nin sperm kuyruk orta parçasında dikkat çekici bir şekilde azaldığı bu yeni boyanma paterni 5 saatlik inkübasyon süresi sonucunda anlamlı bir şekilde artarak tüm hücrelerin %13'ünü oluşturmaktadır. 18 saatlik inkübasyon sonucunda ise 5. saat grubuna göre bu paterne ait hücreler çok daha anlamlı bir şekilde artarak tüm hücrelerin %27'sini oluşturduğu görülmüştür. Ayrıca 18 saatlik inkübasyon sonucunda görülen bu yeni boyanma paternine ait hücrelerin bazılarında kuyruk esas parça bölümünde de NEDL2 immün boyanma şiddetinin azaldığı görülmektedir. Sutovsky laboratuvarında yaptığımız çalışmalarda ve Sutovsky'nin sperm kapasitasyonu ve UPS sistemi hakkındaki çalışmaları sonucunda edindiğimiz bilgi sperm hücrelerinin ortalama % 20-%25'inin kapasitasyon sürecini başarı bir şekilde tamamlar şeklindedir. Tüm bu bilgiler ışığında NEDL2'nin kapasitasyon sürecindeki rolü hakkında elde ettiğimiz sonuç NCM grubu ile ortaya çıkan bu yeni paternin kapasitasyona uğramış hücrelerde olduğu şeklindedir. Sonuç olarak, NEDL2'nin lokalizasyonu ve ekspresyonu kapasitasyon sürecinde değişikliğe uğrar ve kapasitasyon süresi boyunca NEDL2 ekspresyonu 0.saatten 18.saate doğru azalma gösterir.

NEDL2'nin insan sperm kapasitasyonu boyunca kuyruk kısmında esas parçada ve daha dikkat çekici bir şekilde kuyruk orta parçada azalması bu proteinin kapasitasyonun önemli bir aşaması olan sperm hareketliliğinin artması yani hiperaktivasyonunda rol oynadığı şeklinde yorumlanmıştır. Bu azalmanın özellikle sperm hareketliliği için enerji kaynağı olan mitokondriyonların olduğu orta parçada olması NEDL2'nin kapasitasyon sürecinde sperm hiperaktivasyonunda rol aldığını

desteklemektedir. NEDL2 ve mitokondriyal bölge ile ilgili planladığımız ilerleyen çalışmalar bu konu hakkında daha aydınlatıcı bilgiler elde etmemizi sağlayacaktır. Tezimden elde ettiğimiz bu sonuçlar ile NEDL2 ile ilgili literatüre kazandırdığımız bir diğer önemli bilgi şu şekildedir; NEDL2' nin insan sperm kapasitasyonu boyunca sperm hiperaktivasyonunda rol oynayabileceği şeklindedir.

NEDL2'nun kapasitasyon sürecindeki rolünü desteklemek ve UPS, 26S proteazom ile ilişkisini daha net anlayabilmek amacı ile proteazom sistemi inhibitörleri ile de inkübasyon deneyleri yapılmıştır. UPS ile NEDL2 arasındaki ilişkiyi daha net anlayabilmek için p97/VCP deneylerinde olduğu gibi proteazom sistemi inhibitörleri 10 mM ve 100 mM olmak üzere iki farklı konsantrasyonda kullanılmıştır. Proteazom sistemine ait inhibitörler kullanılarak yapılan deneyler sonucunda NEDL2 ekspresyonunun arttığı ve de bu artışın 100 mM inhibitör karışımı kullanılarak yapılan deneylerde 10 mM 26S inhibisyonuna göre anlamlı bir şekilde arttığı görülmüştür. Kapasitasyon süresi boyunca azalan NEDL2 ekspresyonunun 26S inhibitörleri varlığında anlamlı bir şekilde artması NEDL2'nun 26S proteazomu ile etkileşime girdiğine dair güçlü bir kanıttır. UPS'in inhibisyonu sonucunda elde ettiğimiz çıkarım şu şekildedir; NEDL2 kapasitasyon süresi boyunca UPS ile ilişkilidir.

Zigo ve ark. yaptıkları çalışmada (143) UPS ile ilişkisi olduğu bilinen P47/laktadherin, ACRBP, ADAM5 ve SPINK2 proteinlerinin kapasitasyon boyunca UPS sistemi ile ilişkisini ortaya koyabilmek için kapasitasyon deneyleri yapmış ve sonuç olarak laktadherinin ve ADAM 5' in ekspresyonunun kapasitasyon ile arttığını, proteazomla inhibitörlerin ise bu ekspresyonda bir düşüş sağladığı ve de bu düşüşün 100 mM konsantrasyon kullanıldığında daha fazla olduğunu vurgulamışlardır. Bu bulgular ışığında laktadherinin kapasitasyon sürecinde rol oynadığını ve de UPS'e bağlanarak protezomla ilişki kurduğunu vurgulamışlardır. ACRBP ile de kapasitasyon deneyleri yapılmış ve de kapasitasyon süreci boyunca bu proteinin de dikkat çekici bir şekilde ekspresyonunun arttığı flow sitometrik ve de Western blot yöntemi ile gösterilmiştir. Fakat bu proteininin ekspresyonu proteazomal inhibitörler bu artışın daha fazla arttıgı saptanmıştır. Kapasitasyon boyunca bu proteininin aktivasyonu ile spermin hareketliliğinde ve hiperaktivasyonunda etkili olduğu ileri sürülmüş ve de protezomal inhibitörlerin varlığında ekspresyonunun değişmesi ile de 26S protezom

ile ilişkili olduğu kanıtlanmıştır. SPINK 2 ile yapılan kapasitasyon deneyleri sonucunda ise insan sperminde iki farklı boyanma paterni görülmüş ve de birinci boyanma paterninde kapasitasyonla proteinin ekspresyonunda minimal bir azalma ve de yüksek konsantrasyonlu inhibisyon sonucunda ise tekrar minimal bir artış görülmüştür. İkinci boyanma paternine ait sonuçlarda ise çok anlamlı sonuçlar içermemektedir. SPINK2'nin ikinci boyanma paterninin inhibitörler ile arttığı görülmüştür fakat bu artış laktadherinde olduğu gibi anlamlı bir artış değildir. İnhibitör eklenerek yapılan inkübasyon sonucunda ise düşük konsantrasyonlu inhibisyonunda minimal bir artış, yüksek konsantrasyonlu inhibisyonunda ise ilginç olarak minimal bir artış görülmüştür.

Tüm bu bulgular ışığında Zigo ve arkadaşları yaptıkları çalışmada (143) UPS ile ilişkisi olduğu bilinen P47/laktadherin, ACRBP, ADAM5 ve SPINK2 proteinlerinin, proteazom sistemi inhibitörlerinin varlığında ekspresyonlarındaki anlamlı değişiklikleri bu proteinlerin kapasitasyon süresince UPS'de aktif rol alarak 26S proteazomu ile ilişki kurmaktadır şeklinde vurgulamışlardır. Yine Zigo ve arkadaşlarının yaptıkları başka bir çalışmada da (142) DQH, AQN, AWN ve PSP gibi bazı proteinlerin sperm kapasitasyon sürecinde aktif rol oynadıkları ve de MG-132 varlığında ekspresyonlarında anlamlı artış ya da anlamlı azalmalar olduğunu söyleyerek, bu proteinlerin UPS ile ilişkilerinin olduğunu vurgulamışlardır. Literatürdeki bu sonuçlar, çalışmamızdaki NEDL2 sonuçlarıyla benzerlik göstermesi NEDL2'nin kapasitasyon süreci ve de UPS ile ilişkisini destekler niteliktedir.

Tezimden elde ettiğimiz tüm bu bulgular ışığında NEDL2'nun insan sperm kapasitasyonu sürecinde rol oynadığını ve de bu süreçte UPS ile etkileşime girip 26S proteazom ile birlikte çalışabileceği bilgisi literatüre kazandırılmıştır.

Tezimin UPS sistemi ve kapasitasyon süreci arasındaki ilişkiyi aydınlatmak amacı ile yaptığımız kapasitasyon deneyleri çalışmalarına p97/VCP ve NEDL2'e ek olarak PAWP ile devam edilmiştir. Literatürde sperm morfolojisi ve sperm hareketliliğinin PAWP ile korelasyonunu gösteren (105), fertilizasyon ve PAWP ilişkisini araştıran (106), oosit aktivasyonu ve PAWP ilişkisini aydınlatan (107) ve infertilite ile olan ilişkisini açıklayan çalışmalar (108) mevcuttur. Sutovsky ve arkd. PAWP'ın fertilizasyon boyunca mayotik dağılım ve pronükleer gelişimde rol oynadığını bulmuşlardır (13). PAWP ekspresyonunun fertilizasyon ve yardımcı üreme

teknikleri ile ilişkili olduğu (12, 17), PAWP'ın kalsiyum osilasyonu ve oosit aktivasyonu ile ilişkisi olduğu (109), spermiyogenez sürecinde PAWP'ın etkin olduğu (110), PAWP ile sperm kalitesi arasındaki ilişki (111) ve de PAWP'nin testiküler gelişimdeki rolünü gösteren (112) birçok çalışma mevcuttur.

Erkek üreme sistemi ile ilgili literatürde birçok çalışma olmasına rağmen sperm kapasitasyonu ve PAWP arasındaki ilişkiyi inceleyen sadece bir tane çalışma mevcuttur (149). UPS ve PAWP ile ilgili de literatürde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Literatürde ki bu eksikliğin kapatılması açısından tezimin sperm kapasitasyonu, UPS ve PAWP arasındaki ilişkiyi açıklayan bu kısmı orijinal bulgular içermektedir.

Kapasitasyon sürecinden önce PAWP'ın sperm hücrelerinde sadece spermin kuyruğunda, bağlantı parçasında ve postakrozomal bölgede çift çizgi halinde olmak üzere iki farklı boyanma paterni gösterdiği görülmüştür. PAWP'ın kapasitasyon sürecinde hangi saatlerde nasıl bir değişiklik geçirdiğini anlamak için ise CM kullanılarak 5 ve 18 saat olmak üzere iki farklı inkübasyon süresi kullanılmıştır. Bu gruplara ek olarak spontan olarak kapasitasyona giren sperm hücrelerinde ki PAWP ekspresyon ve lokalizasyonunu görmek için ise sperm hücreleri 18 saat NCM ile inkübe edilmiştir. Yapılan kapasitasyon deneyleri sonucunda PAWP'ın NCM grubu ile birlikte yeni bir boyanma paterni gösterdiği görülmüştür. NCM grubunda tüm sperm hücreleri arasında yaklaşık %1 oranında görülen bu yeni boyanma paterninde hücrelerin bir kısmının kuyruk orta parçasında PAWP ekspresyonunun azaldığı, bazılarında ise kuyruk esas parçada dikkat çekici bir şekilde PAWP ekspresyonunun arttığı görülmüştür. Kapasitasyon sürecinden sonra ise yapılan inkübasyon deneylerinde 5. saatte NCM grubu ile görülmeye başlanan yeni boyanma paternine ait hücrelerin yüzdesinin NCM grubuna göre artış göstererek %5'e yükseldiği PAWP ile ilgili elde ettiğimiz ilk orijinal bulgudur.

CM ile 18 saat yapılan inkübasyon deneyleri sonucunda ise kuyruk esas parçada bariz bir şekilde artan PAWP ekspresyonuna eşlik eden kuyruk orta parçadaki PAWP ekspresyonunun azaldığı hücrelerin yüzdesi ise 5.saate göre artarak %14 olmuştur. Kapasitasyon deneyleri boyunca 0. saatten 18. saate doğru PAWP ekspresyonunda ve lokalizasyonunda değişiklik olduğuna dair elde ettiğimiz bulgular

da literatüre katkı sağlayacaktır. Kuyruk esas bölge boyunca artan, kuyruk orta parça boyunca da azalan PAWP ekspresyonu gösteren sperm hücrelerinin kapasitasyona uğrayan hücreler olduğu kanısına varılmıştır. Kuyruk esas parçadaki artışın insan sperm kapasitasyonun önemli bir basamağı olan spermin hiperaktivasyonunda PAWP'ın da etkili olabileceği ve de kuyruk orta parçadaki azalmanında sperm hareketliliği için enerji kaynağı olan mitokondriyonların olduğu orta parçada olması PAWP'nin kapasitasyon sürecinde sperm hiperaktivasyonunda rol alabileceğini desteklemektedir. NEDL2' de olduğu gibi PAWP ve mitokondriyal bölge ile ilgili planladığımız ilerleyen çalışmalar bu konu hakkında daha aydınlatıcı bilgiler elde etmemizi sağlayacaktır.

Fakat daha önce de vurguladığımız gibi başarılı bir kapasitasyon sürecinde tüm spermlerin yaklaşık en az % 20-25'i kapasitasyona uğrarlar. Bu bilgi ışığında 18 saatlik inkübasyon grubunda kapasitasyonun belirteci olabileceğini düşündüğümüz hücrelerin en fazla %14 olması sonucunda PAWP'ın tüm kapasite olan sperm hücrelerinde ekspresyon ve lokalizasyon açısından değişiklik yapmadığı kanısına varılmıştır. Çünkü kapasitasyon deneylerinde aynı örneklerin farklı alikuatları kullanılarak p97/VCP ve NEDL2 ile deneyler yapılmış ve de bu örneklerde kapasite olmuş hücrelerin sergilediğini düşündüğümüz boyanma paternlerinin tüm hücrelerin p97/VCP için %22'sini, NEDL2 için ise tüm hücrelerin %27'sini oluşturduğu gözlenmiştir.

