



T.C.
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARE TESTİSİNDE KÜÇÜK-VCP İLE ETKİLEŞEN
PROTEİN (SVIP) EKSPRESYONU VE
FONKSİYONUNUN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gülben AKCAN

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ PROGRAMI

Ankara, 2018

T.C.
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARE TESTİSİNDE KÜÇÜK-VCP İLE ETKİLEŞEN
PROTEİN (SVIP) EKSPRESYONU VE
FONKSİYONUNUN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gülben AKCAN

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ PROGRAMI

Ankara, 2018

T.C.
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Fare Testisinde Küçük-VCP İle Etkileşen Protein (SVIP)
Ekspresyonu ve Fonksiyonunun Belirlenmesi

Gülben AKCAN

Yüksek Lisans Tezi

Tez Savunma Sınav Tarihi

13.12.2018

Danışman

Prof. Dr. Sevil ÇAYLI

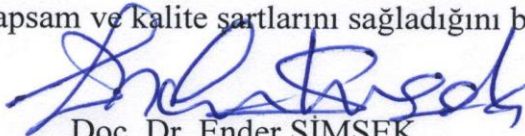
Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Sevil ÇAYLI

Prof. Dr. A. Çevik TUFAN

Doç. Dr. Sinan ÖZKAVUKÇU

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


Doç. Dr. Ender ŞİMŞEK

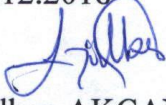
Enstitü Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans 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.

13.12.2018



Gülben AKCAN

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince sahip olduğu engin bilgi birikimi ve deneyimleriyle hepimize her daim destek olan ve yanımızda olan, fikirlerime ve bana güveniyle, sevgisini ve desteğini hissettiğim kıymetli danışmanım Prof. Dr. Sevil ÇAYLI hocama bana verdiği emek ve destek için sonsuz teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olduğunu bildiğim, verdiği önem ve değerle, sonsuz sevgi ve güvenini hissettiğim, bana işin temelini öğreterek çok farklı bir bakış açısı sunan, desteği ile hepimizi her daim koruyan kollayan kıymetli Prof. Dr. Ahmet Çevik TUFAN hocama verdiği emek, güven ve destek için sonsuz teşekkür ederim.

Engin bilgi ve deneyimleriyle, pozitif bakış açısıyla bizleri yüreklendiren, sevgi ve desteği ile her daim yanımızda olan, daha iyi yetişmemiz adına olanaklar sağlayan kıymetli Prof. Dr. H. Meltem ÖZGÜNER hocama verdiği emek ve destek için sonsuz teşekkür ederim.

Öğretmenim, dostum, sırdaşım gibi her zaman yanımda, hiçbir zaman desteğini, sonsuz sevgi ve emeğini esirgemeyen çok kıymetli Dr. Öğr. Üyesi Hilal NAKKAŞ hocama verdiği emek, güven ve destek için sonsuz teşekkür ederim. Çalışmalarım adına engin bilgisini, desteğini benimle paylaşan Dr. Öğr. Üyesi Radwan Abu-Issa hocama da sonsuz teşekkür ederim. Bana kapılarını sonuna kadar açan Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji bölümü emektarları sevgili Seyhan ÖZER ablama ve Emrah TOSUN abime bildikleri ne varsa çok büyük bir emek ve özveri ile bana öğrettikleri için sonsuz teşekkür ederim. İlk bilgilerim, ilk görgülerim sizin öğrettikleriniz. Çalışmamı, emeğimi destekleyen bana bu günlere gelme şansı tanıyan, destek olan ne kadar teşekkür etsem az olan, Doç. Dr. Sinan ÖZKAVUKÇU hocama ayrıca çok teşekkür ederim. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı başkanı sayın Prof. Dr. Alp CAN hocama ve Prof. Dr. Özgür ÇINAR hocama bana öğrettikleri için, eğitimime katkıda buldukları için sonsuz teşekkürlerimle. Hücre kültürü çalışmalarım adına bana bildiklerini öğreten ve paylaşan sevgili Uzm. Dr. Gamze DERELİ CAN hocama verdiği emek için sonsuz teşekkür ederim.

Beni kendilerinden hiçbir zaman ayırmadan, desteklerini, bildiklerini, sevgilerini, hiçbir zaman benden esirgemeyen, yeri geldi abla/abi gibi, yeri geldi arkadaş gibi beni hiçbir zaman kendilerinden ayrı görmeyen Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji asistanlarından başta canım Dr. Şule KIZIL'a, Uzm. Dr. Zeynep GÜLHAN YIĞMAN'a, Dr. Öğr. Üyesi Duru ARAS TOSUN'a, Dr. Nazlı HAYIRLI'ya, Dr. Öğr. Üyesi Ferda TOPAL ÇELİKKAN'a, Dr. Pınar BAYRAM'a ve Dr. Masoud AFSANİ'ye sonsuz teşekkür ederim. İyi ki varsınız, sizleri iyi ki tanımışım. Ayrıca çok değerli Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji bölümü emektarları Remzi Ata ve Erdoğan Çalışkan abilerime bilgilerini ve sevgilerini sonuna kadar benimle paylaştıkları için ayrıca çok teşekkür ederim. Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı asistanı arkadaşlarıma başta tez çalışmam süreci boyunca emeği, sonsuz sevgisi ve katkısı olan sevgili Uzm. Bio. Ebru ALİMOĞULLARI'na, güveni, bilgisi ve sevgisiyle her daim yanımda olan Dr. Bahar KARTAL'a, beni destekleyen, sabırları, sevgileri ve çalışma dönemi boyunca bana katkılarıyla sevgili Andaç KİPALEV NEŞELİOĞLU'na, Uzm. Bio. İlkay PİŞKİN'e, Uzm. Bio. Büşranur ÖZALPER'e, Uzm. Bio. Simge ÇELEBİ'ye, Uzm. Gen. Tuba ÖZDEMİR SANCI'ya, Bio. Şeyma KİPEL'e, Uzm. Bio. Cansu ŞAHİN'e ve Uzm. Bio. Gizem İLTER AKTAŞ'a, tüm destekleri ile beni destekleyen tüm diğer bölümlerdeki asistan arkadaşlarıma sevgi ve sonsuz teşekkürlerimle. Zekai Tahir Burak Kadın Sağlığı Eğitim ve Araştırma Hastanesi IVF uzmanı Uzm. Dr. Yeşim Bardakçı hocama, NovaArt Tüp Bebek Merkezi çok kıymetli hocaları başta Uzm. Dr. Zeynep Akyol'a, Zeynep hocama, Duygu hocama, Prof. Dr. Ahmet Erdem, Prof. Dr. Mehmet Erdem hocalarıma ve çok kıymetli çalışanlarına, beni aralarına aldıkları için çok teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan, beni her zaman destekleyen, beni yetiştiren ve sınırsız desteğini hayatımın her aşamasında hissettiren biricik anneme, canım babama, canım kardeşime ve tüm aileme sonsuz teşekkürlerimle. Siz olmasaydınız, yapamazdım...

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iv
ABSTRACT	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. İnsanda ve Farede Prenatal Testis Gelişimi	3
2.1.1. İnsan ve Farede Primordiyal Hücre Göçü	6
2.2. Farede Gonad Gelişimi.....	8
2.3. Fare Testis Dokusu Hücrelerinin Gelişimi.....	10
2.4. Testis Anatomisi.....	12
2.5. Testis Histolojisi.....	13
2.5.1. Seminifer Tübüller.....	15
2.5.2. İnterstisiyel Doku	18
2.6. Leydig Hücresi	18
2.6.1. Fetal Leydig Hücreler.....	19
2.6.2. Erişkin Leydig Hücreler	20
2.8. Steroidogenez	23
2.9. Steroidogenik Düzenleyici Protein (StAR)	23
2.10. Küçük VCP ile Etkileşen Protein (SVIP).....	24
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	28
3.1. Kimyasallar ve Ait Oldukları Kaynaklar	28
3.2. Antikorlar, Ait oldukları Kaynaklar ve Kullanım Oranları.....	29
3.3. Deney Aletleri ve Markaları.....	29
3.4. Kromojenler	30
3.5. Hücreler	30

3.6. Hücre Kültürü Malzemeleri	30
3.7. siRNA, Aktivatör ve İnhibitörler	31
3.8. Etik Kurul, Deneklerin Temini ve Deney Grupları.....	31
3.8.1. Etik Kurul Onayı	31
3.8.2. Deneklerin Temini ve Özellikleri.....	31
3.8.3. Çalışma Grupları	32
3.9. Çalışmanın Değerlendirilmesinde Kullanılan Yöntemler	33
3.9.1. Dokuların Elde Edilmesi ve Hazırlanması	33
3.9.2. Histokimyasal Değerlendirme	34
3.9.3. İmmünohistokimya Tekniği	35
3.9.4. Western Blot Tekniği	36
3.9.5. Hücre Kültürü Yöntemi.....	37
3.9.6. SiRNA Aracılığıyla İndükleme	38
3.9.7. İmmünositokimya ve İmmünofloresan Çalışmaları	39
3.9.8. Ko-lokalizasyon Çalışmaları	39
3.10. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analizler.....	40
3.10.1. Semiquantitative HSCORE Analizi	40
4. BULGULAR	41
4.1. Fetal, Neonatal, Postnatal ve Ergin Fare Testis Dokularının Histolojik İncelemesi.....	41
4.2. Fetal, Neonatal, Postnatal ve Ergin Fare Testis Dokularında SVIP ve STAR Ekspresyonlarının İmmünohistokimyasal Değerlendirilmesi	44
4.2.1. Fetal 18. günde Fare Testis Dokusunda SVIP ve STAR Ekspresyonları	45
4.2.2. Neonatal 1. günde Fare Testis Dokusunda SVIP ve STAR Ekspresyonları	46
4.2.3. Postnatal 5. günde Fare Testis Dokusunda SVIP ve STAR Ekspresyonları	47
4.2.4. Postnatal 15. günde Fare Testis Dokusunda SVIP ve STAR Ekspresyonları	48
4.2.5. Postnatal 35. günde Fare Testis Dokusunda SVIP ve STAR Ekspresyonları	49