Tezimden elde ettiğimiz PAWP ile ilgili bu önemli bulgular sonucunda PAWP ile ilgili literatüre kazandırdığımız bir diğer önemli bilgi şu şekildedir; PAWP insan sperm kapasitasyonu boyunca belli aşamalarda ve sperm hiperaktivasyonunda rol oynayabilir fakat sperm kapasitasyon başarısını ve niteliğini belirleyebilecek bir marker değildir.

Tezimden elde ettiğimiz bu orijinal bulgu literatürde PAWP ve insan sperm kapasitasyonu ile ilgili tek çalışma olan Tanhael ve ark.'nın çalışmaları ile de oldukça uyumluluk göstermektedir (149). Tanhael ve ark. yaptıkları çalışmada dansite gradient yöntemi ile yıkanan sperm hücreleri kontrol grubu olarak kullanılmış, kapasitasyonu indükleyen medyum kullanılarak inkübe edilen sperm hücreleri ikinci grubu ve de akrozomal reaksiyonu indükleyen ajanlar kullanılarak oluşturulan grup ise üçüncü

grubu oluşturmuştur. Fakat yapılan deneyler sonucunda her üç grup arasında PAWP ekspresyonu açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır.

PAWP'ın kapasitasyon sürecindeki rolünü belirledikten sonra UPS ile olan ilişkisini aydınlatabilmek amaçlanmıştır. Kapasitasyon için inkübasyon sürecinde CM içerisine proteazom sistemi inhibitörlerinden MG-132, Epoksimisin ve CLBL eklenerek inkübasyon deneyleri yapılmıştır. UPS proteazom sistemi ile PAWP arasındaki ilişkiyi daha net anlayabilmek için p97/VCP ve NEDL2 deneylerinde olduğu gibi proteazom sistemi inhibitörleri 10 mM ve 100 mM olmak üzere iki farklı konsantrasyonda kullanılmıştır. Proteazom sistemine ait inhibitörler kullanılarak yapılan deneyler sonucunda PAWP ekspresyonunun arttığı ve de bu artışın 100 mM inhibitör karışımı kullanılarak yapılan deneylerde 10 mM 26S inhibisyonuna göre minimal bir şekilde arttığı görölmüştür. Kapasitasyon süresi boyunca 0. saatten 18.saate doğru PAWP ekspresyonunda artış saptansa da bu artışın kapasitasyon süreci açısından anlamlı olmadığı saptanmıştır. PAWP ekspresyonunun proteazom inhibitörleri varlığındaki minimal artışı da anlamlı bulunmamıştır.

Tezimden elde ettiğimiz tüm bu bulgular ışığında PAWP'ın insan sperm kapasitasyonu sürecindeki rolüne ve bu süreçte UPS ile etkileşime girip 26S proteazom ile birlikte çalışıp çalışmadığı hakkında net bir bilgi edilememiştir.

Kapasitasyon deneyleri sonucunda PAWP proteini ile yapılan deneylerde bazı hücrelerde PAWP lokalizasyon ve ekspresyonunun değişmiş olması fakat anlamlı sonuçlar elde edilememesi, kullandığımız sperm sayısı artırılarak deneylere devam edilebileceği konusunu gündeme getirmiştir. Sonuç olarak PAWP ile ilgili net bir sonuca varılamasa da yaptığım deneylerin ileriki çalışmalarımız için referans oluşturabileceği düşünölmektedir. Ayrıca her üç proteinin kapasitasyon sürecindeki rolünü aydınlatmak için yaptığımız deneylerde grup sayısının fazla olması ve de insan sperm ejakölatında diğer birçok memelide olduğu gibi (domuz, inek vs.) sperm volöminün dolayısı ile de sperm konsantrasyonunun yüksek olmaması nedeni ile her deney için kısıtlı sayıda sperm hücresi elde edebilmemizden dolayı ileriki çalışmalarımızda insan sperm kapasitasyonu ile ilgili projelerde deney grup sayısının daha minimize edilmesi gerektiği yönünde kanıya varılmıştır.

Tezimde yapmış olduğum kapasitasyon deneylerinde proteazom inhibitörlerini çözdürmek için kullandığımız DMSO'nun kapasitasyon sürecinde toksik etkisinin olup olmadığını anlayabilmek için CM ile yapılan inkübasyon deneylerine 100 mM konsantrasyonda DMSO eklenmiş ve 18 saat inkübasyon süresi uygulanmıştır. Yapılan deneyler sonucunda DMSO gruplarında p97/VCP, PAWP ve NEDL2 ekspresyonlarına flow sitometrik ve Western blot yöntemleri ile bakılmıştır. Sonuç olarak; her üç protein de ekspresyonunda DMSO grubu ile 18 saat inkübasyon grubu arasında anlamlı fark bulunamamıştır. Bu sonuçlarımız literatürde proteazom inhibitörlerinin DMSO ile çözdürülmesi ile elde edilen verilerle uyumluluk göstermektedir (140-143).

Tezimde insan sperm kapasitasyonu boyunca akrozomal ekzositoz süreci hakkında bilgi edinebilmek ve de proteazomal inhibitörlerin akrozomal ekzositoz üzerine etkisine PSA ekspresyonunun flow sitometrik yöntemle ölçülmesi metodu ile bakılmıştır. Sonuç olarak 0. saatten 18. saate doğru PSA ekspresyonunda görülen azalma proteazomal inhibitörlerin varlığında artmıştır. Sutovsky ve ekibinin de akrozomal örtülerin yeniden şekillenmesi olayı üzerine birçok çalışması vardır (15, 140, 142, 143). Domuz spermi akrozomal markeri PNA ile yaptıkları çalışmalarda PNA ekspresyonunun kapasitasyon süresince azaldığını, proteazomal inhibitörler varlığında ise arttığını vurgulamışlardır (142, 143). Akrozom dış membranı üzerinde var olan sakkarit moleküllerine bağlanan PNA'nin floresan yoğunluğunun azalması ile akrozomal örtülerin yeniden şekillenmesi arasında yüksek pozitif korelasyon olduğunu, kapasitasyon sürecinin spermi akrozomal reaksiyona hazırladığını söylemişlerdir. Ayrıca proteazomal inhibitörlerin PNA ekspresyonda artışa neden olmasını da, proteazomal aktivitenin sperm membranının yeniden şekillenmesinde kapasitasyon boyunca etkili olduğu şeklinde açıklamışlardır (140). Çalışmamızdaki kapasitasyon ve inhibitörler varlığındaki PSA bulgularımız Sutovsky ve ekibinin bulgularıyla uyumluluk göstermektedir.

Ayrıca UPS ile ilişkili olan ve de tezimde çalıştığımız p97/VCP, NEDL2 ve PAWP proteinleri ve akrozomal reaksiyonu arasındaki ilişki olup olmadığı da incelenmiştir. p97/VCP'nin kapasitasyon süreci ile lokalizasyonunun akrozomal bölgeye doğru kayması ve özellikle de anteriör ringde yoğunlaşması VCP'nin akrozomal örtülerin şekillenmesi sürecinde de rol oynadığına kanıt olmuştur.

NEDL2'nin ise baş bölgesinde lokalizasyon göstermemesi ve PAWP'ın da kapasitasyon sürecinde lokalizasyonunun değişmemesi ve de bu süreçte çok etkili bir protein olmadığının gösterilmesi nedeni ile NEDL2 ve PAWP'ın akrozomal reasyonda bir rolünün olamayacağını desteklemiştir.

Bu bulgular ışığında; PSA ekspresyonu insan sperm kapasitasyonu boyunca azalır çünkü; kapasitasyon süreci spermi akrozomal ekzositoza hazırlar. Proteazomal inhibitörler varlığında ise PSA ekspresyonu kapasitasyon gruplarına göre artar çünkü; proteazomal inhibitörler akrozomal örtülerin ayrılmasını önleyerek akrozomal reaksiyonu engellerler. UPS sistemi ile ilişkili p97/VCP proteini de spermi akrozomal reaksiyona hazırlama sürecinde etkilidir.

UbikütünProteazom Sisteminin İnfertilite Sürecindeki Rolü

Tezimin ikinci kısmında infertilite sürecinde ubikütün protezom sisteminin rolünü daha açık bir şekilde aydınlatmak amacı ile de insan sperm örnekleri ile çalışmalar yapılmıştır. Literatürde erkek üreme sistemi ve p97/VCP ile ilişkili çeşitli çalışmalar olmasına rağmen p97/VCP'nin fertilite süreci ve sperm parametreleri ile ilişkisi hakkında çalışma olmaması da literatürdeki eksik konulardan bir tanesidir. NEDL2 ile ilgili literatürde çok az sayıda çalışma mevcuttur ve de henüz üreme sistemindeki yeri açıklığa kavuşturulamamıştır. NEDL2 ile de ilgili infertilite süreci ya da sperm parametreleri (hareketlilik, morfoloji, sperm hareket hızı vs.) ile olan ilişkisi hakkında herhangi bir çalışma mevcut değildir. PAWP ve infertilite ile ilgili Sutovsky ve ark. tarafından daha önce çalışmalar yapıldığı için tezimin ikinci aşamasında PAWP infertilite ilişkisi çalışılmıştır (12).

Erkek infertilitesinde semen parametrelerinin değerlendirilmesi çok önemlidir ve infertilite tedavisi gören çiftler için kliniksel bilgi sağlar (121). Fakat infertilite ve semen parametreleri arasındaki korelasyon düşük seviyededir ve her birey için farklılıklar gösterebilir (150). Bu yüzden semenin değerlendirilmesinde ek moleküler belirteçler aranmaktadır. Sutovsky ve ark. yaptıkları çalışmada ubikütün ekspresyonunun sperm parametreleri (sayı, hareketlilik, normal morfoloji) ile ters ilişkili olduğunu ve bu sonuca dayalı olarak ubikütün sperm kalitesini belirlemede bir belirteç olabileceğini göstermişlerdir (119).

Bu çalışmada, fertil ve infertil bireylerde UPS proteinlerinden öncelikle p97/VCP'nin sperm hücrelerinde lokalizasyonu ve p97/VCP ekspresyonunun semen parametreleri ile ilişkisi incelemektedir. p97/VCP'nin insan sperminde ilk defa ekspresyonunun gösterilmesi ve bu ekspresyonun semen parametreleri ile ilişkisinin olup olmadığının incelenmesi nedeniyle çalışmamız orijinal bulgular içermektedir.

Sonuçlarımız UPS proteinlerinden, p97/VCP'nin fertil bireylerde sperm baş, boyun ve kuyruk bölgesinde lokalize olduğunu göstermiştir. Fakat bu lokalizasyonun en fazla baş bölgesinde yerleşim gösterdiği ve özellikle de infertil bireylerde p97/VCP'nin fertil bireylere göre ekspresyonun daha fazla olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar p97/VCP'nin erkek infertilitesi değerlendirilmesinde kullanılabilecek bir protein olabileceğini göstermektedir.

Bugüne kadar p97/VCP'nin sperm hücresindeki fonksiyonları ile ilgili yapılan çalışmalar çok azdır (141, 151, 152). Bu çalışmalarda da direk insan spermindeki fonksiyonu tam olarak belirlenememiştir. Kondoh ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, p97/VCP'nin bir deniz hayvanı spermelerinde değil de, spermi ovosite çeken kemoatraktan bir madde olan sperm aktive edici faktör (SAAF)'e bağlandığını göstermişlerdir (151). p97/VCP'nin başlangıçta germinal vesikül aşamasındaki ovositte lokalize olduğu ve oosit olgunlaşması için gerekli olduğu bulunmuştur. Yine aynı çalışmada, p97/VCP'nin yumurtadan salınan SAAF denilen faktörün çalışmasını düzenlediği ortaya çıkarılmıştır. p97/VCP'nin siliar ve flagellar hareket için gerekli olduğu başka bir çalışmada gösterilmiştir (152). Yalnız bu çalışma yine insan sperminde değil, deniz hayvanı sperminde siliar hareket için gerekli olan proteinlerin araştırılması sırasında p97/VCP'nin gerekliliğini ortaya koymuştur. Bizim çalışmalarımızla uyumlu olarak bu çalışmada da sperm kuyruğunda p97/VCP'nin görülmesi, p97/VCP'nin sperm hareketliliği ile ilişkisi olabileceğini göstermektedir.

NEDL2 ise fertil bireylerde sadece kuyrukta, özellikle kuyruk orta parça da güçlü bir lokalizasyon göstermiştir. Kuyruk esas parçada orta parçaya göre azalan şiddette NEDL2 ekspresyonu vardır. İnfertil bireylerde ise bu bölgelerdeki NEDL2 lokalizasyonunun yanısıra baş ya da boyun anomalisinin olduğu yerlerde de NEDL2 lokalizasyon göstermiştir. İnfertil hücrelerdeki NEDL2 ekspresyonu ise flow

sitometrik ve Western blot yöntemleri ile incelenmiş ve ekspresyonun infertil bireylerde anlamlı bir şekilde azaldığı görülmüştür.

Tüm bu bilgiler ışığında NEDL2'nin düşük kaliteli sperm yüzdesinin fazla olduğu infertil bireylere göre, yüksek kaliteli sperm yüzdesinin fazla olduğu fertil bireylerde daha fazla ekspre edildiği gösterilmiştir. p97/VCP'nin ise NEDL2'nin tam tersi olarak yüksek kaliteli sperm yüzdesinin fazla olduğu fertil bireylere göre düşük kaliteli sperm yüzdesinin fazla olduğu infertil bireylerde daha fazla ekspre edildiği gösterilmiştir. Ayrıca fertil ve infertil bireyler arasında ki p97/VCP ve NEDL2 immünoaktivite yüzdesi arasında da anlamlı fark saptanmıştır. Fertil ve infertil bireylerin p97/VCP ve NEDL2 immünoaktivite yüzdesi arasında ki fark ve bu yüzdelere semen parametreleri arasındaki ilişki bu proteinlerin erkek infertilitesini belirlemede bir belirteç olabileceğini göstermektedir.

Tezimin bu bölümü özellikle NEDL2'nin erkek üreme sistemi ile ilgili literatürde ki ilk çalışma olması ve de p97/VCP ve NEDL2'nin semen parametreleri ile ilgili korelasyonun da ilk defa gösterilmesi açısından literatüre orijinal bilgiler sunmaktadır.

Özetle, p97/VCP ve NEDL2'nin insan sperm hücrelerindeki varlığı ve fertil ile infertil bireyler arasındaki farklı ekspresyonu, p97/VCP ve NEDL2'nin sperm maturasyonu ve infertiliteyi etkileyen önemli proteinler olduğunu göstermektedir. p97/VCP ve NEDL2'nin fertil ve infertil bireylerde farklı ekspresyon göstermesi nedeniyle bu çalışmanın daha detaylı moleküler çalışmalarla desteklenerek klinikte prognozda ve ya tedavide bir belirteç olarak kullanılmaları önerilmektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez kapsamında aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir;

- 1) Kapasitasyon deneylerinde kullanılan farklı inkübasyon süreleri sonucunda in vitro insan sperm kapasitasyon deneyleri için 18 saat ideal süre olarak belirlenmiştir.
- 2) Kapasitasyon sürecinde 0. saatten 18. saate doğru anlamlı bir şekilde artan p97/VCP ekspresyonu ile kapasitasyonda p97/VCP'nin aktif rol oynadığı belirlenmiştir.
- 3) p97/VCP'nin kapasitasyon ve akrozomal reaksiyon arasında bir köprü kuran protein olduğu belirlenmiştir.
- 4) p97/VCP kapasitasyon sırasında fosforile olan tirozin gibi sperm kuyruğunda ekspresyonunu artırarak fosforile olur.
- 5) Spesifik p97/VCP inhibitörü olan DBEQ (düşük ve yüksek dozları) kapasitasyon süresince p97/VCP'nin ekspresyonunu azaltarak kapasitasyonu etkiler.
- 6) UPS inhibitörleri (düşük ve yüksek dozları) insan sperm kapasitasyon süresince p97/VCP, NEDL2, PAWP'nin ekspresyonları üzerine etki gösterirler.
- 7) NEDL2 kapasitasyon sürecinde 0. saatten 18. saate doğru anlamlı bir şekilde azalma göstermiş ve bu azalma ile bu süreçte NEDL2'nin aktif rol oynadığı belirlenmiştir.
- 8) UPS inhibitörleri NEDL2'nin kapasitasyon süreci üzerinde etkilidirler.
- 9) PAWP ekspresyonu kapasitasyon süresince anlamlı değişiklikler göstermemiştir, bu nedenle kapasitasyonda direkt olarak etkin bir molekül olamayacağı belirlenmiştir.
- 10) UPS inhibitörleri kapasitasyon süresi boyunca PAWP ekspresyonu üzerinde anlamlı bir değişiklik meydana getirmemiştir, bu nedenle PAWP kapasitasyon süresince direkt olarak 26S proteazom ile etkileşime girmeyen bir protein olabileceği belirlenmiştir.
- 11) PSA ekspresyonunun kapasitasyon süresince arttığı ve inhibitörler varlığında ekspresyonunun anlamlı bir şekilde azaldığı belirlenmiştir.

12) p97/VCP ekspresyonu infertil bireylerde fertil bireylere göre anlamlı bir şekilde artış göstermiştir.

13) p97/VCP ekspresyonu fertil ve infertil bireylere ait semen parametreleri ile negatif korelasyon göstermiştir.

14) NEDL2 ekspresyonun fertil ve infertil bireylere ait semen parametreleri ile pozitif korelasyon gösterdiği belirlenmiştir.

Bu sonuçlar ile insan sperm kapasitasyonunda ve infertilite sürecinde ubikütün proteazom sisteminin rolü aydınlatılmıştır. Tezimin çalışmalarını referans alacağımız ileride ki çalışmalarımız ile özellikle mitokondriyal bölgede ki ekspresyon değişikliklerinin nedeni net bir şekilde açıklamak hedeflenmiştir. Ayrıca PAWP ile birey sayısını artırarak yapacağımız yeni deneyler ile tezimde insan sperm kapasitasyonunda ki rolünü tam olarak açıklayamadığımız bu proteinin kapasitasyon ve UPS ile ilgili ilişkisi net bir şekilde ortaya koyulmaya çalışılacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Ciechanover A, Iwai K. The ubiquitin system: from basic mechanisms to the patient bed, *IUBMB Life.*, 2004, 56:193–201.
2. Varshavsky A. Regulated protein degradation, *Trends Biochem Sci.*, 2005, 30:283–286.
3. Zimmerman S, Sutovsky P. The sperm proteasome during sperm capacitation and fertilization, *J Reprod Immunol.*, 2009, 83:19-25
4. Saitoh Y, Sawada H, Yokosawa H. High-molecular-weight protease complexes (proteasomes) of sperm of the ascidian, *Halocynthia roretzi*: isolation, characterization, and physiological roles in fertilization, *Dev Biol.*, 1993, 158:238–244.
5. Sutovsky P, Manandhar G, McCauley TC, Caamano JN, Sutovsky M, Thompson WE, Day BN. Proteasomal interference prevents zona pellucida penetration and fertilization in mammals, *Biol Reprod.*, 2004, 71:1625–1637.
6. Yokota N, Sawada H. Sperm proteasomes are responsible for the acrosome reaction and sperm penetration of the vitelline envelope during fertilization of the sea urchin *Pseudocentrotus depressus*, *Dev Biol.*, 2007, 308:222–231.
7. Sasanami T, Sugiura K, Tokumoto T, Yoshizaki N, Dohra H, Nishio S, Mizushima S, Hiyama G, Matsuda T. Sperm proteasome degrades egg envelope glycoprotein ZP1 during fertilization of Japanese quail (*Coturnix japonica*), *Reproduction.*, 2012, 144:423–431.
8. Signorelli J, Diaz ES, Morales P. Kinases, phosphatases and proteases during sperm capacitation, *Cell Tissue Res.*, 2012, 349:765–782.

9. Sawada H, Sakai N, Abe Y, Tanaka E, Takahashi Y, Fujino J, Kodama E, Takizawa S, Yokosawa H. Extracellular ubiquitination and proteasome mediated degradation of the ascidian sperm receptor, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2002, 99:1223–1228.
10. Sawada H, Takahashi Y, Fujino J, Flores SY, Yokosawa H. Localization and roles in fertilization of sperm proteasomes in the ascidian *Halocynthia roretzi*, *Mol Reprod Dev.*, 2002, 62:271–276.
11. Geussova G, Kalab P, Peknicova J. Valosine containing protein is a substrate of cAMP-activated boar sperm tyrosine kinase, *Mol Reprod Dev.*, 2002, 63(3):366-75
12. Aarabi M, Balakier H, Bashar S, Moskovtsev SI, Sutovsky P, Librach CL, Oko R. Sperm content of postacrosomal WW binding protein is related to fertilization outcomes in patients undergoing assisted reproductive technology, *Fertil Steril.*, 2014, 102(2):440-447.
13. Wu AT, Sutovsky P, Manandhar G, Xu W, Katayama M, Day BN, et al. PAWP, a sperm-specific WW domain-binding protein, promotes meiotic resumption and pronuclear development during fertilization, *J Biol Chem.*, 2007, 282:12164–75.
14. Pickart, C.M. Mechanism underlying ubiquitination, *Annu. Rev. Biochem.*, 2001, 70: 503-533.
15. Kerns K., Morales P., Sutovsky P. Regulation of Sperm Capacitation by the 26S Proteasome: An Emerging New Paradigm in Spermatology, *Biology of Reproduction.*, 2016, 94(5):117, 1–9
16. George, T. C., Basiji, D. A., Hall, B. E., Lynch, D. H., Ortyn, W. E., Perry, D. J., Seo, M. J., Zimmerman, C. A. and Morrissey, P. J. Distinguishing modes of cell death using the Image Stream multispectral imaging flow cytometer, *Cytometry.*, 2004, A 59(2):237–245
17. Buckman C, George TC, Friend S, Sutovsky M, Miranda-Vizuete A, Ozanon C, Morrissey P, Sutovsky P. High throughput, parallel imaging and biomarker

quantification of human spermatozoa by Image Stream flow cytometry, *Syst Biol Reprod Med.*, 2009, 55: 244251.

18. Woo-Sung Kwon W.S., Rahman M.S. Ryu D.Y., Park Y.J., Pang M.G. Increased male fertility using fertility-related biomarkers, *Sci Rep.*, 2015, 5: 15654.

19. Sadler TW, Langman Jan. Medical Embriyology. Lippincott Williams-Wilkins, 2010, 27-31.

20. Gartner LP, Hiatt JL. Color Textbook of Histology: Pennsylvania, W.B. Saunders Company, 1997, 406-412.

21. Ross MH, Kaye GI, Pawlina W. Histology: a Text and Atlas, 4th ed: Lippincott WilliamsWilkins. Philedelphia, 2003, pp 689-696.

22. Carlos Junqueira L, Carneiro Jose, Kelley Robert O. Temel Histoloji: a Lange medical book, 1995, sf407-413

23. Zülfikaroğlu G, Özgür H, Polat S. Kapasitasyonun moleküler temelleri. Arşiv. 2010, 19: 12.

24. Nikolai N. Nikolsky. Cell and Tissue Biology. Publisher: Pleiades Publishing, Ltd. Zoom. ISSN PRINT: 1990-519X ISSN ONLINE: 1990-5203.

25. Abraham L. Kierszenbaum, Yayınevi: Palme Yayıncılık-Akademik Kitaplar

26. Gulaya NM, Margitich VM. Phospholipid composition of human sperm and seminal plasma in relation to sperm fertility, *Arch Androl.*, 2001, 46(3):169-175.

27. Poulos A, White IG. The phospholipid composition of human spermatozoa and seminal plasma, *J Reprod Fertil.*, 1973, 35(2):265-72.

28. Niu DM, Wang JJ. Lipids in the sperm plasma membrane and their role in fertilization, *Zhonghua Nan Ke Xue*, Chinese, 2009, 15(7):651-5. Review.

29. Trubner M, Glander HJ, Schaller J. Localization of adhesion molecules on human spermatozoa by fluorescence microscopy, *Andrologia.*, 1997, Sep-Oct;29(5):253-60.
30. Katz AM, Rosenthal D, Sauder DN. Cell adhesion molecules. Structure, function, and implication in a variety of cutaneous and other pathologic conditions, *Int J Dermatol.*, 1991, Mar;30(3):153-60.
31. Salicioni AM, Platt MD, Wertheimer EV, et. al. Signalling pathways involved in sperm capacitation, *Soc Reprod Fertil Suppl.*, 2007, 65: 245-59. Review.
32. Visconti PE, Bailey JL, Moore GD, et al. Capacitation of mouse spermatozoa: Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation, *Development.*, 1995a, 121: 1129-1150.
33. Austin CR. The capacitation of the mammalian sperm, *Nature.*, 1952, 170:326
34. Chang MC. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes, *Nature.*, 1951, 168(4277):697-8.
35. Keith LM, Persaud TVN. Nobel kitapevi. İnsan embriyolojisi giriş, 2008.
36. Moghissi GS: The function of the cervix in human reproduction, Year Book Medical Publishers, Chicago, 1984.
37. Mc Rorie, Williams WL. Biochemistry of mammalian fertilization, *Ann. Rev. Biochem.*, 1974, 43: 777.
38. Rachel Gibbons, Susan A, Adeoya-Osiguwa Lynn, Fraser R. A mouse sperm decapacitation factor receptor is phosphatidylethanolamine-binding protein 1, *Reproduction.*, 2005, 130 497508.
39. Brewis IA, Moore HD, Fraser LR, et al. Molecular mechanisms during sperm capacitation, *Hum Fertil (Camb).*, 2005, 8(4):253-61.