4.2.6. Postnatal 50. günde Fare Testis Dokusunda SVIP ve STAR Ekspresyonları	50
4.2.7. Postnatal 90. günde Fare Testis Dokusunda SVIP ve STAR Ekspresyonları	52
4.3. Postnatal 90. günde fare testis dokusunda SVIP ekspresyonunun immünofloresan ile gösterilmesi	53
4.4. Fetal, Neonatal, Postnatal ve Ergin Fare Testis Dokularında SVIP ve StAR İmmüno Ekspresyonlarının HSCORE Analizi ile Belirlenmesi	54
4.5. Fare Testis Dokularının Western Blot Analizi	55
4.6. Fare Leydig Hücre Kültürü Çalışmaları	56
4.6.1. Fare Leydig Hücrelerin Ekimi, Pasajlanması ve Histolojik Özellikleri	56
4.6.2. Fare Leydig Hücrelerinde SVIP ve StAR Ekspresyonları	58
4.6.3. Fare Leydig Hücrelerinde SVIP ve StAR'ın Kolokalizasyonu	59
4.6.4. Fare Leydig Hücrelerinde SVIP siRNA ile Ekspresyonunun Baskılanması	60
5. TARTIŞMA	65
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	68
7. KAYNAKLAR	69
8. EKLER	79
EK-1. Etik Kurul Onay Formu	79
EK-2. Özgeçmiş	80
EK-3. Ulusal Platformda Sunulmuş Bildiri (Sözlü Sunum 1)	81
EK-4. Ulusal Platformda Sunulmuş Bildiri (Sözlü Sunum 2)	82

ÖZET

Fare Testisinde Küçük-VCP ile Etkileşen Protein (SVIP) Ekspresyonu ve Fonksiyonunun Belirlenmesi

Küçük VCP ile etkileşen protein (SVIP: Small VCP-InteractingProtein), Endoplazmik Retikulum ile ilişkili protein yıkımı (ERAD) ailesine ait 76 aminoasitten oluşmuş 9-Kda'luk bir proteindir. Son yapılan çalışmalar da SVIP'in androjene cevap veren bir protein olduğu ve androjenler tarafından SVIP ekspresyonunun düzenlendiği belirlenmiştir. Fakat bugüne kadar, SVIP'in androjen reseptörlerinin fazlaca ekspre edildiği testis dokusunda hücrel lokalizasyonu ve olası fonksiyonu araştırılmamıştır. Bu nedenle bu çalışmada öncelikle SVIP proteinin gelişmekte olan fare testisindeki ekspresyonu belirlenmiş ve bu proteinin olası fonksiyonunu hücre kültürü çalışmaları ile saptamak amaçlanmıştır. Gelişmekte olan fare testislerinde SVIP'in protein ekspresyonunu belirlemek amacıyla fetal (18 ve 19 günlük, n:6), postnatal (1, 5, 15, 35 günlük, n:6) ve ergin fareler (50 günlük, n:6)'den elde edilen testis dokuları İmmünohistokimya ve Western blot çalışmaları için kullanılmıştır. TM3 ve MA-10 fare Leydig hücreleri kültüre edilmiş, bu hücrelerde SVIP ve Steroidogenik akut regülör protein (STAR)'nin ekspresyonları kolokalizasyon çalışmalarıyla değerlendirilmiş ve SVIP siRNA'leri kullanılarak SVIP ekspresyonu baskılanarak STAR protein ekspresyonundaki değişimler çalışılmıştır. Bu çalışmada ilk defa androjen reseptörü olarak literatürde geçen SVIP proteinin İmmünohistokimya ve Western blot çalışmaları sonucunda ekspresyonu gösterilmiştir. Fetal, postnatal ve ergin farelerin testislerinde SVIP'in baskın olarak Leydig hücrelerinde ekspre olduğu ve gelişmekte olan testis dokularında ekspresyonunun arttığı belirlenmiştir. TM3 ve MA-10 Leydig hücrelerinde de SVIP proteini ekspresyonlarının gözlenmesi sonucu steroidogenezle ilişkisi kurulmuş ve SVIP proteinin baskılanması sonucu Leydig hücre belirteci olarak bilinen ve steroidogenezde aktif rol alan steroidogenik akut regülör protein (STAR)'in proteinin ekspresyonunda azaldığı gösterilmiştir ve proteinler arasında korelasyonlar gözlenmiştir.

Anahtar kelimeler: SVIP, STAR, Fare Testisi, Leydig Hücresi.

ABSTRACT

Determination of expression and function of small-VCP-interacting protein (SVIP) in mouse testis

Small VCP-Interacting Protein (SVIP) is a 9-kDa protein that is composed of 76 amino acids of the family of Endoplasmic Reticulum-Associated Protein Degradation (ERAD). Recent studies have shown that SVIP is an androgen-responsive protein and SVIP expression is regulated by androgens. Until now, however, the cellular localization and possible function of SVIP in tissue, where the androgen receptors are overexpressed, have not been investigated. Therefore we aimed to detect the protein expression of SVIP at the cellular level and the possible function of SVIP in mouse testis by cell culture studies. In developing mouse testes, fetal (18 and 19 days, n: 6), postnatal (1, 5, 15, 35 days, n: 6) and adult mice (50 days, n: 6) were used to determine protein expression of SVIP. The obtained testis tissues were used for Immunohistochemistry and Western blot studies. In addition, TM3 and MA-10 mouse Leydig cells were cultured, and the expression of SVIP and the steroidogenic acute regulator protein (STAR) were evaluated by fluorescence microscopy with colocalization studies. The expressional changes of STAR were studied by using SVIP siRNA's in Leydig cell cultures. In this study, the expression of the SVIP protein, was demonstrated by Immunohistochemistry and Western blot studies. The expression of SVIP protein was increased in developing testicular tissues. In fetal, postnatal and adult mice testes SVIP expression was predominantly observed in Leydig cells. SVIP expression was also detected in TM3 and MA-10 Leydig cells and the correlation between SVIP expression and steroidogenesis was established. Suppression of SVIP resulted in the diminished expression of STAR which is a Leydig cell marker. The expression of two proteins were positively correlated in Leydig cell.

Key words: SVIP, STAR, Mouse Testis, Leydig Cell.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABP	: Androjen Bağlayıcı Protein
AEC	: 3-Amino-9-ethylcarbazole
ALH	: Erişkin Leydig Hücresi
AMH	: Anti Mülleriye Hormon
AR	: Androjen Reseptörü
BSA	: Sığır Serum Albumini
DAB	: 3,3'-Diaminobenzidine
DMEM	: Ham's F12, DMEM
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DPC	: Day Post Koitum (koitasyon sonrası gün)
DPP	: Day Post Partum (doğum sonrası gün)
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
ERAD	: Endoplazmik Retikulum İlişkili Degradasyon
ER	: Endoplazmik Retikulum
FLH	: Fetal Leydig Hücresi
H&E	: Hematoksilen Eozin Boyası
IF	: İmmünofloresan
IHC	: İmmünohistokimya
ISC	: İmmünohistokimya
kDa	: Kilo dalton
MA-10	: Tümör Leydig Hücre Hattı
PBS	: Fosfat Tamponlu Çözelti

PGH	: Primordiyal germ hücresi
SF-1	: Stereoidogenik Faktör 1
SiRNA	: Küçük İnterferans Ribonükleik Asit
Sox 9	: Sry Bölge İçeren Gen 9
SRY	: Cinsiyet Belirleyici Bölge Y (Sex Determining Region Y)
StAR	: Stereoidogenik Akut Düzenleyici Protein
SVIP	: Küçük VCP ile ilişkili protein
TM3	: Leydig Hücre Hattı
Ub	: Ubikütin
VCP	: Valosin İçeren Protein
VIM	: p97/VCP İlişkili Motif
μ l	: Mikrolitre
μ g	: Mikrogram
μ M	: Mikromolar
$^{\circ}$ C	: Santigrat derece

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Primordiyal hücre göçü ve testis/ovaryum farklanması	4
Şekil 2.2. Bipontansiyel gonad farklılaşması.....	5
Şekil 2.3. Farede primordial germ hücre göç yolu.....	6
Şekil 2.4. Fare embriyonunda primordial germ hücresi (PGH) göçü	7
Şekil 2.5. XX ve XY gonadların farklı gelişiminde karakteristik rol oynayan genetik yollar.....	9
Şekil 2.6. Genital kanal sisteminin gelişimi ve farklılaşması	10
Şekil 2.7. Gelişmekte olan fare testisin anatomisi ve histolojisi	11
Şekil 2.8. Fare testis dokusu histolojisi.....	14
Şekil 2.9. Fare testis dokusundaki hücreler	14
Şekil 2.10. Erkek germ hücrelerinin farklılaşması.....	17
Şekil 2.11. Fetal Leydig hücre gelişimi	20
Şekil 2.12. Steroidogenezin şematik gösterimi.....	24
Şekil 2.13. ERAD yolağında SVIP	25
Şekil 2.14. SVIP proteininin birçok fare dokusundaki Western Blot analizi	26
Şekil 3.1. Testosteron üretimi ile korele olan çalışma gruplarımızın belirlenmesi....	32
Şekil 4.1. Fare 18 günlük fetal testisinin histolojik özelliklerinin hücresel düzeyde Hematoksilen Eozin boyaması ile gösterilmesi	41
Şekil 4.2. Fare neonatal 1 günlük testisinin histolojik özelliklerinin hücresel düzeyde Hematoksilen Eozin boyaması ile gösterilmesi	42
Şekil 4.3. Fare postnatal 5, 15 ve 35 günlük testisinin histolojik özelliklerinin hücresel düzeyde Hematoksilen Eozin boyaması ile gösterilmesi.....	43
Şekil 4.4. Fare postnatal 50 günlük testisinin histolojik özelliklerinin hücresel düzeyde Hematoksilen Eozin boyaması ile gösterilmesi	44
Şekil 4.5. 18 günlük fetal fare testis dokusunda SVIP ve STAR proteinlerinin ekspresyonları	45
Şekil 4.6. Neonatal 1 günlük fare fare testis dokusunda SVIP ve STAR proteinlerinin ekspresyonları	46
Şekil 4.7. Postnatal 5 günlük fare testis dokusunda SVIP ve STAR proteinlerinin ekspresyonları	47