40. Lefebvre R, Suarez SS. Effect of capacitation on bull sperm binding to homologous oviductal epithelium, *Biol Reprod.*, 1996, 54: 575–582
41. Demott RP, Suarez SS. Hyperactivated sperm progress in the mouse oviduct, *Biol Reprod.*, 1992, 46: 779–785.
42. Pacey AA, Davies N, Warren MA, Barratt CL, Cooke ID. Hyperactivation may assist human spermatozoa to detach from intimate association with the endosalpinx, *Hum Reprod.*, 1995, 10: 2603–2609.
43. Carrasco LC, Coy P, Aviles M, Gadea J, Romar R. Glycosidase determination in bovine oviducal fluid at the follicular and luteal phases of the oestrous cycle, *Reprod Fertil Dev.*, 2008, 20: 808–817.
44. Ekhlas-Hundrieser M, Sinowatz F, Greiser De Wilke I, Waberski D, Topfer-Petersen E. Expression of spermadhesin genes in porcine male and female reproductive tracts, *Mol Reprod Dev.*, 2002, 61: 32–41.
45. Bi Y, Xu WM, Wong HY, Zhu H, Zhou ZM, Chan HC, Sha JH. NYDSP27, a novel intrinsic decapacitation factor in sperm, *Asian J Androl.*, 2009, 11: 229–239.
46. Alexander J, Travis and Gregory S. Kopf. The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential of mammalian spermatozoa, *Clin Invest.*, 2002, 110(6): 731–736.
47. Visconti PE, et al. Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm. β Cyclodextrins initiate transmembrane signaling leading to an increase in protein tyrosine phosphorylation and capacitation, *J Biol Chem.*, 1999, 274:3235–3242.
48. Visconti PE, et al. Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm: cholesterol release signals an increase in protein tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation, *Dev Biol.*, 1999, 214:429–443

49. Cross NL. Role of cholesterol in sperm capacitation, *Biol Reprod.*, 1998, 59: 7–11.
50. Lin Y, Kan FW. Regionalization and redistribution of membrane phospholipids and cholesterol in mouse spermatozoa during in vitro capacitation, *Biol Reprod.*, 1996, 55: 1133– 1146.
51. B. K. Davis, R. Byrne, B. Hungund. Studies on the mechanism of capacitation. II. Evidence for lipid transfer between plasma membrane of rat sperm and serum albumin during capacitation in vitro, *Biochem Biophys Acta.*, 1979, 558:257-266.
52. Zhang SX, Liu XY, Wang HY. Regulation of ion and ion channels in sperm capacitation, *Zhonghua Nan Ke Xue.* 2009, Feb;15(2):170-3.
53. Goto N, Harayama H. Calyculin A-sensitive protein phosphatases are involved in maintenance of progressive movement in mouse spermatozoa in vitro by suppression of autophosphorylation of protein kinase A, *J Reprod Dev.*, 2009, 55: 327–334.
54. Husnjak K, Elsasser S, Zhang N, Chen X, Randles L, Shi Y, Hofmann K, Walters KJ, Finley D, Dikic I. Proteasome subunit Rpn13 is a novel ubiquitin receptor, *Nature* 2008, 453:481–488.
55. Gadella BM, Harrison RA. The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane, *Development.*, 2000,127:2407–2420.
56. Flesch FM, et al. Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane, *J Cell Sci.*, 2001, 114:3543–3555.
57. N. J. Monks, D. M. Stein & L. R. Fraiser: Adenylate cyclase activity of mouse sperm during capacitation in vitro: effect of calcium and a GTP analogue., *Int J Androl.*, 1986, 67-76.

58. Baldi E, Luconi M, Bonaccorsi L, et al. Human sperm activation during capacitation and acrosome reaction: role of calcium, protein phosphorylation and lipid remodelling pathways, *Front Biosci.*, 1996, Aug 15;1:d189-205.
59. Urata K, Narahara H, Tanaka Y, et al. Effect of endotoxin-induced reactive oxygen species on sperm motility, *Fertil Steril.*, 2001, 76 163-6.
60. Gerbers DL, Tubb DJ, Hyne RV. Requirement of bicarbonate for Ca^{2+} -induced elevations of cyclic AMP in guinea pig spermatozoa, *J Biol Chem.*, 257, 1982, 8980-8984
61. Sa'nchez R, Deppe M, Schulz M, Bravo P, Villegas J, Morales P, Risopatrón J. Participation of the sperm proteasome during in vitro fertilisation and the acrosome reaction in cattle, *Andrologia.*, 2011, 43: 114–120.
62. Morales P, Kong M, Pizarro E, Pasten C. Participation of the sperm proteasome in human fertilization, *Hum Reprod.*, 2003, 18: 1010–1017.
63. Pasten C, Morales P, Kong M. Role of the sperm proteasome during fertilization and gamete interaction in the Mouse, *Mol Reprod Dev.*, 2005, 71: 209–219.
64. Wojcik C, Benchaib M, Lornage J, Czyba JC, Guerin JF. Proteasomes in human spermatozoa, *Int J Androl.*, 2000, 23: 169–177.
65. Gadella BM, Tsai PS, Boerke A, Brewis IA. Sperm head membrane reorganisation during capacitation, *Int J Dev Biol.*, 2008, 52: 473–480.
66. Buffone MG, Ijiri TW, Cao W, Merdushev T, Aghajanian HK, Gerton GL. Heads or tails? Structural events and molecular mechanisms that promote mammalian sperm acrosomal exocytosis and motility, *Mol Reprod Dev.*, 2012, 79: 4–18.
67. Pickart, C.M. Mechanisms underlying ubiquitination, *Annu Rev Biochem.*, 2001a., 70, 503-533.

68. Pickart, C.M. Ubiquitin enters the new millennium., *Mol Cell.*, 2001b, 8, 499-504.
69. Schnell, J.D., Hicke, L. Non-traditional functions of ubiquitin and ubiquitin-binding proteins, *J Biol Chem.*, 2003, 278, 35857-35860.
70. Schwechheimer, C., Deng, X.W. COP9 signalosome revisited: a novel mediator of protein degradation, *Trends Cell Biol.*, 2001, 11:420-426.
71. Pickart, C.M., Cohen, R.E. Proteasomes and their kin: proteases in the machine age, *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 2004, 5:177-187.
72. Meusser, B., Hirsch, C., Jarosch, E., Sommer, T. ERAD: the long road to destruction., *Nat Cell Biol.*, 2005, 7:766-772.
73. Husnjak K, Elsasser S, Zhang N, Chen X, Randles L, Shi Y, Hofmann K, Walters KJ, Finley D, Dikic I. Proteasome subunit Rpn13 is a novel ubiquitin receptor, *Nature* 2008, 453:481–488.
74. Hoshi M, Numakunai T, Sawada H. Evidence for participation of sperm proteinases in fertilization of the solitary ascidian, *Halocynthia roretzi*: effects of protease inhibitors, *Dev Biol.*, 1981, 86: 117–121.
75. Kong M, Diaz ES, Morales P. Participation of the human sperm proteasome in the capacitation process and its regulation by protein kinase A and tyrosine kinase, *Biol Reprod.*, 2009, 80: 1026–1035.
76. Hillman P, Ickowicz D, Vizel R, Breitbart H. Dissociation between AKAP3 and PKARII promotes AKAP3 degradation in sperm capacitation, *PLoS One.*, 2013, 8:e68873. 58.
77. Vijayaraghavan S, Liberty GA, Mohan J, Winfrey VP, Olson GE, Carr DW. Isolation and molecular characterization of AKAP110, a novel, sperm-specific protein kinase A-anchoring protein, *Mol Endocrinol.*, 1999, 13: 705–717.

78. Arcelay E, Salicioni AM, Wertheimer E, Visconti PE. Identification of proteins undergoing tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation, *Int J Dev Biol.*, 2008, 52: 463–472
79. Neuwald, A.F., Aravind, L., Spouge, J.L., Koonin, E.V. AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes, *Genome Res.*, 1999, 9: 27-43.
80. Zwickl, P., Baumeister, W. AAA-ATPases at the crossroads of protein life and death, *Nat Cell Biol.*, 1999, 1:97-98.
81. Vale, R.D. AAA proteins. Lords of the ring, *J Cell Biol.*, 2000, 150:F13-19.
82. Maurizi, M.R., Li, C.C. AAA proteins: in search of a common molecular basis. International Meeting on Cellular Functions of AAA Proteins, *EMBO Rep.*, 2001, 2: 980-985.
83. Wang, Q., Song, C., Yang, X., Li, C.C. D1 ring is stable and nucleotide-independent, whereas D2 ring undergoes major conformational changes during the ATPase cycle of p97-VCP, *J Biol Chem.*, 2003, 278: 32784-32793.
84. Kondo, H., Rabouille, C., Newman, R., Levine, T.P., Pappin, D., Freemont, P., Warren, G. p47 is a cofactor for p97-mediated membrane fusion, *Nature*, 1997, 388: 75-78.
85. Cao, K., Nakajima, R., Meyer, H.H., Zheng, Y. The AAA-ATPase Cdc48/p97 regulates spindle disassembly at the end of mitosis, *Cell.*, 2003, 115: 355-367.
86. Wojcik, C., Yano, M., DeMartino, G.N. RNA interference of valosin-containing protein (VCP/p97) reveals multiple cellular roles linked to ubiquitin/proteasome-dependent proteolysis, *J Cell Sci*, 2004, 117: 281-292.

87. Ghislain, M., Dohmen, R.J., Levy, F., Varshavsky, A. Cdc48p interacts with Ufd3p, a WD repeat protein required for ubiquitin-mediated proteolysis in *Saccharomyces cerevisiae*, *Embo J*, 1996, 15: 4884-4899
88. Dai, R.M., Li, C.C. Valosin-containing protein is a multi-ubiquitin chain-targeting factor required in ubiquitin-proteasome degradation., *Nat Cell Biol*, 2001, 3: 740-744.
89. Hitchcock, A.L., Krebber, H., Frietze, S., Lin, A., Latterich, M., Silver, P.A. The conserved npl4 protein complex mediates proteasome-dependent membrane-bound transcription factor activation, *Mol Biol Cell*, 2001, 12: 3226-3241.
90. Rape, M., Hoppe, T., Gorr, I., Kalocay, M., Richly, H., Jentsch, S. Mobilization of processed, membrane-tethered SPT23 transcription factor by CDC48(UFD1/NPL4), a ubiquitin-selective chaperone, 2001, *Cell*, 107: 667-677.
91. Cao, K., Zheng, Y. The Cdc48/p97-Ufd1-Npl4 complex: its potential role in coordinating cellular morphogenesis during the M-G1 transition, *Cell Cycle*, 2004, 3: 422-424.
92. Ye, Y., Meyer, H.H., Rapoport, T.A. The AAA ATPase Cdc48/p97 and its partners transport proteins from the ER into the cytosol, *Nature*, 2001, 414: 652-656.
93. Braun, S., Matuschewski, K., Rape, M., Thoms, S., Jentsch, S. Role of the ubiquitin-selective CDC48(UFD1/NPL4) chaperone (segregase) in ERAD of OLE1 and other substrates, *Embo J*, 2002, 21: 615-621.
94. Jarosch, E., Taxis, C., Volkwein, C., Bordallo, J., Finley, D., Wolf, D.H., Sommer, T. Protein dislocation from the ER requires polyubiquitination and the AAA-ATPase Cdc48, *Nat Cell Biol.*, 2002, 4: 134-139.
95. Wang, Q., Song, C., Li, C.C. Molecular perspectives on p97-VCP: progress in understanding its structure and diverse biological functions, *J Struct Biol*, 2004, 146: 44-57.

96. Karin, M., Ben-Neriah, Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity, *Annu Rev Immunol*, 2000, 18: 621-663.
97. Santoro, M.G., Rossi, A., Amici, C. NF-kappaB and virus infection: who controls whom, *Embo J* 22, 2003, 2552-2560.
98. Dai, R.M., Chen, E., Longo, D.L., Gorbea, C.M., Li, C.C. Involvement of valosin-containing protein, an ATPase Co-purified with Ikappa Balpha and 26 S proteasome, in ubiquitin-proteasome-mediated degradation of Ikappa, *Balpa. J Biol Chem*, 1998, 273: 3562-3573.
99. Yamanaka, K., Sasagawa, Y. and Ogura, T. Recent advances in p97/VCP/Cdc48 cellular functions, *Biochim. Biophys. Acta*, 2012, 1823:130–137.
100. Miyazaki K, Ozaki T, Kato C, Hanamoto T, Fujita T, Irino S, Watanabe K, Nakagawa T, Nakagawara A. A novel HECT-type E3 ubiquitin ligase, NEDL2, stabilizes p73 and enhances its transcriptional activity, *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 308: 106–113
101. O'Donnell AM, Coyle D, Puri P.J. Decreased expression of NEDL2 in Hirschsprung's disease, *Pediatr Surg.*, 2016, 51(11):1839-1842.
102. Qiu X, Wei R, Li Y, Zhu Q, Xiong C, Chen Y, Zhang Y., Lu K., He F., Zhang L. NEDL2 regulates enteric nervous system and kidney development in its Nedd8 ligase activity-dependent manner, *Oncotarget*, 2016, 7(21).
103. Lu L, Hu S, Wei R, Qiu X, Lu K, Fu Y, Li H, Xing G, Li D, Peng R, He F, Zhang L. The HECT type ubiquitin ligase NEDL2 is degraded by anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C)-Cdh1, and its tight regulation maintains the metaphase to anaphase transition. *J. Biol. Chem.*, 2013, 35637-35650
104. Wei R, Qiu X, Wang S, Li Y, Wang Y, Lu K, Fu Y, Xing G, He F, Zhang L. NEDL2 is an essential regulator of enteric neural development and GDNF/Ret signaling, *Cell Signal.*, 2015 Mar, 27(3):578-86

105. Freour, T, Barragan, M, Ferrer-Vaquer, A, Rodriguez, A, Vassena, R. WBP2NL/PAWP mRNA and protein expression in sperm cells are not related to semen parameters, fertilization rate, or reproductive outcome, *J Assist Reprod Genet.*, 2017, 34(6):803–810.
106. Azad N, Nazarian H, Nazari L, Ghaffari Novin M, Piryaee A, Heidari MH, et al. Evaluation of PAWP and PLC γ expression in infertile men with previous ICSI fertilization failure, *Urol J.* 2018, 15(3):116–21.
107. Machaty Z. Signal transduction in mammalian oocytes during fertilization, *Cell Tissue Res.*, 2016, 363: 169 – 183.
108. Tanhaei, S., Abdali-Mashhadi, S., Tavalae, M., Javadian-Elyaderani, S., Ghaedi, K., Seifati, S. M., and Nasr-Esfahani, M. H. Assessment of sperm PAWP expression in infertile men, *Urol. J.*, 2019, 16(5):488-494
109. Aarabi M, Balakier H, Bashar S, Moskovtsev SI, Sutovsky P, Librach CL, Oko R. Sperm-derived WW domain-binding protein, PAWP, elicits calcium oscillations and oocyte activation in humans and mice, *FASEB J.*, 2014, 28(10):4434-40.
110. Wu AT, Sutovsky P, Xu W, van der Spoel AC, Platt FM, Oko R. The postacrosomal assembly of sperm head protein, PAWP, is independent of acrosome formation and dependent on microtubular manchette transport, *Dev Biol.*, 2007, 312:471–83.
111. Kennedy CE, Krieger KB, Sutovsky M, Xu W, Vargovic P, Didion BA, et al. Protein expression pattern of PAWP in bull spermatozoa is associated with sperm quality and fertility following artificial insemination, *Mol Reprod Dev.*, 2014, 81: 436–49.
112. Hamilton LE, Suzuki J, Acteau G, Shi M, Xu W, Meinsohn MC, Sutovsky P, Oko R (2018) WBP2 shares a common location in mouse spermatozoa with

WBP2NL/PAWP and like its descendent is a candidate mouse oocyte-activating factor, *Biol Reprod.*, 99(6):1171–1183

113. Sutovsky P, 2011. Sperm proteasome and fertilization, *Reproduction.*, 2011, 142(1):1-14

114. Gadella BM & Visconti PE. Regulation of capacitation. In *The Sperm Cell*, Eds C De Jonge & CL Barratt. Cambridge, UK: Cambridge University Press., 2006, 134–169.

115. Sutovsky P. Sperm–egg adhesion and fusion in mammals, *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 2009, 11:e11.

116. Sutovsky P. Fertilization In *Reproductive Endocrinology and Infertility: the Practical Clinic and Laboratory*, Eds D Carrell & M Peterson. Totowa, NJ: The Humana Press.,2010.

117. Bailey JL. Factors regulating sperm capacitation, *Systems Biology in Reproductive Medicine.*, 2010, 56: 334–348

118. Baker MA, Smith ND, Hetherington L, Taubman K, Graham ME, Robinson PJ & Aitken RJ. Label-free quantitation of phosphopeptide changes during rat sperm capacitation, *Journal of Proteome Research.*, 2010, 9: 718–729

119. Sutovsky P. Ubiquitin-dependent proteolysis in mammalian spermatogenesis, fertilization, and sperm quality control killing three birds with one stone, *Microscopy research and technique.*, 2003, 61: 88–102.

120. DA Paduch, A Mielnik, PN Schlegel. Novel mutations in testis-specific ubiquitin protease 26 gene may cause male infertility and hypogonadism, *Reproductive biomedicine.*, 2005, 10(6):747-54

121. Guzick DS., Overstreet JW., Factor-Litvak P., Brazil CK., Nakajima ST., Coutifaris C., Carson SA., Cisneros P., Steinkamph MP., Hill JA., Xu D. and Vogel DL. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men, *New Eng J Med*, 2001, 345:1388–1393.
122. Sutovsky P, Moreno R, Ramalho-Santos J, Dominko T, Thompson WE, Schatten G. A putative, ubiquitin-dependent mechanism for the recognition and elimination of defective spermatozoa in the mammalian epididymis, *J Cell Sci.*, 2001, 114:1665-1675.
123. Sakai N, Sawada MT & Sawada H. Non-traditional roles of ubiquitin proteasome system in fertilization and gametogenesis, *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2004, 36: 776–784
124. Yi YJ, Manandhar G, Oko RJ, Breed WG & Sutovsky P. Mechanism of sperm–zona pellucida penetration during mammalian fertilization: 26S proteasome as a candidate egg coat lysin, *Society of Reproduction and Fertility Supplement.*, 2007a, 63:385–408.
125. Zimmerman S & Sutovsky P. The sperm proteasome during sperm capacitation and fertilization, *Journal of Reproductive Immunology.*, 2009, 83: 19–25.
126. Sawada H, Takahashi Y, Fujino J, Flores SY & Yokosawa H. Localization and roles in fertilization of sperm proteasomes in the ascidian *Halocynthia roretzi*, *Molecular Reproduction and Development.*, 2002b, 62: 271–276.
127. Sawada H, Pinto MR & De Santis R. Participation of sperm proteasome in fertilization of the phlebobranch ascidian *Ciona intestinalis*, *Molecular Reproduction and Development.*, 1998, 50: 493–498.
128. Yokota N & Sawada H. Effects of proteasome inhibitors on fertilization of the sea urchin *Anthocidaris crassispina*, *Biological & Pharmaceutical Bulletin.*, 2007a, 30: 1332–1335.

129. Yokota N & Sawada H. Sperm proteasomes are responsible for the acrosomereactionandspermpenetrationofthevitellineenvelopeduring fertilization of the sea urchin *Pseudocentrotus depressus*, *Developmental Bio.*, 2007b, 308 222–231.
130. Sutovsky P, McCauley TC, Sutovsky M & Day BN. Early degradation of paternal mitochondria in domestic pig (*Sus scrofa*) is prevented by selective proteasomal inhibitors lactacystin and MG132, *Biology of Reproduction.*, 2003,68: 1793–1800.
131. Sutovsky P, Manandhar G, McCauley TC, Caamano JN, Sutovsky M, Thompson WE & Day BN. Proteasomal interference prevents zona pellucida penetration and fertilization in mammals. *Biology of Reproduction.*, 2004, 71: 1625–1637.
132. Sun QY, Fuchimoto D & Nagai T. Regulatory roles of ubiquitin– proteasome pathway in pig oocyte meiotic maturation and fertilization, *Theri.*, 2004, 62:245–255.
133. Rawe VY, Diaz ES, Abdelmassih R, Wojcik C, Morales P, Sutovsky P & Chemes HE. The role of sperm proteasomes during sperm aster formation and early zygote development: implications for fertilization failure in humans, *Human Reproduction*, 2008, 23 573–580
134. Wang H, Song C, Duan C, Shi W, Li C, Chen D & Wang Y. Effects of ubiquitin– proteasome pathway on mouse sperm capacitation, acrosome reaction and in vitro fertilization, *Chinese Science Bulletin.*, 2002, 47 127–132.
135. Morales P, Pizarro E, Kong M & Jara M. Extracellular localization of proteasomes in human sperm, *Molecular Reproduction and Dev.*, 2004, 68: 115–124.
136. Morales P, Diaz ES & Kong M. Proteasome activity and its relationship with protein phosphorylation during capacitation and acrosome reaction in human spermatozoa, *Society of Reproduction and Fertility Supplement*, 2007, 65: 269–273.
137. Zimmerman SW, Manandhar G, Yi Y-J, Gupta SK, Sutovsky M, Odhiambo JF, Powell MD, Miller DJ & Sutovsky P. Sperm proteasomes degrade sperm receptor on the egg zona pellucida during mammalian fertilization, *PLoS ONE.*, 2011, 6 e17256.

138. Yi YJ, Manandhar G, Sutovsky M, Zimmerman SW, Jonakova V, van Leeuwen FW, Oko R, Park CS & Sutovsky P. Interference with the 19S proteasomal regulatory complex subunit PSMD4 on the sperm surface inhibits sperm–zona pellucida penetration during porcine fertilization, *Cell and Tissue Research*, 2010, 341:325–340.
139. Yi YJ, Manandhar G, Sutovsky M, Jonakova V, Park CS & Sutovsky P. Inhibition of 19S proteasomal regulatory complex subunit PSMD8 increases polyspermy during porcine fertilization in vitro, *Journal of Reproductive Immunology*, 2009a, 84:154–163.
140. Kerns, K, Zigo, M.; Drobnis, E.Z.; Sutovsky, M.; Sutovsky, P. Zinc ion flux during mammalian sperm capacitation, *Nat. Commun.* 2018, 9, 2061.
141. S. Ficarro, O. Chertihin, V.A. Westbrook, F. White, F. Jayes, P. Kalab, J.A. Mart o, J. Shabanowitz, J.C. Herr, D.F. Hunt, P.E. Visconti. Phosphoproteome analysis of capacitated human sperm. Evidence of tyrosine phosphorylation of a kinase-anchoring protein 3 and valosin-containing protein/p97 during capacitation, *J. Biol. Chem.*, 2003, 278: 11579-11589
142. Zigo, M., Jonakova, V., Manaskova-Postlerova, P., Kerns, K. & Sutovsky, P. Ubiquitin-proteasome system participates in the de-aggregation of spermadhesin and DQH protein during boar sperm capacitation, *Reproduction*, 2019, 157(3):283-295.
143. Zigo M, Manaskova-Postlerova P, Jonakova V, Kerns K, Sutovsky P. Compartmentalization of the proteasome-interacting proteins during sperm capacitation. *Sci Rep.*, 2019b, 9(1):12583
144. Silva, E., Frost, D., Li, L., Bovin, N. & Miller, D. J. Lactadherin is a candidate oviduct Lewis X trisaccharide receptor on porcine spermatozoa, *Andrology*, 2017, 5: 589–597.
145. Ensslin, M., J. J. Calvete, H. H. Thole, W. D. Sierralta, K. Adermann, L. Sanz, and E. Toˆpfer-Petersen. Identification by affinity chromatography of boar sperm membrane-associated proteins bound to immobilized porcine zona pellucida. Mapping

of the phosphorylethanolamine-binding region of spermadhesin, *AWN. Biol. Chem.*, 1995, 376:733–738

146. Nagdas, S. K., Smith, L., Medina-Ortiz, I., Hernandez-Encarnacion, L. & Raychoudhury, S. Identification of bovine sperm acrosomal proteins that interact with a 32-kDa acrosomal matrix protein, *Molecular and cellular bio.*, 2019, 414: 153–169.

147. Petrunkina, A. M., Lakamp, A., Gentzel, M., Ekhlesi-Hundrieser, M. & Topfer-Petersen, E. Fate of lactadherin P47 during post-testicular maturation and capacitation of boar spermatozoa, *Reproduction.*, 2003, 125, 377–387.

148. Zigo, M. *et al.* Panel of monoclonal antibodies to sperm surface proteins as a tool for monitoring localization and identification of sperm-zona pellucida receptors, *Cell Tissue Res*, 2015, 359, 895–908.

149. Tavalae M, Parivar K, Shahverdi AH, Ghaedi K, Nasr-Esfahani MH. Status of sperm-born oocyte activating factors (PAWP, PLCzeta) and sperm chromatin in uncapacitated, capacitated and acrosome-reacted conditions, *Hum Fertil.*, 2017, 20(2):96–103

150. Amann, R.P. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately?., *J. Androl.*, 1989, 10:89–98.

151. Kondoh, E., Konno, A., Inaba, K., Oishi, T., Murata, M., Yoshida, M. Valosin-containing protein/p97 interacts with sperm-activating and sperm-attracting factor (SAAF) in the ascidian egg and modulates sperm-attracting activity, *Develop. Growth Differ.*, 2008, 50:665–673.

152. Hozumi, A., Padma, P., Toda, T., Ide, H., Inaba, K. Molecular Characterization of Axonemal Proteins and Signaling Molecules Responsible for Chemoattractant-Induced Sperm Activation in *Ciona intestinalis*. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 2008, 65: 249–267.

7. EKLER

Ek-1: Etik Kurul İzni



Ek-2: Etik kurul izni



**T.C.
YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu**

SAYI : 26379996 / 07

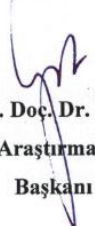
18.01.2017

KONU : 18.01.2017 Tarih ve 06 Sayılı Kurul Kararı

**Sayın: Doç. Dr. Sevil ÇAYLI
Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı**

Sorumlu Araştırmacılığını Yapmış Olduğunuz “Ubikütün Proteazom Sistemi (UPS) Proteinlerinin İnsan Sperm Kapasitasyonu Ve Akrozomal Reaksiyondaki Rolünün Belirlenmesi” İsimli Çalışmanız Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu’nun 18/01/2017 tarih ve 06 sayılı kararı ile başvuru dosyasında belirtilen merkezde gerçekleştirilmesi etik ve bilimsel açıdan uygun bulunmuştur

Bilgilerinize rica ederim.


**Yrd. Doç. Dr. Halil KARA
Klinik Araştırmalar Etik Kurul
Başkanı**

Ankara Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi - Etik Kurul Sekreteryası
Bilkent Yolu 3.Km. Çankaya /Ankara
Telefon: 0(312) 291 25 25 / 36 45

Ek-3: Etik Kurul İzni



T.C.
TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 83116987 - 340
Konu : Etik Kurul Kararı
Toplantı Tarihi : 19.02.2019
Toplantı No : 2019/02
Proje No : 19-KAEK-048

30.04.2019

Sayın, Doç.Dr. Fikret GEVREK

Etik Kurulumuzun 19.02.2019 tarihli toplantısında görüşülen 19-KAEK-048 kayıt numaralı **“İnfertil ve Fertill Bireylerde Ubiquitin Protezom İlişkili Proteinlerin Ekspresyonlarının İncelenmesi”** başlıklı çalışmanız gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup, çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına karar verilmiştir.

İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmeliğin 14-4. maddesi ve yönergemizin 18-3. maddesine göre çalışmanız tamamlandıktan sonra sonuç raporunun tarafımıza en geç 90 gün içerisinde bildirilmesi gerekmektedir.

Bilgilerinizi rica ederim.


Dr. Öğretim Üyesi Yalçın ÖNDER
Başkan Yardımcısı

Expression of p97/Valosin Containing Protein in Human Sperm and Its Correlation with Semen Parameters

Seda Ocaklı

Ankara Yildirim Beyazit University, Medical Faculty,
Dept.of Histology and Embryology, 06800, Ankara, Turkey
Gaziosmanpasa University, Medical Faculty,
Dept.of Histology and Embryology, Tokat, Turkey

Fikret Gevrek

Gaziosmanpasa University, Medical Faculty,
Dept.of Histology and Embryology, Tokat, Turkey

Fikret Erdemir

Gaziosmanpasa University, Medical Faculty,
Department of Urology, Tokat, Turkey

Sevil Cayli (Corresponding author)

Ankara Yildirim Beyazit University, Medical Faculty,
Dept.of Histology and Embryology, 06800, Ankara, Turkey
Email address: sevilcayli@yahoo.com

Abstract

Valosin-containing protein (VCP), also called p97, is a AAA+ ATPase that has been shown to be involved in many cellular events. However, there exist no information about the involvement of p97/VCP in infertile human sperm and its expression is not correlated with semen parameters. In this study, we aimed to investigate the expressional differences of p97/VCP in fertile and infertile men and its correlation with semen parameters was observed.

We investigated the expression of p97/VCP in ejaculated spermatozoa with immunocytochemistry and Western blotting in semen samples from 20 men representing a broad spectrum of semen quality. We also used donor ejaculates (n:20 men), immunocytochemistry and Western blotting were performed to detect the expression and the localization of p97/VCP.

p97/VCP was highly expressed in human spermatozoa. p97/VCP expression in infertile men was significantly different compared to fertile men ($p<0,05$). p97/VCP expression correlated with classical semen parameters (concentration, morphology and motility) and was significantly higher in infertile men. In conclusion, p97/VCP was expressed in human spermatozoa and the expression correlated negatively with the classical semen parameters. Therefore, p97/VCP expression seems related to quality of the spermatozoa. We suggest that higher expression of p97/VCP may lead to abnormal maturation and reduced functionality of spermatozoa.

Keywords: Human sperm, p97/Valosin containing protein (VCP), infertility, immunocytochemistry, Western blotting

Special Issue of Health Sciences

DOI: 10.7176/IJSTR/6-03-39

p97/Valosin İçeren Protein (VCP)'nin İnsan Sperminde Ekspresyonu Ve Bu Ekspresyonun Semen Parametreleri İle Olan İlişkisi

Özet:

p97 olarak da adlandırılan Valosin içeren protein (VCP) hücre içi bir çok olayda görevli bir ATPazdır. Fakat p97/VCP'nin infertil insan sperminde lokalizasyonu ve ekspresyonu ve bu ekspresyonun semen parametreleri ile ilişkisi hakkında bir bilgi literatürde mevcut değildir. Bu çalışmada, p97/VCP'nin fertil

ve infertil bireylerdeki ekspresyonundaki farklılıklar ve bu ekspresyonun semen parametreleri ile olan ilişkisinin araştırılması amaçlandı.

Fertil (n:20 kontrol ejakülatı) ve infertil bireylerin (n:20 erkek hasta ejakülatı) sperm örnekleri üzerinde immunositokimyasal teknikler ve Western blot uygulandı. Kontrol ve hasta spermelerine ait örneklerde semen parametreleri (konsantrasyon, motilite ve morfoloji) değerlendirildi.

Sonuçlarımız UPS proteinlerinden, p97/VCP'nin sperm baş, boyun ve kuyruk bölgesinde lokalize olduğunu göstermiştir. Fakat bu lokalizasyonun en fazla baş bölgesinde yerleşim gösterdiği ve özellikle de infertil bireylerde p97/VCP'nin fertil bireylere göre ekspresyonun daha fazla olduğu saptanmıştır. p97/VCP ekspresyonu ile semen parametreleri arasında negatif bir korelasyon bulunmuştur. Bu sonuçlar p97/VCP'nin erkek infertilitesi değerlendirilmesinde kullanılabilecek bir kriter olabileceğini göstermektedir.

Sonuç olarak, fertil ve infertil bireyler arasında p97/VCP'nin ekspresyonu arasında anlamlı derecede farklılıkların bulunması ve semen parametreleri ile p97/VCP arasındaki negatif ilişkinin saptanması, p97/VCP'nin sperm maturasyonu ve sperm fonksiyonu ile ilişkili bir protein olduğunu ve erkek infertilitesinin değerlendirilmesinde kullanılabilecek bir faktör olabileceğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: İnsan spermi, p97/Valosin içeren protein (VCP), kısırılık, immunositokimya, Western blotlama

1. Giriş:

İnfertilite, kontraseptif bir yöntem uygulamadan, düzenli bir cinsel yaşama rağmen bir yıl süreyle gebelik oluşmaması olarak tanımlanır. Kliniklere infertilite problemi ile başvuran çiftlerin %48'inde erkeğe bağlı faktörün olması erkek fertilizasyon potansiyelinin araştırılmasını bir ön koşul olarak beraberinde getirmektedir. Erkeklerde anatomik, endokrin, immünolojik bir bozukluk veya enfeksiyon infertilite nedeni olabilir. İnfertilitede erkek faktörünün kesinlik kazanabilmesi için; öykü, genel fizik muayene, semen analizi ve hormonal tetkikler sırasıyla yapılmalı ve gereğinde testis biyopsisi; biyokimyasal ve fonksiyonel testlerle desteklenmelidir (Delilbaşı, 1997; Günel, 2004; Lens, 1996).

Son yıllarda yapılan moleküler çalışmalarda erkek infertilitesinin değerlendirilmesinde belli molekül ve proteinlerin önemi ve bunların infertilite ile ilişkilendirilmesine dair çok sayıda çalışma gündeme gelmiştir (Aarabi vd., 2014; Murgia vd., 2020). Bunlardan Ubikülin proteazom sisteminde (UPS) çalışan ve çok fonksiyonlu bir protein olan p97/Valosin içeren protein (VCP)'nin erkek infertilitesiyle ilişkisine dair kısıtlı sayıda literatürde bilgi vardır (Ficarro vd., 2003; Song vd., 2016; Sutovsky vd., 2017). p97/VCP'nin, ilk olarak bizim çalışmalarımızla (Cayli vd., 2011; Cayli vd., 2012) gelişmekte olan sıçan testis ve epididimis dokularındaki ekspresyonları belirlenmiştir. Testiküler dokularda p97/VCP'nin gelişime paralel olarak ekspresyonlarının arttığı ve farklı UPS proteinleri ile ilişkide olduğu belirlenmiştir.

p97/VCP'nin, hücre içi birçok temel fonksiyonu (Endoplazmik retikulum ilişkili protein yıkımı, hücre siklus kontrolü, apoptoz, otofaji gibi) yerine getirdiği bilinmektedir (Dargemont vd., 2012; Meusser vd., 2005; Ogura vd., 2001). p97/VCP'nin bir çok hastalık patogeneziindeki rolleri de büyük ölçüde bilinmektedir (Pickard vd., 2001). Fakat p97/VCP'nin erkek üreme hücresi olan spermelerde bugüne kadar varlığı ve fonksiyonu hakkında çalışma yok denecek kadar azdır. Bu nedenle bu çalışmada öncelikle biz p97/VCP'nin fertil ve infertil bireylerin spermelerinde immunohistokimyasal ve Western blot yöntemleriyle lokalizasyonunu ve ekspresyonunu belirlemeyi amaçladık, ikincil olarak da p97/VCP'nin bu bireylerdeki semen parametreleri ile olan ilişkisini incelemeyi amaçladık.

2. Yöntem:

2.1. Örneklerin Temini ve Gruplandırılması

Gaziosmanpaşa Üniversitesi Etik Kurulu kararı doğrultusunda planlanan bu çalışmada, GOP Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji polikliniğine infertilite problemi ile müracaat ederek spermiyogram tetkiki yaptırması tavsiye edilen hastaların semen örnekleri, olguların olurları alındıktan sonra bu çalışmada kullanılmıştır. Semen örnekleri spermiyogram özellikleri yönünden değerlendirilip sonuçları rapor edildikten sonra çalışma için ayrılmıştır.

Hastalar ile yapılan ilk görüşmede örnek vermeğe gelecekleri gün 3-5 günlük bir cinsel perhiz süresine uyarak gelmeleri tavsiye edilmiştir. Önerilen cinsel perhiz süresine uyulduğunda, dikkatli bir şekilde yapılan semen analizi testislerin spermatogenetik ve steroidogenetik aktivitesiyle aksesuar bezlerin çalışması hakkında sağlıklı bilgi sahibi olunmasını sağlayacaktır. Hastaların steril şartlarda, steril kutular kullanarak bu amaçla düzenlenmiş sperm verme odasını kullanmaları sağlanmıştır. Hastalar, masturbasyonla örnek vermeleri gerektiği konusunda bilgilendirilmiş, kullandıkları kutuların üzerine isimleri etiketle yapııştırılmıştır. Örnek verme esnasında nelere dikkat etmeleri gerektiği önceden

hazırlanmış bir bildiri ile kendilerine açıklanmıştır. Örnek toplanması esnasında krem ya da kayganlaştırıcı bir madde kullanmaması, örnek toplanan kutuya su ya da başka bir madde kaçırmaması söylenmiştir. Semen toplanan kutuyla ilgili olarak daha önceden yapılan kimyasal ve biyolojik testlerle toksik olmadığı ispatlanmış kutular satın alınmıştır. Hastanın örneğini aldıktan sonra kendi eli ile laboratuvarındaki ilgili görevliye teslim etmeleri gerektiği izah edilmiştir. Semen örnekleri spermiyogram özellikleri yönünden değerlendirilip sonuçları rapor edildikten sonra çalışma için ayrılmıştır. Örneklerin ayırımı yapılırken lökosit içeren, viskoz olan ve anormal bir görüntüye sahip (örneğin kanlı) örnekler çalışmaya alınmamış, perhiz süresine uygun olarak (ortalama 3-5 gün) toplanmış örnekler seçilmeye dikkat edilmiştir. Örnekler spermiyogram özelliklerine göre; hacim, konsantrasyon, motilite ve morfoloji yönünden değerlendirilmiş ve hastaların ayrıntılı anemnezleri alınmıştır. Kriptorşidizm, geçirilmiş genital infeksiyon hikayesi, genital travma, geçirilmiş operasyonlar, alışkanlıklar (sigara, alkol, uyuşturucu kullanımı), radyasyon tedavisi, kemoterapi gibi maruz kalınan gonodotoksinler sorgulanmış ve bu hastalar fertil gruba dahil edilmemiştir. Hastaların testis sayıları, lokalizasyonu ve volümü kaydedildi. Varikozel varlığı fizik muayene ile belirlendi. Ayrıca epididim ve vas deferensin skrotal kısımlarının palpasyonu yapıldı. Vaz deferens obstrüksiyonu ya da agenezisi şüphesi olan hastalar ile daha önce fertilizasyon amacı ile vazektomi yapılan hastalar çalışmaya alınmadı. Infertil grubun yanında, fertil kontrol grubu daha önce çocuğu olan ve yukarıda belirtilen kriterlere sahip olmayan bireylerden seçildi. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2010 verilerine göre konsantrasyon, motilite ve morfoloji için normal olarak kabul edilen değerler: Hacim $\geq 1,5$ ml, Konsantrasyon $\geq 15 \times 10^6/\text{ml}$, Motilite $> \%40$, Morfoloji $\geq \%4$ (Kruger). Fertil ($n = 20$) ve infertil ($n = 20$) bireylerden alınan semen örnekleri üzerinde immunohistokimya için hazırlıklar aşağıda belirtildiği şekilde hazırlandı.

2.2.Sperm Yıkama

Ejakülat 37°C 'de likefiye olduktan sonra mikroskopik olarak incelenir ve 2500 rpm 'de 10 dakika santrifüj edilir. Santrifüj sonrası seminal sıvı içeriği üstten ayrı bir tüpe alınır. Altta kalan sperm pelleti üzerine $500\mu\text{l}$ - 2ml arası (tüpte kalan sperm pelletinin konsantrasyonuna yani pelletin büyüklüğüne göre) yıkama medyumunu (Yıkama medyumunu olarak hücre kültür işlemlerinde kullanılan bikarbonat, Heps içermeyen tampon ve İnsan Serum Albümin içeren medyumlar tercih edilmektedir) eklenerek resuspanse edilir. Yıkama medyumunu 37°C 'de $\%5$ 'lik CO_2 'e ayarlanmış inkübatörde bir saat bekletilmiş olması gerekir. Resüpsansiyon sonrası sperm morfoloji değerlendirmesi için lam üzerine $5-10 \mu\text{l}$ lik örnek çekilerek yayma yapılır. Polilizinle kaplı lamlara ise yine $5-10 \mu\text{l}$ aynı örnekten yayma yapılarak, preparatlar kuruduktan sonra 4% lük formaldehit ile fiks edilir. Fikse edilen slaytlar immüsitokimyasal işlemlere başlayana kadar 4°C 'de saklanır.