Şekil 4.8. Postnatal 15 günlük fare testis dokusunda SVIP ve STAR proteinlerinin ekspresyonları	48
Şekil 4.9. Postnatal 35 günlük fare testis dokusunda SVIP ve STAR proteinlerinin ekspresyonları	49
Şekil 4.10. Postnatal 50 günlük fare testis dokusunda SVIP ve STAR proteinlerinin ekspresyonları	51
Şekil 4.11. Postnatal 90 günlük fare testis dokusunda SVIP ve STAR proteinlerinin ekspresyonları	52
Şekil 4.12. Postnatal 90 günlük fare testis dokusunda SVIP ekspresyonun immüno floresan incelenmesi	53
Şekil 4.13. Fetal, neonatal, postnatal ve ergin fare testis dokularında SVIP ve STAR immüno ekspresyonlarının HSCORE analizi	54
Şekil 4.14. Fetal, neonatal, postnatal ve ergin fare testis dokularında SVIP ve STAR immüno ekspresyonlarının Western blot analizi.....	55
Şekil 4.15. TM3 ve MA-10 fare Leydig hücrelerinin invert mikroskop altındaki görünüşleri	56
Şekil 4.16. TM3 ve MA-10 fare Leydig hücrelerinin Hematoksilen-Eozin ile boyandıktan sonraki ışık mikroskopik görünüşleri	57
Şekil 4.17. TM3 ve MA-10 fare Leydig hücrelerinde SVIP ve STAR proteinlerinin ekspresyonlarının immüno sitokimya yöntemi ile gösterilmesi	58
Şekil 4.18. TM3 ve MA-10 fare Leydig hücrelerinde SVIP ve STAR proteinlerinin kolokalizasyonlarının çiftli immüno floresan boyanması ile gösterilmesi	59
Şekil 4.19. TM3 Leydig hücrelerinde SVIP ekspresyonunun baskılanması	60
Şekil 4.20. MA-10 Leydig hücrelerinde SVIP ekspresyonunun baskılanması.....	61
Şekil 4.21. TM3 Leydig hücrelerinde SVIP ekspresyonunun baskılanması sonucu SVIP ve STAR proteinlerinin Western blot analizi.....	63
Şekil 4.22. MA-10 Leydig hücrelerinde SVIP ekspresyonunun baskılanması sonucu SVIP ve STAR proteinlerinin Western blot analizi.....	64

1. GİRİŞ

Küçük VCP ile etkileşen protein, SVIP (Small VCP-interacting protein) 76 aminoasitten oluşmuş, 9-Kda'luk, p97/VCP'ye direk bağlanabilen bir adaptör Endoplazmik Retikulum (ER) proteindir (1). Endoplazmik Retikulum (ER) ökaryotik hücrelerde yeni oluşan proteinlerin %30'unu içerir. ER içindeki kalite kontrol mekanizması ile, düzgün ve yanlış katlanmış proteinlerin ayrımı yapılır. Yanlış katlanan proteinlerin ER ile ilişkili yıkım (ERAD: Endoplasmic Reticulum Associated Protein Degradation) yoluyla bozulduğu ve dahası ERAD'ın, ER'nin normal proteinlerinin seviyelerini de düzenleme gibi diğer fizyolojik süreçler için de önemli olduğu belirtilmiştir (2). SVIP, ER membranının sitozolük yüzeyinde lokalizedir. SVIP, ERAD yolağını, yine bu yolda merkezi rol oynayan p97/Valosin içeren protein (VCP) ile etkileşime girerek inhibe etmektedir (3, 4). Son yıllarda yapılan çalışmalarda, ERAD bileşenlerinin ekspresyonlarının androjenler tarafından düzenlendiği belirtilmiştir. SVIP androjene duyarlı gen olarak tanımlanmış, promoter veya düzenleyici bölgesinde, potansiyel androjen tepki elementlerinin (ARE'ler) var olduğu kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) kullanılarak doğrulanmıştır (5). En son çalışmalarda, prostat kanser hücrelerinde SVIP'in ekspresyonunun androjenlerce baskılandığı gösterilerek bu proteinin prostat kanserindeki önemi vurgulanmıştır (2). Son olarak ise, prostat kanserine benzer bir mekanizma ile glioma (beyin tümörü) hastalarında, androjenlerce SVIP protein ekspresyonunun baskılandığı ve glioma tedavisinde bu proteinin kullanılması gerektiği önerilmiştir (6).

SVIP'in fare beyninin serebrum ve serebellumunda yüksek oranda eksprese edildiği, kalp, akciğer, iskelet kası ve ince bağırsakta da normal seviyelerde ekspresyonunun olduğu gösterilmiştir (7).

Androjen reseptörü (AR) olarak belirtilen SVIP'in erkek üreme ve gelişimi ile de yakından ilişkili olabileceği bu tez çalışmasında hipotez edilmiştir. Androjenler testis için hem bir kaynak, hem de önemli bir hedef olmakla beraber androjenlerin, spermatogenezin kontrolünde hayati bir rol oynadığı bilinmektedir. Androjen reseptör geni (ARG) tarafından eksprese edilen androjen reseptörleri (AR) aracılığı ile androjenler etkilerini gösterirler (9). Androjenler, gonadal steroid hormonu olan testesteron ve dihidrotestesteron olarak testiste Leydig hücreleri tarafından oluşturulur. Başta erkek üreme sistemi fonksiyonel gelişimi olmak üzere ve diğer sistemler için (örneğin: prostat, folikülogenez ve meme bezi gelişimi) üretilir, dışı de ise eser miktarda üretilirler. Testesteron, üreme fonksiyonuna aracılık ettiği gibi davranış ve nöroendokrin fizyolojik cevaplar üzerinde de rol oynar. Dahası testesteron, östrojen gibi beyin cinsel farklılaşmasında kritik bir rol oynar (10). Çünkü AR, sadece erkek üreme sisteminin geliştirilmesi ve sürdürülmesinde değil, memeli dokularında bir çok yerde bulunur ve bu nedenle androjenler, nöral dokuların gelişiminden, bağışıklık fonksiyonunun düzenlenmesine kadar çeşitli rollere sahip olduğu belirtilmiştir (11). Fetal Leydig hücre gelişimi için gerekli olmasa da, erişkin Leydig hücre gelişimi için androjen ve LH'nin gerekli olduğu bildirilmiştir (12, 13).

Fakat bugüne kadar androjene cevap veren protein olarak tanımlanmış SVIP'in androjen reseptörlerinin fazlaca ekspre edildiği bir erkek üreme organı olan testis dokusunda hücrel lokalizasyonu ve olası fonksiyonu araştırılmamıştır. Bu nedenle bu tez çalışmasının amacı SVIP proteininin fare testis dokusunda gelişimsel olarak incelenmesi ve olası fonksiyonunun belirlenmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

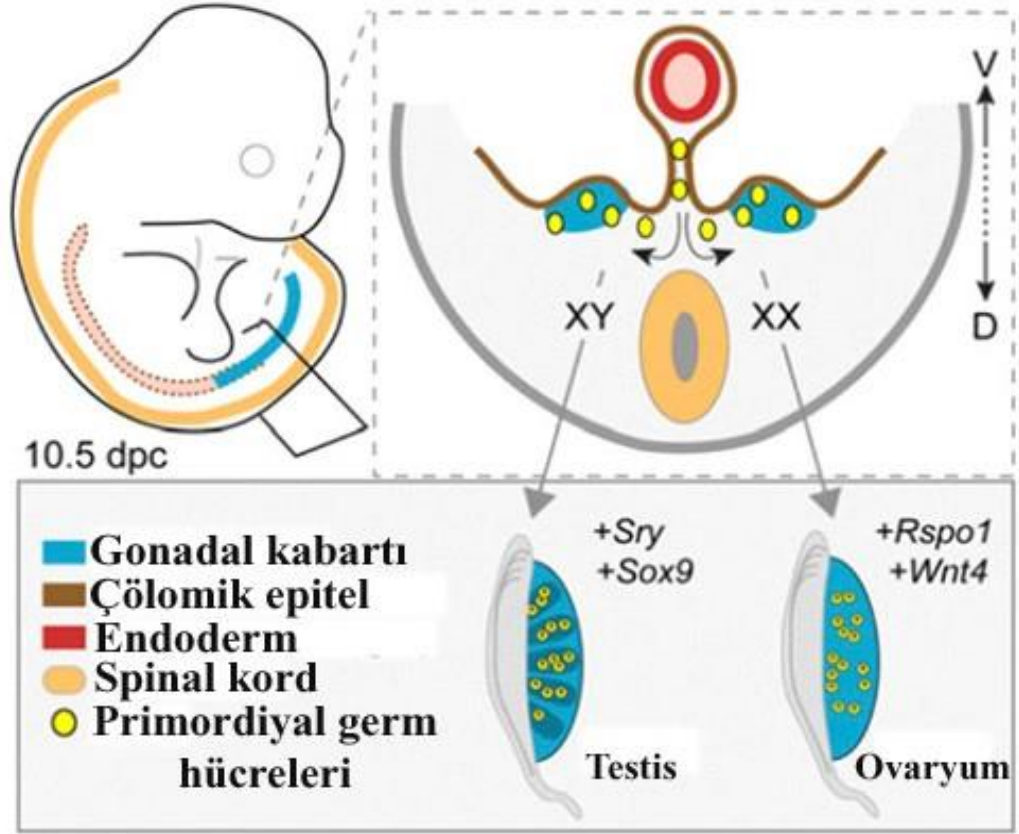
2.1. İnsanda ve Farede Prenatal Testis Gelişimi

İnsan embriyosunda gelişimin 7. Haftasına kadar dişi ve erkeğe ait gonad farklılaşması yoktur. Başka bir deyişle henüz morfolojik olarak testis ve ovaryum ayırt edilemez. İnsan embriyosunda dişi ve erkek gonadal farklılaşma 7. haftadan farelerde ise 10,5 dpc (day post coitum, koitasyon sonrası gün) günü itibariyle görülmeye başlanır (14).

Memeliler için erkek cinsiyet gelişimi, Y kromozomu üzerinde bulunan SRY geni (Sex Determining Region Y) tarafından başlatıldığı bilinmekte olup, embriyonda testis oluşumunu sağlamaktadır. Bu genin yokluğunda, embriyoda dişi genital üreme organları gelişir. SRY geni üzerinden salgılanan faktör olan, cinsiyet tayini farelerde Tdy ve insanlarda TDF (testis belirleyici faktör) olarak belirlenmiştir (15). SRY'nin ekspresyonu testis farklılaşması için belirli bir düzeye ulaşması gerekmekte olduğu belirtilmiştir. 10,5 gün sonra, farelerde SRY ifadesinin başladığı, 11,5 dpc'de zirveye ulaştığı ve 12,5 dpc'de ise saptanamaz olduğu gösterilmiştir.