2.3.İmmunositokimya

Fertil ve infertil bireylerden hazırlanan fikse edilmiş slaytlar pappen yardımıyla çizildikten sonra, oda ısısında kesitler spesifik olmayan reaksiyonu engellemek için 1 saat 5% lik bovin serum albümin ile inkübe edildi. 1 saatlik inkübasyon sonrası, PBS ile oda sıcaklığında yıkamadan sonra sırayla biotinlenmiş sekonder antikorlar (ScyTek Laboratories, USA) ve peroksidaz-işaretli streptavidin (ScyTek Laboratories, Utah, USA) ile toplam 60 dakika inkübe edildi. Sekonder antikordaki peroksidaz aktivitesi, DAB (Sigma, USA) kromojeni ile inkübasyon sonucu görünür hale getirilip, Mayer'in hematoksileni (ScyTek Laboratories, Utah, USA) ile zıt boyama yapıldı. Sonrasında, slaytlar kapatma solusyonu (Fisher Chemicals, Springfield, NJ, USA) ile kapatıldı. Kontroller için, kesitler primer antikorla benzer konsantrasyonda normal tavşan serumuyla inkübe edildi. Boyanan kesitler Leica mikroskop (Leica DM2500, Nussloch, Almanya) altında fotoğraflandı. Sekonder antikorun horseradish peroxidase (HRP) ya da alkaline fosfat (AP) ile konjuge olma durumuna göre, AEC nin yanında, DAB veya Fast red gibi kromojenler de kullanılarak immunopositif bölgeler görünür hale getirildi.

2.4.Western blot analizi

Sperm örnekleri PBS ile yıkandıktan sonra, elde edilen pellet RIPA solusyonu (lizis solusyonu) içerisinde 3 kez 5 saniye sonikasyona tabii tutuldu ve sonrasında 14000 RPMI 'da , $+4^\circ\text{C}$ 'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatant yükleme solusyonu (10X laemli buffer) ile karıştırıldı ve 96°C 'de 10 dakika kaynatılarak proteinlerin denatüre olması sağlandı. $\%4$ - 12 'lik Bis- Tris Jel ($1.0 \text{ mm} \times 10 \text{ well}$)'e kaynatılan örnekler yüklendi ve 120 Volt , 300 miliamper ve 250 Watt ayarında 1 saat 40 dakika yürütüldü. Yürütme bittikten sonra, semidry blotlama metodu ile jeldeki proteinlerin, nitrosellüloz membranlara aktarımı 150 mAmperde 1 saat süre ile gerçekleştirildi. Membrana aktarılan proteinler Ponceu-S boyası ile boyandı ve PBS-Tween ile sonrasında 3 kez $5'$ er dakika yıkandı. Sonrasında membrane $\%5$ 'lik sütozu ile bloklandı. Sırasıyla primer antikor (anti mouse p97/VCP antikor, Abcam,

ab11433) ile gece boyu 4°C'de ve ertesi gün anti mouse HRP işaretli sekonder antikor ile inkübe edildi. Sekonder antikor ile inkübasyonun ardından üç kez PBS Tween ile yıkanan membran ECL Detection Ajansı ile 2-5 dakika inkübe edildi ve UVP Görüntüleme cihazı kullanılarak membran üzerindeki proteinler görüntülendi. Membran üzerindeki bantların densitesi Image J programı kullanılarak değerlendirildi.

2.5.Semiquantitative HSCORE analizi

Herbir kesit için ışık mikroskobu altında 40X büyütmede birbirinden habersiz iki araştırmacı tarafından rastgele beş alan seçildi ve bu alanlar içinde hücrelerin boyanma yoğunluğuna göre [0 (boyanma yok), +1 (zayıf, fakat tespit edilebilir boyanma), +2 (orta şiddetli boyanma) ve +3 (yoğun boyanma)] hücre sayımı yapıldı (Caylı S, 2011). Hesaplama için HSCORE formülü kullanıldı [$\sum P_i(i+1)$]; i boyanma yoğunluğu skorunu, P_i boyanan hücrelerin yüzdesini gösterir]. İki gözlemcinin hesapladığı skorların ortalaması alındı ve HSCORE değerleri grafikte gösterildi.

İstatiksel değerlendirmeler SigmaStat versiyon 3.5 (Jandel Scientific Corp., San Rafael, CA) kullanılarak ve anlamlılık p< 0.05 olarak değerlendirilmiştir. Fertil ve infertil hasta gruplarında ortaya çıkabilecek muhtemel farklılıklar karşılaştırmalı testler (ANOVA, t-test) ve korelasyon regresyon analizleri (Pearson, Spearman) ile değerlendirildi.

3. Sonuçlar:

3.1. Semen parametreleri

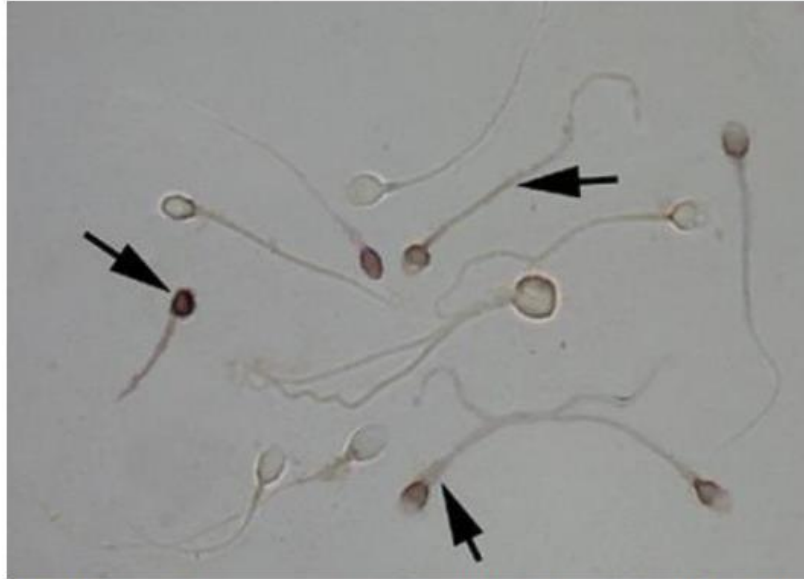
Çalışmamızda kullandığımız fertile ve infertil bireyler için 20'şer hastaya ait semen parametreleri (konsantrasyon, motilite, morfoloji) ve hasta yaşı değerleri tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1: Fertil ve infertil hastalarda semen parametreleri

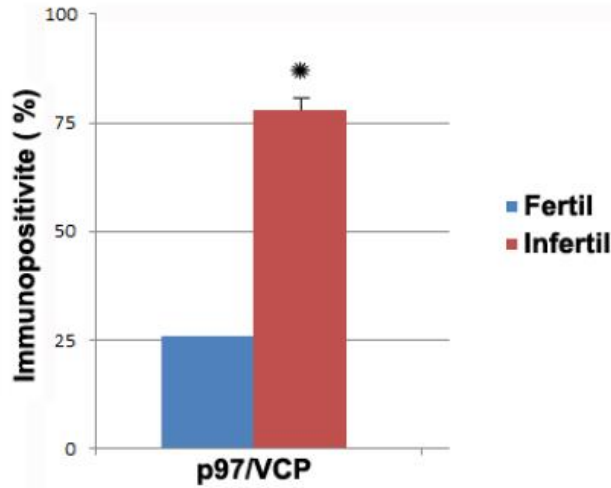
	FERTİL (n:20)	İNFERTİL (n:20)
Sperm konsantrasyonu (x10 ⁶)	132,6± 5,6	32,6±5,8
Motilite (%)	68,7± 6,8	33,7± 8,3
İleri motil sperm (%)	62,2 ± 3,5	25,5± 5,4
Normal morfoloji (%)	91± 5,4	58± 2,6
Yaş	29,2 ± 6,5	28,8± 6,4
Ejakülasyon volümü	3,27± 3,6	2,8± 4,2

3.2. Fertil ve infertil bireylerde p97/VCP ekspresyonunun belirlenmesi

İmmünohistokimyasal işlemler sonrası fertil ve infertil bireylerden elde edilen sperm yaymalarında p97/VCP proteininin sperm hücrelerinde lokalizasyonu belirlendi (Şekil 1a). Yapılan immünohistokimyasal işaretlemler sonrası, p97/VCP'nin özellikle baş, boyun ve kuyruk bölgelerinde değişik yüzdelerde lokalize olduğu belirlendi (Şekil 1a, oklar). Fertil ve infertil bireylerdeki p97/VCP pozitif hücrelerin yüzdeleri karşılaştırıldığında infertil bireylerde anlamlı derecede p97/VCP pozitif hücrelerin yüzdelерinin artmış olduğu saptandı (Şekil 2).



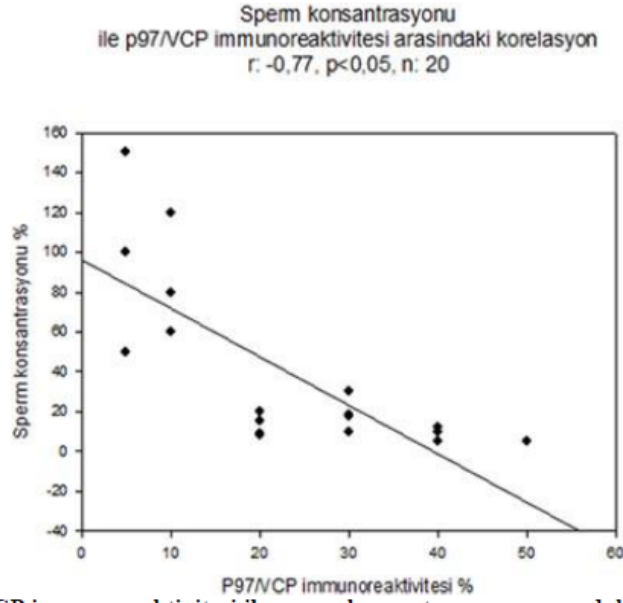
Şekil 1: İnfertil bireye ait semen yaymasında p97/VCP immunopozitif işaretli spermiler. p97/VCP'nin baş, boyun ve kuyruk bölgelerindeki immunolokalizasyonu izlenmektedir.



Şekil 2. Fertil ve infertil bireylerde p97/VCP immunopozitivitesinin karşılaştırılması. Fertil bireylerde p97/VCP immuno ekspresyonunun infertil bireylere göre anlamlı derecede az olduğu görüldü. (yıldız:p<0,001).

3.3. p97/VCP ekspresyonunun semen parametreleri ile olan ilişkisi

p97/VCP immunopozitif sperm yüzdelerinin, o ejakülattaki sperm konsantrasyonu ile ilişkisi olup olmadığını anlamak amacıyla Pearson korelasyonu ile pozitif ve ya negatif yönde bir ilişki olup olmadığına bakıldı (Şekil 3). 20 hasta ile yapılan korelasyon eğrisinde de görüldüğü üzere, p97/VCP immunoreaktivitesinin sperm konsantrasyonu ile ters orantılı fakat anlamlı derecede ilişkili olduğu bulunmuştur.

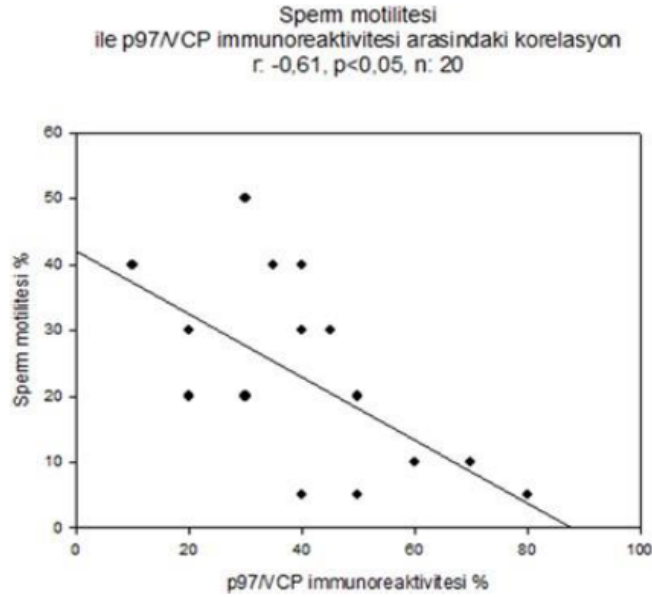


Şekil 3. p97/VCP immunoreaktivitesi ile sperm konsantrasyonu arasındaki negatif ilişkiyi gösteren 20 hastadaki korelasyon.

Yani, sperm konsantrasyonu yüksek olan hastalarda, p97/VCP immunoreaktivitesinin düşük olduğu saptanmıştır.