SRY geni ile birlikte testis oluşumuna katılan diğer bir faktörde Sox9 (Sry box-containing gene 9) ifadesidir. Sox9, testis gelişimi için önemli bir transkripsiyon faktörüdür (16). Farede SRY, Sox9'un testis-spesifik ekspresyonunu iki yolla aktive eder. Birinci mekanizmada SRY, SF1(steroidogenik faktör 1) ile birlikte nükleotit reseptör alt ailesinden olan TESCO (TES [testis spesifik Sox9] COre)'ya bağlanır (17). TESCO dizisi, fare, sıçan, köpek ve insan arasında yüksek oranda korunan birkaç SRY bağlama bölgesi içerir (15). Sox9'un aktivasyonu için TESCO'da SRY bölgelerine bağlanır. SRY, Sox9 ifadesini, ikinci mekanizmada, Er71 (ETS ile ilgili 71; ayrıca ETS varyantı 2, ETV2 olarak da bilinir) aracılığıyla düzenler. SRY transkripsiyonel faktör, SF1 ile Er71'in promoter bölgesine bağlanır, Er71 ekspresyonunu aktive eder. Er71, daha sonra Sox9 proksimal promotörüne bağlanarak Sox9 ekspresyonunu düzenler. Sry ifadesinden sonra, Sox9, Er71 ifadesini kontrol etmek için Er71'e bağlanır. Böylelikle, Er71 ve Sox9'un

transkripsiyonu, farede Sox9 ile birlikte aktive olur ve AMH' nin (Müllerian inhibitör madde, MIS olarak da bilinen Anti Müllerian hormonu) ekspresyonunu doğrudan düzenler. Testis farklılaşmasının başlatılması sonrası, testiste ilk oluştuğu görülen Sertoli hücrelerinde AMH ifadesi uyarılır (18).

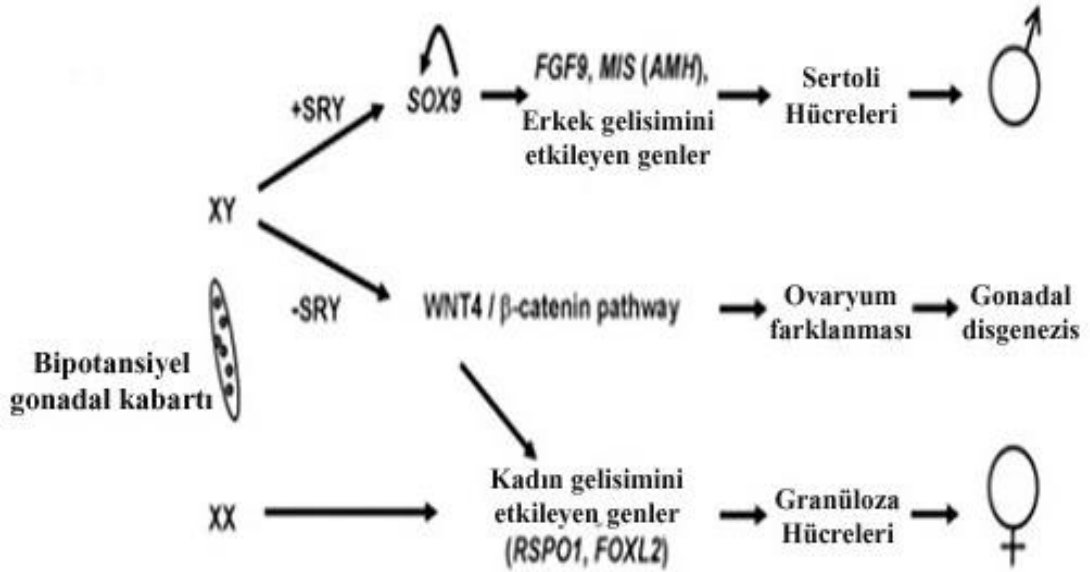


Şekil 2.1. Primordiyal hücre göçü. Testis/ovaryum farklılaşması ile testis de medullanın gelişimi ile seminiferöz kordonların oluşumu şematize edilmiştir (19). Testis gelişimi için Sry ve Sox9 faktörünün rolü gösterilmiştir.

AMH (Anti Müllerian Hormon) ifadesi, (Müllerian inhibitör substance (MIS) olarak da bilinen) (20) Sertoli hücre belirteci niteliği taşıdığı belirtilmiştir. Her ne kadar SRY ve AMH geni arasında doğrudan bir etkileşim henüz bulunamasa da SRY'nin Sertoli hücre farklılaşmasını başlatıcı etki yaptığı ve SRY ifadesi başlagıcından yaklaşık 20 saat sonra AMH geni ekspresyonu başladığı gözlemlenmiştir (21, 22). AMHR geninin Sertoli, Leydig hücrelerinde ve Müllerian kanalı çevresinde bulunan mezenkimal hücrelerde ifade edildiği gösterilmiştir (23).

Sox9 ile birlikte, AMH ekspresyonunun düzeyini kontrol etmek için steroidogenik faktör 1 (SF-1) de gereklidir (20, 23). SF-1 (Ad4BP veya NR5A1 olarak da bilinir), adrenal kortekste dahası testis içerisinde Leydig ve Sertoli hücrelerinde ifade edilen gonad ve adrenal bez gelişimi için gerekli bir reseptördür. SF-1 granüloza (ekspresyon seviyeleri foliküller arasında değişmesine rağmen), teka, korpus luteum ve ovaryumdaki interstisyel bez hücrelerinde de tespit edilmiştir (24, 25). SF-1'in mutasyonu için homozigot olan farelerin, adrenal bez ve gonadlarının gelişmemekte olduğu ve ayrıca SF-1 mutasyonları için heterozigot olan fareler stres altında bozulmuş adrenal bez fonksiyonu olduğu belirtilmiştir (14).

SF-1 için adrenal bezdeki steroidogenez ve testislerde Leydig hücrelerinde testosteron sentezi için birkaç gen bulunmakta ve gerekli proteinleri kodlamaktadır ki, bu proteinlerin başında ise steroid biyosentezinde kolesterol alımını düzenleyen steroidogenik akut düzenleyici (STAR) proteini gelmektedir (26).

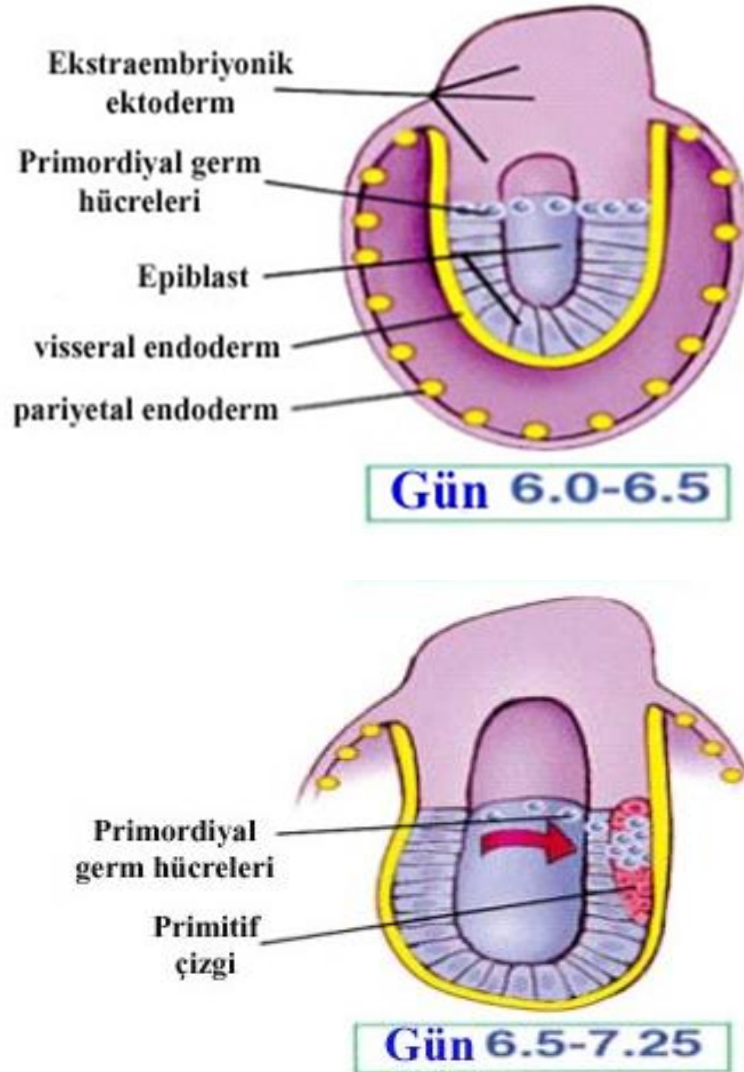


Şekil 2.2. Bipotansiyel gonad farklılaşması. İnsan ve fare testis gelişiminde rol oynayan Sry ve Sox9 moleküllerinin yanı sıra FGF9, AMH gibi diğer birçok faktöründe testis gelişimine katkı sağladığı gösterilmiştir (27).

Son dönemde (2017-Scientific Reports dergisinde Mamsen ve ark. tarafından yayımlanan) insan gonadları üzerinde yapılan bir çalışmada ise, insanda SRY/Sox9 ifadesinin 40. günde başladığı, 53. günde ise androjen üretiminin tespit edildiği ilk defa belirtilmiştir (28).

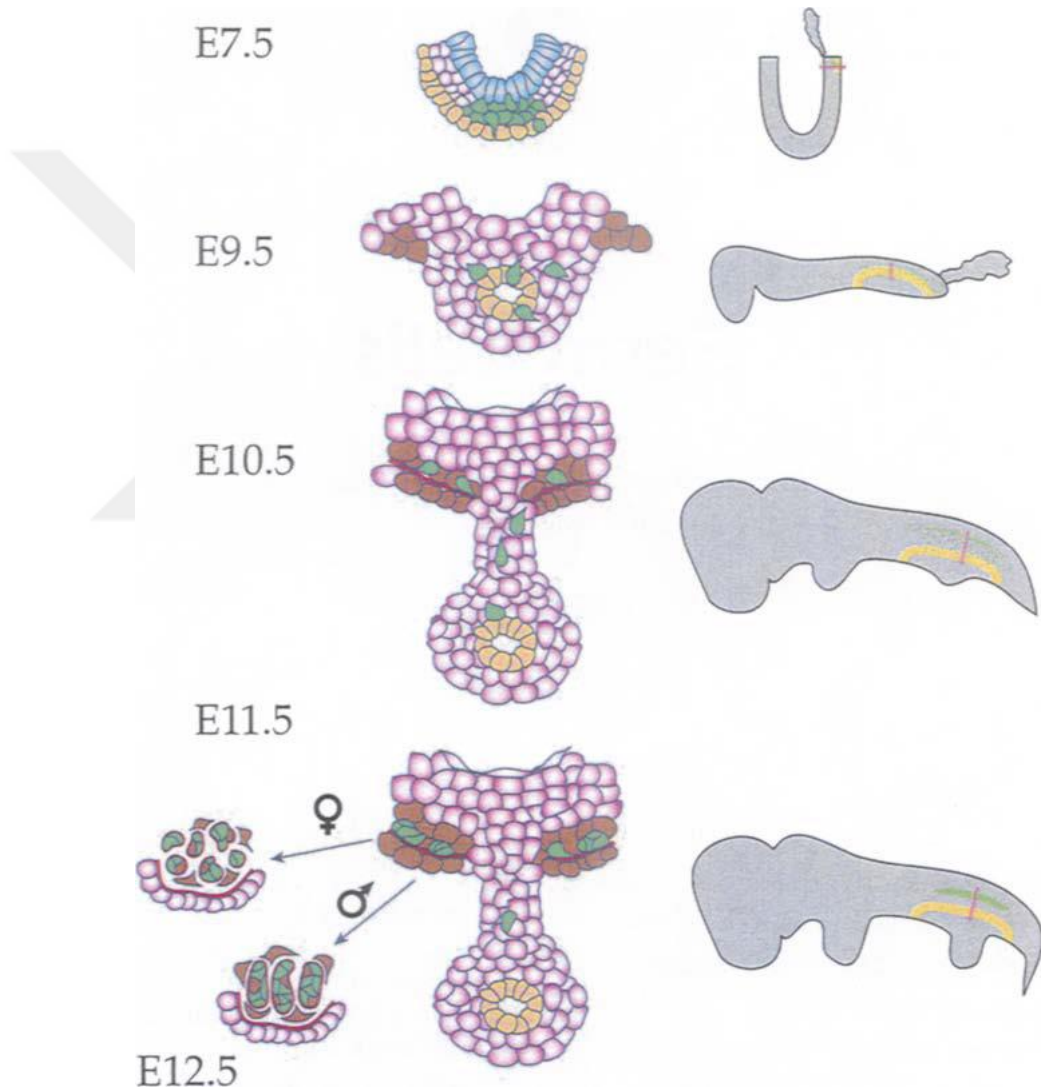
2.1.1. İnsan ve Farede Primordiyal Hücre Göçü

Memeli fetüsünde, gonad ve germ hücreleri orijinal olarak bipotansiyeldir, oogonya ile ovaryum veya spermatogonya ile testis geliştirebilir.



Şekil 2.3. Farede PGH göçü. Kırmızı oklar ile PGH'lerin göç yollarını göstermek için kullanılmıştır (29).

Gametleri oluşturacak olan hücreler ilkel germ hücreleri (PGH'ler) olarak adlandırılır. İnsanda ilk kez 4 haftalık fetüste, farelerde ise başlangıçta 6.günde vitellus kesesinden mezenter boyunca arka vücut duvarının sağ ve sol yanlarına doğru yaklaşık olarak 10-100 adet primordiyal germ hücresi (PGH) göç eder (30). Vitellus kesesi duvarının endoderminde ve insanda 4-6. haftaya kadar, farede ekstraembriyonik mezoderm içinde embriyonik günde 7,25-7,5 dpc arasında ayırt edilebilirler. Alkalen fosfataz enziminden zengin olmaları ile göç eden ve çoğalan PGH'leri görülebilir (29, 31).

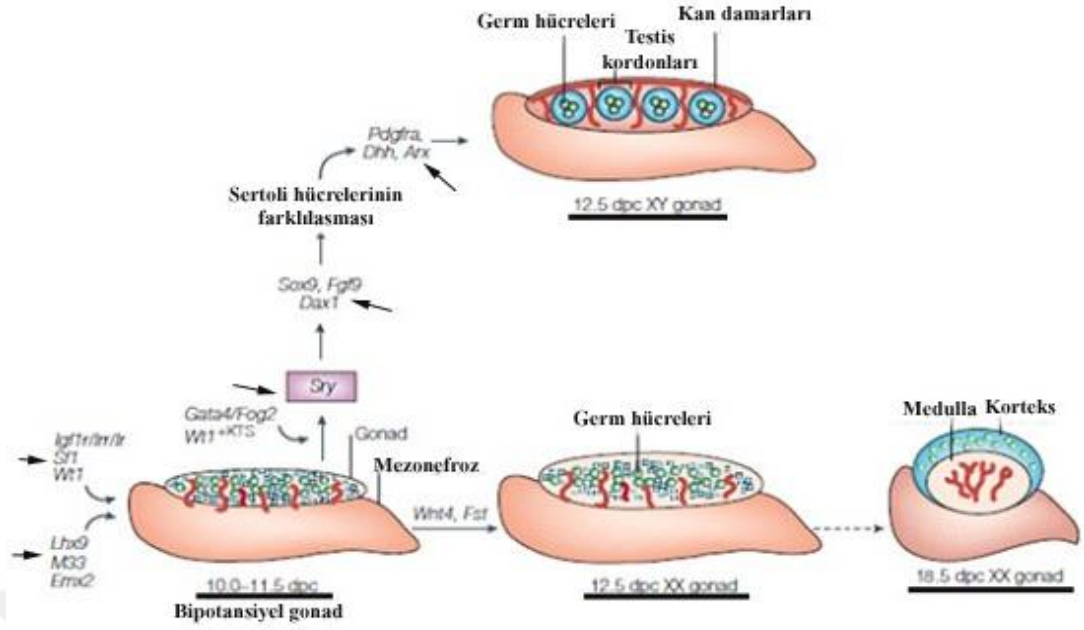


Şekil 2.4. Fare embriyosunda primordial germ hücresi (PGH) göçü. Her aşamada şematik midsagittal bölümünden bir kesit gösterilir. PGH'ler (yeşil) E7,5 (embriyonik gün 7,5) civarında posterior embriyo endoderm (sarı) içine göç eder. E9,5'e kadar arkalarda kalırlar. E10,5 ile E11,5 arasında lateral ve dorsal olarak arka epitelyumdan göç eder ve gonadal kabartılara girerler. Burada seminiferöz kordonları oluşturmak için gonadal somatik hücreleri (kahverengi) ve bazal membranı (kırmızı) birleştirirler. Bu seminiferöz kordonlar cinsel olarak dimorfiktir: kadınlarda düzensiz kümelerdir, oysa erkeklerde uzarlar. Gonadal somatik hücrelerin kesin sınırları bilinmemektedir (32, 33).

2.2. Farede Gonad Gelişimi

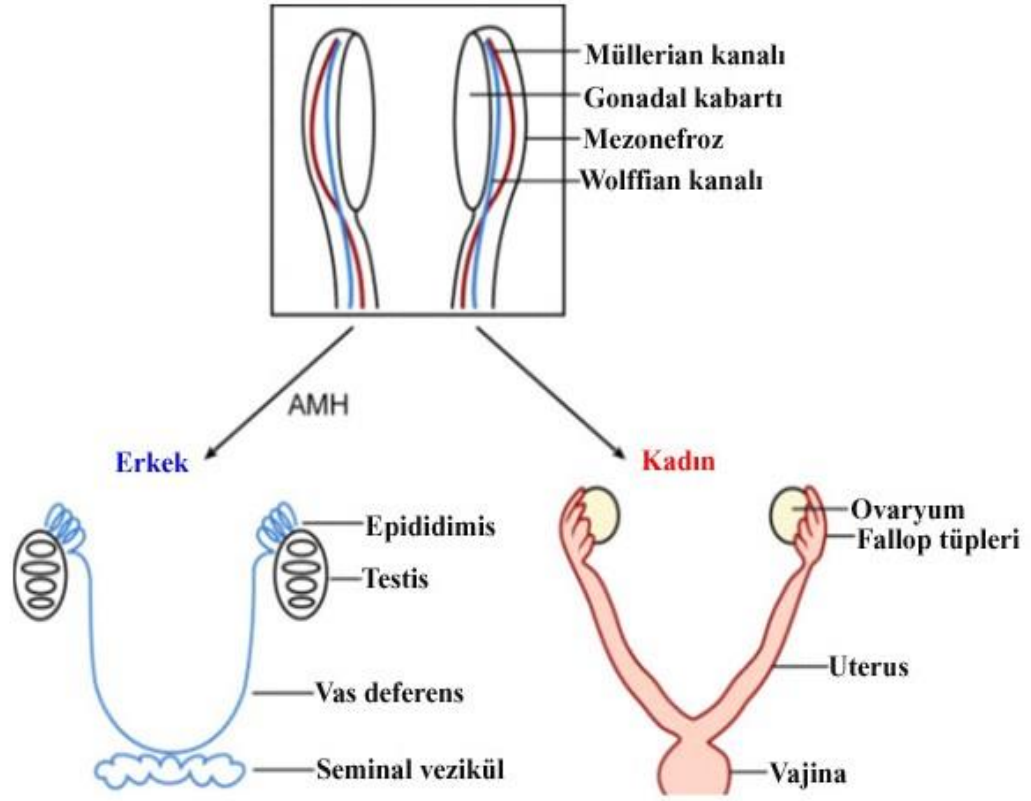
Gastrulasyondan sonra, fare embriyosundaki organogenezde gonad gelişimi yaklaşık koitasyon sonrası (dpc) 8. gün itibarıyla başlar. Ara mezodermden (ürogenital kabartı) köken alan gonadlar, böbreküstü bezi, böbrek ve üreme kanalları ile birlikte fare embriyosunda 9,5 dpc'de gözlemlenmiştir. 10,5 dpc'de, dorsal aortanın her iki tarafında bilateral olarak, orada bulunan epitelyal hücrelerin çoğalmasıyla ürogenital kabartı oluştuğu gözlemlenmiştir (34). Wilms Tümör 1 (Wt1), LIM homeobox proteini 9 (Lhx9), DAX 1 ve Steroidogenik faktör 1 (SF1) her iki cinsiyette de bipotansiyel gonad oluşumu için gerekli olan genler olarak tanımlanmışlardır (35–38). İlk başta hiçbir morfolojik farklılık gözlenmeyen gonadlarda Y kromozumda bulunan SRY geninin TDF'i aktive etmesi ile erkek gonadal gelişimi başlamıştır. Yine erken dönemde 11,2 dpc'da bu moleküllere ek olarak, FGF9'un (Fibroblast büyüme faktörü) XY gonadlarındaki testis gelişimi sırasında epitelyal hücrelerin proliferasyonunu stimüle etmede rol oynarak Sertoli hücre farklılaşması ve gelişiminde önemli rol oynadığı gösterilmiştir (39). Dahası Lhx9, Emx2, Wt1, Cbx2, Nr5a1, Six1 / 4 ve insülin reseptörlerini kodlayan genler Igf1r / Irr / Ir dâhil olmak üzere çeşitli genler, fare nakavt çalışmalarında her iki cinste de bipotential gonadal (genital) kabartının gelişmesinde rol oynadığı gösterilmiştir (19).