3.4. p97/VCP ekspresyonunun sperm motilitesi ile olan ilişkisi

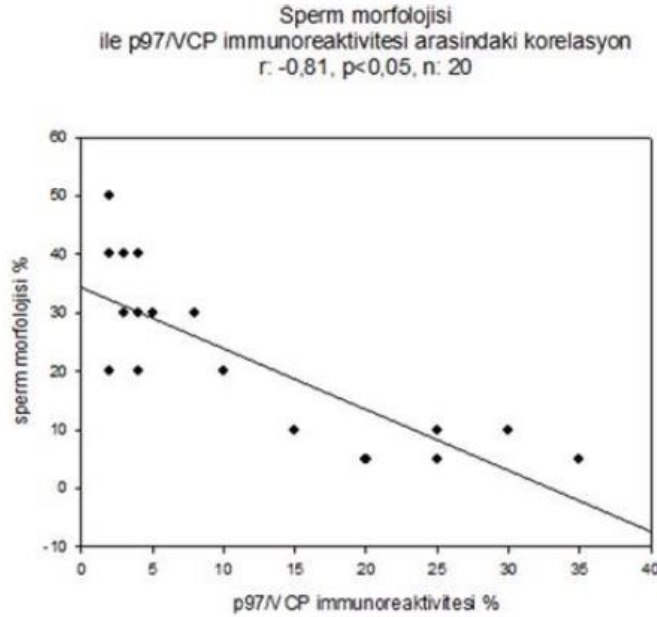
p97/VCP immunopozitif sperm yüzdelерinin, o ejakülatındaki sperm motilitesi ile ilişkisi olup olmadığını anlamak amacıyla Pearson korelasyonu ile pozitif ve ya negatif yönde bir ilişki olup olmadığına bakıldı (Şekil 4). 20 hasta ile yapılan korelasyon eğrisinde de görüldüğü üzere, p97/VCP immunoreaktivitesinin sperm motilitesi ile ters orantılı fakat anlamlı derecede ilişkili olduğu bulunmuştur. Yani, sperm motilitesi yüksek olan hastalarda, p97/VCP immunoreaktivitesinin düşük olduğu saptanmıştır (Şekil 4).



Şekil 4. p97/VCP immunoreaktivitesi ile sperm motilitesi arasındaki negative ilişkiyi gösteren 20 hastadaki korelasyon.

3.5. p97/VCP ekspresyonunun sperm morfolojisi ile olan ilişkisi

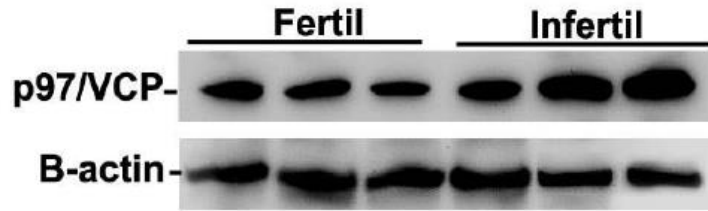
p97/VCP immunopozitif sperm yüzdelерinin, o ejakülattaki sperm morfolojisi ile ilişkisi olup olmadığını anlamak amacıyla Pearson korelasyonu ile pozitif ve ya negatif yönde bir ilişki olup olmadığına bakıldı (Şekil 5). 20 hasta ile yapılan korelasyon eğrisinde de görüldüğü üzere, p97/VCP immunoreaktivitesinin sperm morfolojisi ile ters orantılı fakat anlamlı derecede ilişkili olduğu bulunmuştur. Yani, sperm morfolojisi iyi olan hastalarda, p97/VCP immunoreaktivitesinin düşük olduğu saptanmıştır (Şekil 5).



Şekil 5. p97/VCP immunoreaktivitesi ile sperm morfolojisi arasındaki negatif ilişkiyi gösteren 20 hastadaki korelasyon.

3.6. p97/VCP ekspresyonunun fertile ve infertil bireylerde Western blot ile değerlendirilmesi

İmmunositokimyasal olarak fertil ve infertil insan sperminde belirlenen p97/VCP'nin ekspresyonu Western blot yöntemiyle aynı hastalarda değerlendirildi. Western blot çalışmaları sonucunda elde edilen band yoğunlukları Image J program ile değerlendirildikten sonra, p97/VCP ekspresyonunda fertil ve infertil hastalar arasında anlamlı ölçüde farklı olduğu saptandı (Şekil 6).



Şekil 6. P97/VCP ekspresyonunun fertil ve infertil bireylerde örnek üç hastadaki Western blot ile gösterimi. İnfertil bireylerde p97/VCP ekspresyonun Beta actin ile orantılandığında arttığı izlenmektedir

4. Tartışma

Bu çalışmada, fertil ve infertil bireylerde UPS proteinlerinden p97/VCP'nin sperm hücrelerinde lokalizasyonu ve p97/VCP ekspresyonunun semen parametreleri ile ilişkisi incelenmektedir. p97/VCP'nin insan sperminde ilk defa ekspresyonunun gösterilmesi ve bu ekspresyonun semen parametreleri ile ilişkisinin olup olmadığının incelenmesi nedeniyle orijinal bulgular içermektedir. Bu projede kullanılan temel metodlar immunositokimya ve Western blottur.

Sonuçlarımız UPS proteinlerinden, p97/VCP'nin sperm baş, boyun ve kuyruk bölgesinde lokalize olduğunu göstermiştir. Fakat bu lokalizasyonun en fazla baş bölgesinde yerleşim gösterdiği ve özellikle de infertil bireylerde p97/VCP'nin fertil bireylere göre ekspresyonun daha fazla olduğu saptanmıştır. Bu

sonuçlar p97/VCP'nin erkek infertilitesi değerlendirilmesinde kullanılabilecek bir kriter olabileceğini göstermektedir.

Bugüne kadar p97/VCP'nin sperm hücresindeki fonksiyonları ile ilgili yapılan çalışmalar çok azdır (Ficarro vd., 2003; Kondoh vd., 2008; Hozumi vd., 2008;). Bu çalışmalarda da direk insan spermindeki fonksiyonu tam olarak belirlenememiştir. Yalnız, Ficarro vd., 2003 kapasite olmuş insan sperminde yaptıkları kütle spektrometrisi çalışmalarında p97/VCP'nin sperm kapasitasyonu sırasında fosforile olduğunu göstermişlerdir. Yine bu çalışmada, kapasite olmuş ve olmamış sperm hücrelerinde p97/VCP'nin lokalizasyonu belirlenmiştir. Örneğin kapasite olmamış spermlerde, p97/VCP spermin boyun bölgesinde lokalize iken, kapasitasyon sonrası bu lokalizasyonun değiştiği ve sperm başında görülmeye başlandığı saptanmıştır (Ficarro vd., 2003). Kapasitasyon memeli sperminin fertilizasyonu gerçekleştirebilmesi için gereklidir. Bu olay sırasında birçok proteinin tirozin kuyrukları fosforile olur ve spermin hareketinin arttığı gözlenmiştir. Kapasitasyon akrozomal reaksiyon içinde gereklidir. Bu derece fertilizasyon için önemli bir olayda p97/VCP'nin de fosforile olduğunu bilmek, bu proteinin kapasitasyon için ne kadar önemli bir protein olduğunu göstermektedir. Biz de çalışmamızda sperm hücrelerinde p97/VCP'nin özellikle de baş ve kuyruk bölgelerinde var olduğunu gösterilmesiyle Ficarro ve arkadaşlarını destelemiş olduk.

Kondoh ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, p97/VCP'nin bir deniz hayvanı spermlerinde değil de, spermi ovosite çeken kemoatraktan bir madde olan sperm aktive edici faktör (SAAF)'e bağlandığı belirlenmiştir (Kondoh vd.,2008). p97/VCP'nin başlangıçta germinal vesikül aşamasındaki ovositte lokalize olduğu ve oosit olgunlaşması için gerekli olduğu bulunmuştur. Yine aynı çalışmada, p97/VCP'nin yumurtadan salınan SAAF denilen faktörün çalışmasını düzenlediği ortaya çıkarılmıştır. p97/VCP'nin siliar ve flagellar hareket için gerekli olduğu başka bir çalışmada gösterilmiştir (Hozumi vd., 2008). Yalnız bu çalışma yine insan sperminde değil, deniz hayvanı sperminde siliar hareket için gerekli olan proteinlerin araştırılması sırasında p97/VCP'nin gerekliliğini ortaya koymuştur. Bizim çalışmalarımızla uyumlu olarak bu çalışmada da sperm kuyruğunda p97/VCP'nin görülmesi, p97/VCP'nin sperm hareketliliği ile ilişkisi olabileceğini göstermektedir.

Özetle, p97/VCP'nin insan sperm hücrelerindeki varlığı ve infertil bireylerde p97/VCP'nin anlamlı derecede fazla olması, p97/VCP'nin sperm maturasyonu ve infertiliteyi etkileyen önemli bir protein olduğunu göstermektedir. p97/VCP'nin fertil ve infertil bireylerde farklı ekspresyon göstermesi nedeniyle bu çalışmanın daha detaylı moleküler çalışmalarla desteklenerek klinikte prognozda ve ya tedavide bir belirteç olarak kullanılması önerilmektedir.

5.Referanslar:

- Aarabi M, Balakier H, Bashar S, Moskovtsev SI, Sutovsky P, Librach CL, Oko R. Sperm content of postacrosomal WW binding protein is related to fertilization outcomes in patients undergoing assisted reproductive technology. *Fertil Steril*. 2014 Aug;102(2):440-7.
- Cayli,S., Ocaklı, S., Erdemir, F, Tas, U., Aslan, H., Yener, T., Karaca, Z., 2011. Developmental expression of p97/VCP (Valosin containing protein) and Jab1/CSN5 in the rat testis and epididymis. *Reproductive Biology and Endocrinology* 9, 117.
- Cayli, S., Erdemir, F., Ocaklı, S., Ungor, B., Kesici, H., Yener, T., Aslan, H., 2012. Interaction between Smad1 and p97/VCP in rat testis and epididymis during the postnatal development. *Reproductive Sciences*. 19(2), 190-201.
- Dai, R.M., Li, C.C., 2001. Valosin-containing protein is a multi-ubiquitin chain-targeting factor required in ubiquitin-proteasome degradation. *Nat Cell Biol* 3, 740-744. Delilbaşı, L., 1997. Tüp Bebek-Yardımcı Üreme Tekniklerinde Laboratuvar Yöntemleri.Bayındır Sağlık, Eğitim ve Araştırma Vakfı, Ankara.
- Dargemont C, Ossareh-Nazari B. Cdc48/p97, a key actor in the interplay between autophagy and ubiquitin/proteasome catabolic pathways. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Jan;1823(1):138-44.
- Ficarro,S., Chertihin, A., Westbrook, A., White, F., Jayes, F., Kalab, F., Marto, JA., Shabanowitz, J., Herr,JC., Hunt, D.F and Visconti, PE., 2003; 278 (13): 11579–11589.

- Günel, S., 2004. Kadın Doğum Hekiminin Erkek Faktörünün Araştırılması ve Değerlendirilmesindeki Rolü Ne Olmalıdır? Türk Jinekoloji ve Obstetrik Derneği Uzmanlık Sonrası Eğitim Dergisi, 729:129-140.
- Hozumi, A., Padma, P., Toda, T., Ide, H., Inaba, K., 2008. Molecular Characterization of Axonemal Proteins and Signaling Molecules Responsible for Chemoattractant-Induced Sperm Activation in *Ciona intestinalis*. Cell Motility and the Cytoskeleton 65, 249–267.
- Kondoh, E., Konno, A., Inaba, K., Oishi, T., Murata, M., Yoshida, M., 2008. Valosin-containing protein/p97 interacts with sperm-activating and sperm-attracting factor (SAAF) in the ascidian egg and modulates sperm-attracting activity Develop. Growth Differ. 50, 665–673.
- Lens, JW., 1996. The Spermatozoon. Bras M, Lens JW, Piederiet MH, IVF lab-Laboratory aspects of in vitro fertilization, Organon pres.
- Pickart CM. Ubiquitin enters the new millennium. Mol Cell. 2001 Sep;8(3):499-504
- Ozsoy AZ, Cayli S, Sahin C, Ocakli S, Sancı TO, İlhan DB. Altered expression of p97/Valosin containing protein and impaired autophagy in preeclamptic human placenta. Placenta. 2018 Jul;67:45-53. doi: 10.1016/j.placenta.2018.05.013
- Ogura, T., Wilkinson, A.J., 2001. AAA+ superfamily ATPases: common structure--diverse function. Genes Cells 6, 575-597.
- Meusser, B., Hirsch, C., Jarosch, E., Sommer, T., 2005. ERAD: the long road to destruction. Nat Cell Biol 7, 766-772.
- Murgia F, Corda V, Serrenti M, Usai V, Santoru ML, Hurt KJ, Passaretti M, Monni MC, Atzori L, Monni G. Seminal Fluid Metabolomic Markers of Oligozoospermic Infertility in Humans. Metabolites. 2020 Feb 11;10(2). pii: E64. doi: 10.3390/metabo10020064.
- Sutovsky P, Song WH. Post-fertilisation sperm mitophagy: the tale of Mitochondrial Eve and Steve. Reprod Fertil Dev. 2017 Jan;30(1):56-63. doi: 10.1071/RD17364. Review.
- Song WH, Yi YJ, Sutovsky M, Meyers S, Sutovsky P. Autophagy and ubiquitin-proteasome system contribute to sperm mitophagy after mammalian fertilization. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016 Sep 6;113(36):E5261-70. doi: 10.1073/pnas.1605844113. Epub 2016 Aug 22.

Ek-4: Özgeçmiş

KİŞİSEL BİLGİLER	
Adı Soyadı	: SEDA OCAKLI
Doğum tarihi	: 17/07/1981
Doğum yeri	: ELAZIĞ
Medeni hali	: EVLİ
Uyruğu	: T.C.
Adres	: Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Ankara
Tel	: 0 505 9769160
Faks	:
E-mail	: sedaslmz@hotmail.com
EĞİTİM	
Lise	: Balakgazi Lisesi
Lisans	: Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü
Yüksek lisans	: Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
YABANCI DİL BİLGİSİ	
İngilizce	: İyi
ÜYE OLUNAN MESLEKİ KURULUŞLAR	
THED: Türk Histoloji ve Embriyoloji Derneği	