Ürogenital kabartı mezenter ile periton boşluğunda, gergin ve yan yana iki adet doku içerir: gelişmemiş gonad medialde bulunan ve yine mezonefroza bulunan, erkek ve dişi üreme kanallarını oluşturacak olan, çift halinde Wolf ve Müller kanalları içerdiği belirtilmiştir. Gonad gelişimine paralel olarak metanefrik böbrek kaudal mezonefroza çıkarken, aynı zamanda adreno-gonad primordiyumun dorsal tarafında gonad ve mezonefroza arasında ortaya çıkar ve böbreküstü bezini oluşturmak için anteriorda 12,5 dpc'da görülmüştür (40). Böbreküstü bezi ve böbrek her iki cinsiyette de abdominal bölgeye doğru yükselmiş ve gonadın son pozisyonu bir yumurtalık veya testise farklılaşmasına ve cinsiyete özgü Müller veya Wolf kanallarının gelişmesine bağlı olduğu belirtilmiştir.



Şekil 2.5. XX ve XY gonadların gelişiminde karakteristik rol oynayan genetik yollar. Hücre proliferasyonunun teşviki ve erken bipotansiyel gonad gelişimi için Sf1, Wt1, Lhx9, M33, Emx2, Igf1r / Ir / Irr gibi birçok faktör gereklidir. 10,5–12,0 dpc arasında, GATA4 / FOG2 ve WT1 + KTS, XY gonadındaki Sry ifadesinin aktivasyonunda rol oynamaktadır. Sry ifadesi XY gonadını testis yönüne doğru yönlendirir. Sox9, Fgf9 ve Dax1, Sry ifadesinin başlatılmasından sonra testis farklılaşmasının erken aşamalarında rol oynar. Pdgf, Dhh, Arx sinyal yolları, erken testis gelişimini karakterize eden hızlı yapısal değişiklikleri destekledikleri gösterilmiştir (41).

Primordiyal gonad yapıları bir dış kortikal ve bir iç medüller bölgeye ayrılmış olup, erkekte, testosteronun etkisiyle, medullar bölgenin gelişimi desteklenir ve korteksin regrese olduğu bildirilmiştir aynı zamanda Wolf kanalının gelişip Müller kanalının regresyonuna Anti Müllerian hormonu (AMH veya Müllerian inhibitör madde, MIS) aracılık eder. Başka bir peptid hormonu, insülin benzeri 3 (Insl-3)'ün, testiküler inişe aracılık ettiği bildirilmiştir (42). Primordiyal gonadal (genital) kabartılarda daha önce yolk kesesinden ara mezoderme göç eden primordiyal germ hücreleri erkekte medullanın gelişimi ile birlikte seminiferöz kordonları oluşturur sonrasında ise rete testis, seminiferöz kordonlar ve testis septumlarının oluştuğu belirtilmiştir (43).

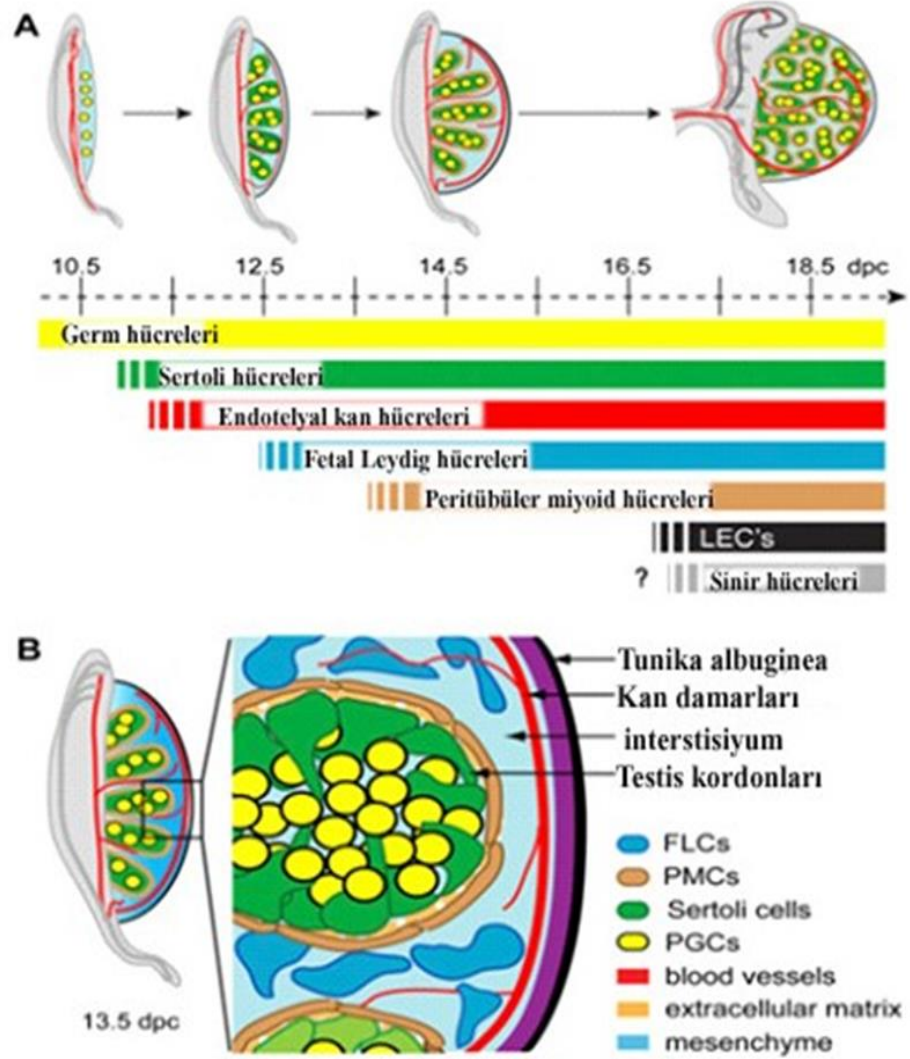


Şekil 2.6. Genital kanal sisteminin gelişimi ve farklılaşması. Müllerian ve Wolffian kanallarının ikisi de bipotential aşamasındadır. Erkeklerde, Müllerian kanalları, testis Sertoli hücreleri tarafından salgılanan AMH'nin etkisi altında dejenere olurken, Wolffian kanalları, Leydig hücreleri tarafından üretilen androjenlerin kontrolü altında epididimisler, vas deferens ve seminal veziküllere ayrılır. Kadınlarda, Wolffian kanalı regrese olur ve Müllerian kanalı, yumurtalık, uterus ve üst vajinaya ayrılır (40).

2.3. Fare Testis Dokusu Hücrelerinin Gelişimi

Testislerin fetal ve neonatal gelişimi, spermatogenez başlangıcına kadar farklılaşmamış gonadal kabartıdan tüm testis hücre tiplerini etkileyen bir dizi ardışık olaylar içerir (44).

Germ hücreleri, ekstraembriyonik bölgelerden göçü sırasında bölünür. Bu hücreler, gonada ulaştıklarında ortaya çıkan seminifer kordonlar içine alınırlar. Gonositler, 15,5 (fare) fetal güne kadar seminifer kordonlarında çoğalırlar, bundan sonra, mitozaya devam ederler ve doğuma kadar sessiz kalırlar (49–51).



Şekil 2.7. Gelişmekte olan fare testisin anatomisi ve histolojisi. (A) testis organogenezisi sırasında hücre farklılaşmasının gösterimi. Gonadal kabartılar içerisinde ilk görülen germ hücreleri (sarı) olup, farklılaşan ilk somatik hücreler ise Sertoli hücreleridir (yeşil) ve sonrasında kan endotel hücreleri de göç eder (19). Fetal Leydig hücre başlangıcının ise yaklaşık 12,5 gün olduğu görülmektedir. (B) Yaklaşık 13,5 günde testis dokusu içerisindeki hücrelerinin oluşum şeması gösterimi.

Sertoli hücreleri farklılaşan ilk hücrelerdir. Bu büyük hücreler birbirine yapışır ve seminifer kordonları oluşturmak için primordiyal germ hücrelerini kuşatır (45). Bu işlem, farede 11,5 ila 12,5 dpc'da oluşur. Sertoli hücreleri doğuma kadar 2–3 haftaya kadar çoğalmaya devam ederler, bu da mitotik aktivitenin farede 18,5 dpc'da sayıları oldukça çoktur (46–49).

Fetal Leydig hücreleri interstisyel kompartmandaki mezenşim hücrelerinden ayrılırlar (52). Fetal testis, sıçanda 15,5 dpc günü (53, 54) testosteron üretmeye başlar ve 14,5 dpc'de 3 β -hidroksisteroid dehidrogenaz (3 β HSD) ifadesi görülür. Farede ise 14,5 dpc'de testosteron fare testislerinde tespit edilmiştir (55) ancak fetal fare testisinin testosteron üretmeye başladığı zaman bilinmemektedir. Farede testisinde testosteron üretiminin, 18,5 dpc'de en yüksek olduğu doğuma doğru azaldığı ve doğum sonrasında erişkin zamana kadar sabit kaldığı gözlenmiştir (54).

İnsanda ise 14-15. hafta boyunca Leydig hücrelerinin testis hacminin yarısından fazlasını oluşturduğu ve androjenlerdeki yükselme ile de ilk 15. haftada testosteronun fetal insan testisi tarafından salgılanmış olduğu gösterilmiştir (56).

2.4. Testis Anatomisi

Testisler genellikle, skrotum içerisinde, 10-14 gram ağırlığında her ikisi de tunika albuginea tarafından kapsüllenen, funiculus spermaticusa asılı durumda (oblik pozisyonda) interstisyel doku ve seminifer tübüllerden oluşur. Fetal hayatta karın boşluğu içinde, fascia transversalis ile periton arasında gelişen testisler, doğumdan önce, kanalis inguinalisten (karın boşluğundan skrotum içine geçiş yolu olan) geçerek skrotum içine iner. Kanalis inguinalis fetal hayatta gubernaculum testis tarafından belirlenir (57).

Processus vaginalis testislerin karın boşluğundan skrotuma inişine öncülük eden yapıdır, doğumdan bir süre sonra kapanır ve beraberinde (facia spermatica externa, fascia cremasterica ve musculus cremaster, fascia spermatica interna) karın ön duvarı tabakalarını da sürükler.

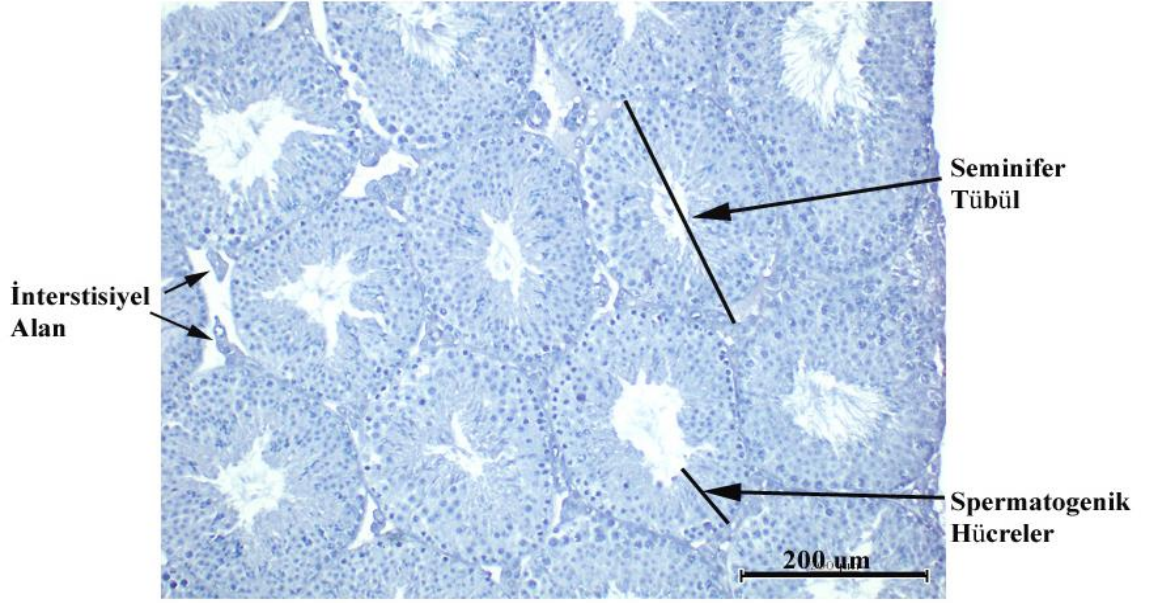
Testisin extremitas superior ve extremitas inferior denilen iki ucu, facies medialis ve facies lateralis olarak isimlendirilen iki yüzü, margo anterior ve margo posterior adı verilen iki kenarı vardır. Testisin arka kenarının dış kısmında epididymis 6 m uzunluğunda yumak şeklindeki bir kanal olan (ductus epididymis), epididymis'in medialinde ise funiculus spermaticus yer alır (58).

Testisin üst ucunda görülen apendix testis; kadınlarda tuba uterinanın abdominal ucuna karşılık gelen, küçük ve yassı anatomik oluşumdur. Testisin arka kenarının sadece dış kısmı periton ile ön kenarı, her iki yüzü ve iki ucu visseral periton ile örtülüdür (59).

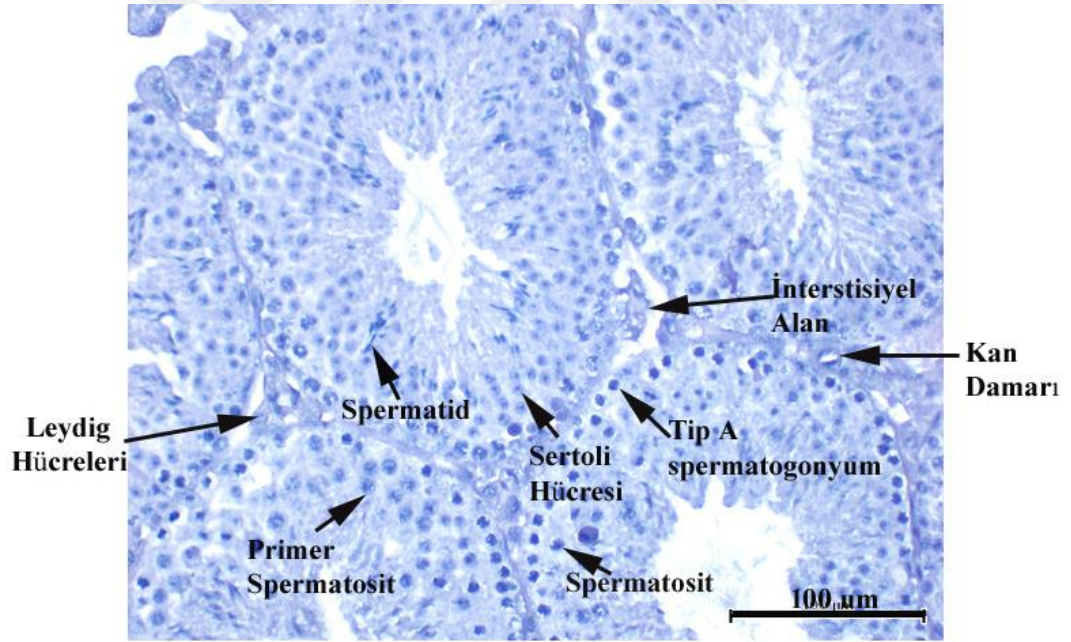
2.5. Testis Histolojisi

Testis en dıştan tunika albuginea ile (bağ doku yapısındaki kapsül) çevrili olup, kapsülden uzanan bağ dokusundaki septumlar, testisi lobüllere böler ve mediastenum testis olarak adlandırılır. Tunika albugineanın iç kısmı kan damarlarını içeren bölüm tunika vaskülozayı içerir. Bu sayede lobüllere bölünen testisin kan damarları ile beslenmesi sağlanır. Bölünen her bir lobül, birden fazla seminifer tübül içerir (60).

Testis morfolojik olarak iki ana bölümden oluşur, interstisyel doku ve seminifer tübüller olmak üzere. Seminifer epitel, ana bölmeyi oluşturur ve destekleyici Sertoli hücreleri arasında araya giren farklılaşan germ hücrelerini içerir (61). İnterstisyel doku toplam hacmin çok daha azını yaklaşık %3'ünü oluşturur ve esas olarak androjen salgılayan Leydig hücrelerini, vasküler yapılar, lenfatik ve bağ dokusu elemanları, makrofajlar ve fibroblastlardan oluşur (62). Aşağıdaki testis dokusuna ait preparatlar Mayer's hematoksilen ile boyanmış olup, kendi labımızda hazırlayıp yaptığımız testis dokusu preparatlarıdır.



Şekil 2.8. Fare testis dokusu histolojisi. Testis dokusunun büyük çoğunluğunu oluşturan seminifer tübül ve içerisinde yer alan spermatogenik hücreler ve interstisyel alan.



Şekil 2.9. Fare testis dokusundaki hücreler. Seminifer tübül içerisinde bulunan spermatogenik hücreler ve interstisyel alanda görülen Leydig hücresi, kan damarları ve bağ doku elemanları.

2.5.1. Seminifer Tübüller

Seminifer tübüller, testi hacminin büyük çoğunluğunu oluşturarak, tunika propriya tarafından çevrelenmiş bir seminifer epitelden meydana gelmektedirler.

Her bir seminifer tübül yaklaşık 50 cm uzunluğunda (30-50 cm arasında) ve 150-250 µm çapındadır. Seminifer epitel (germinal epitel) iki farklı temel hücre popülasyonunu içeren çok katlı bir epiteldir (60, 63).

Epiteli oluşturan hücreler:

-Sertoli Hücreleri

-Spermatogenik Hücreler

2.5.1.1. Sertoli Hücreleri

Sertoli hücreleri, destek hücreleri, hemşire hücreleri ya da sustentaküler hücreler olarak da bilinmekte olup, birincil işlevi temel büyüme faktörlerini sağlamak ve germinal hücrelerin gelişimi için uygun ortamı yaratmak olan hücreler olarak bilinmektedirler (64). Sertoli hücreleri, apikal ve lateral uzantılara sahip, spermatogenik hücreleri çevreleyen ve onların arasındaki boşlukları dolduran yaygın prizmatik hücrelerdir. Seminifer tübül içerisinde hem spermatogeneze katkıda bulunurken hem de spermatogenik seri hücrelere kan- testis bariyeri oluşturur. Sertoli hücreleri puberteden sonra çoğalmazlar.

Setoli hücrelerinin önemli görevleri sıralanacak olursa:

İnterstisyel hücrelerden salgılanan testosteronu bağlayabilmek ve spermatogeneze katkı sağlayabilmek için, Androjen-bağlayıcı proteini (ABP) salgılamak en bilinen görevleri arasındadır. Seminifer epitelden olgun spermatidlerin salınmasında spermiyogenez de rol alırlar. Embriyonik dönemde testis içerisinde hemen hemen ilk oluşan hücreler olarak Anti Mülllerian Hormon'u (AMH) salgılayarak, embriyonun dişi genital kanallarının gelişmesine engel olurlar. Spermatogenik seriyi sahip oldukları hücre iskeleti ve hücrenin alt yan yüzlerinde

(bazolateral) engelleyici sıkı bağlantılarla (zonula okludens) birbirlerine tutunarak kan-testis bariyerini oluştururlar, spermatogenik seriye ait hücreleri besler, korur. Germ hücrelerini besler ve germ hücresi hareketini salgıladığı ürünlerle sağlar. Lizozomlar tarafından spermiyogenezin son evresinde artık cisimcikler olarak adlandırılan fazla hücre kısımlarının fagositoz ile sindirilmesini sağlarlar. Aktivini ve inhibini, FSH salınımı üzerine olumlu bir etki göstererek salgırlar (65).

2.5.1.2. Spermatogenik Hücreler

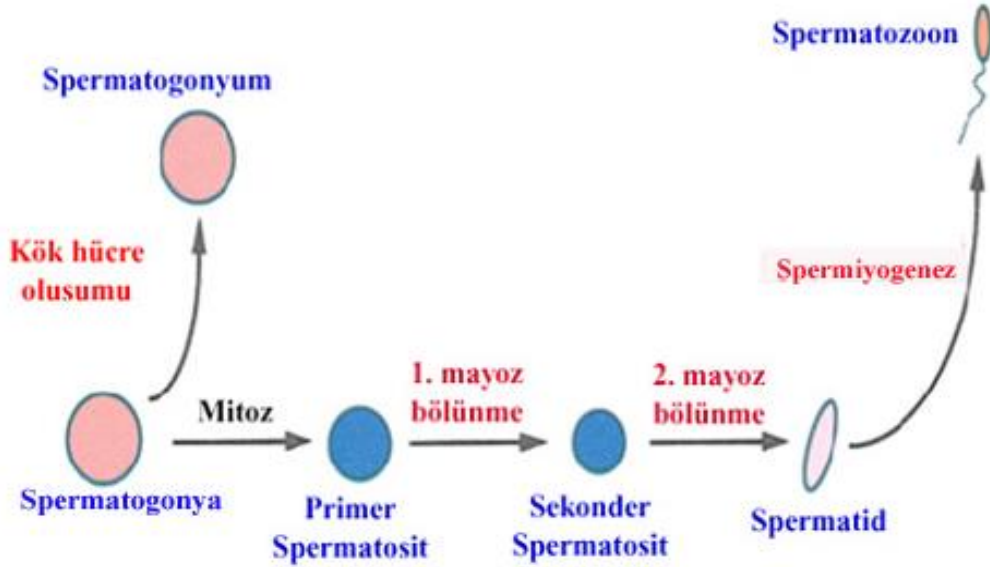
Spermatogenik hücreler, düzenli olarak çoğalan ve spermatidlere farklılaşan hücrelerdir. Bu hücreler, testisin erken gelişim evresinde gonadal yolk kesesinden göç ederek, gonadal kabartılarda kolonize olan primordiyal germ hücrelerinden gelişirler. Spermatogenik hücreler Sertoli hücrelerinin arasında ilerleyici gelişim sergileyen, tabakalar halinde düzenlenmişlerdir. Spermatogonyum olarak adlandırılan immatür (olgunlaşmamış) spermatogenik hücreler bazal laminanın üzerinde uzanırlar. Matür (olgun) hücreler olarak adlandırılan spermatidler, Sertoli hücrelerinin apikal bölümüne tutunmuşlardır ve tübül lümeninin sınırını oluştururlar.

Tunika (lamina) propriya tipik fibroblastlardan yoksun çok tabakalı bağ dokusu yapısında olup peritübüler doku olarak da adlandırılmaktadır. Tunika propriya insanda seminifer tübülün bazal laminasının dışında 3-5 tabaka miyoid hücreden (peritübüler kontraktıl hücreler) ve kollajen fibrillerden oluşmaktadır. Miyoid hücreler ultrastrüktürel düzeyde bazal lamina ve bol miktarda aktin filamentleri içermeleriyle düz kas hücreleriyle ilişkili özellikler gösterirler. Bu hücreler, tipik fibroblastların yokluğunda kollajen sentezleme rollerinin işareti olarak belirgin miktarda granüllü endoplazmik retikulum içermektedirler. Miyoid hücrelerin ritmik kasılmaları spermatozoanın ve testiküler sıvının seminifer tübülllerden boşaltılıp kanal sistemine akışına yardım eden peristaltik dalgalanmaları oluşturur. Miyoid tabakanın dışında kan damarları, yaygın lenf damarları ve Leydig hücreleri bulunmaktadır (60).

2.5.1.3. Spermatogenez

Memelilerde spermatogenez, üç ana hücrel farklılaşmanın ayırt edilebildiği süreçtir: spermatogonial yenilenme ve proliferasyon, mayoz ve spermiyogenez (61).

Spermatogonyal proliferasyon seminiferöz epitelyumun bazal kompartmanında gerçekleşir (66). Sırasıyla, tip A spermatogonya, spermatogonya ve tip B spermatogonyayı oluşturan kök hücrelerin mitotik proliferasyonundan oluşur (67). B tipi spermatogonia, spermatogenik hücre serilerine farklılık ve profaza girmeden önce nükleer DNA'nın replikasyonu ile primer spermatositleri oluşturmak üzere bölünür. İkinci faz olan mayoz, spermatositler, hücreler arası komşu Sertoli hücrelerinin sitoplazmik süreçleri arasında bir arada kalırken meydana gelir. Leptoten, zigoten, pakiten ve diploten aşamalarını içeren mayotik profaz, ikincil spermatositlerin oluşumu ile sonlanır. Haploit spermatidleri oluşturmak için ikinci spermatositler ikinci mayoz bölünmeye girer. Spermatogenezin son aşaması olan spermiyogenez, haploid germ hücresinin morfolojik farklılaşmasından oluşur ve seminifer tübülünün lümenine, geç spermatidlerin salınmasıyla sonuçlanır (61, 68, 69).



Şekil 2.10. Erkek Germ Hücrelerinin Farklılaşması. Çoğu spermatogonya, farklılaşmamış kök hücre havuzu oluşturmak için çoğalır. İki mayoz bölünme ve spermiyogenez içeren farklılaşma yolunda spermatozoon oluşur (70).

2.5.2. İnterstisiyel Doku

Seminifer túbüller arasında başta testosteron üreten Leydig hücreleri olmak üzere kollajen, lenf ve kan damarı, makrofajlar, mezenkimal hücreler, sinir lifleri, mast hücreleri ve fibroblastlardan oluşan gevşek bağ dokusu interstisiyel dokuyu oluşturur. Leydig hücreleri sentez ürünü testosteronu yakınındaki kan kapillerine boşaltarak endokrin sekresyon yaparlar. Bu olay erkek fetüs için gonad gelişimi, pubertede sekonder seks gelişimi, spermiyum üretimi, erişkin de ise spermatogenez ve sekonder seks gelişiminin devamlılığı için gereklidir (60, 63).

2.6. Leydig Hücresi

Leydig hücreleri testis içerisinde seminifer túbüller arasında interstisiyel dokuda yer alırlar. İnterstisiyel hücreler olarak da adları geçer. Genellikle üçgen şekilli, büyük, poligonal, eozinofilik ve çok sayıda düz endoplazmik retikulumun yanı sıra lipid damlacıkları içerirler. Testis hacminin yaklaşık %12'sini oluşturur. Oldukça fazla düz endoplazmik retikulum içerirler, bu steroid sentezi yapan leydig hücreleri için vazgeçilmezdir. Testosteron Leydig hücreleri tarafından sentez edilir. Vücutta bulunan testosteronun %95'i testislerde, Leydig hücreleri içinde kolesterolden sentezlenerek yapılır. Çok miktarda kapillerlere sahip olan stroma içerisinde Leydig hücreleri salgılarını vasküler sisteme kolaylıkla iletebilirler (62).

Tanımlanabilir Leydig hücreleri başlangıçta memelilerde embriyonik yaşam sırasında ortaya çıkar, muhtemelen mezonefrik mezenkimal hücrelerden kaynaklanır. Fetal tip Leydig hücreleri olarak sınıflandırılan bu hücreler, Wolf kanalı gelişimini uyarmak ve erkek cinsiyet belirlemesini desteklemek için gerekli olan androjenleri üretir. Yenidoğan yaşamında bu hücre popülasyonunun kaybolup kaybolmadığı, farklılaştığı veya işlevsel olarak bozulmadığı konusunda tartışmalar vardır. Yine de, bu hücreler fonksiyonel olarak sessiz hale gelirler çünkü yeni doğan testiste androjen üretimi önemli ölçüde azalır.

Daha sonra yetişkin tipi Leydig hücrelerinin bir popülasyonu ergenlik döneminde ortaya çıkar ve steroidogenik olarak aktif hale gelir. Bu yetişkin popülasyonun, peritübüler bir mezenkimal hücreden türetilmiş olduğuna inanılmaktadır (71).

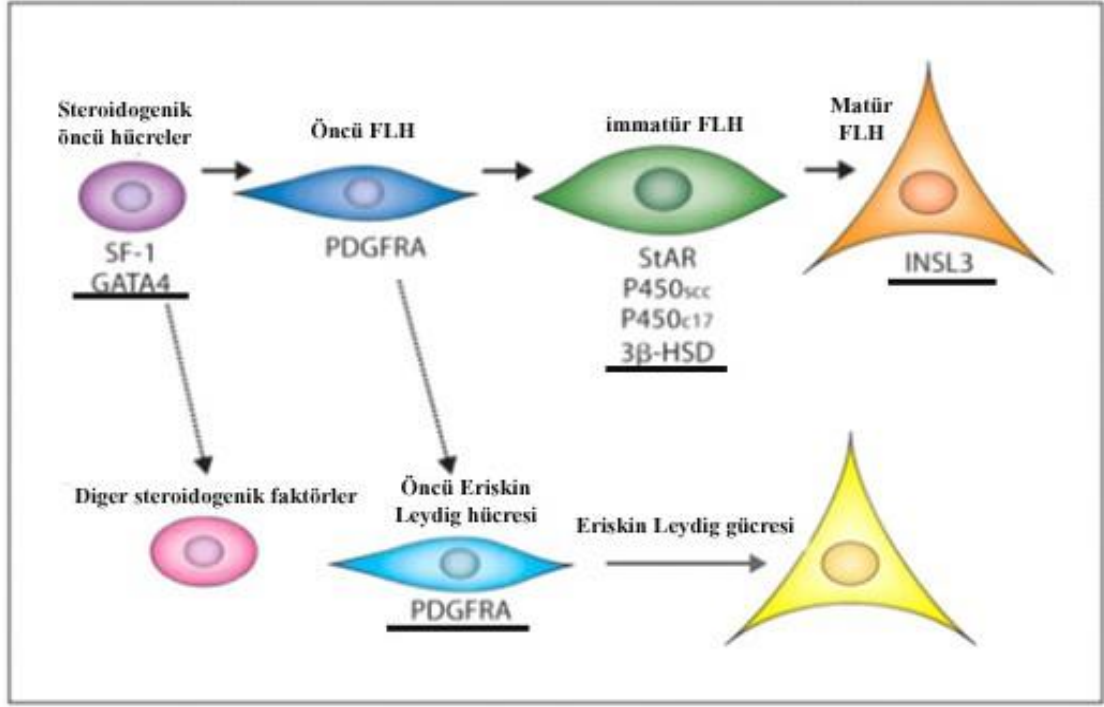
2.6.1. Fetal Leydig Hücreler

Leydig hücreleri, 1850 yılında Franz Leydig tarafından keşfedilmiş, 1900'lerde Whitehead tarafından fetal Leydig hücre (FLH) kavramı literatüre katılmıştır (72, 73). Doğum sonrası kaybolan fetal Leydig hücreler, erişkin Leydig hücreler gibi androjen üretiminden sorumlu olup, erkek genitalin farklılaşmasından sorumlu olsa da, hem fonksiyonel olarak hem de morfolojik olarak erişkin Leydig hücre popülasyonundan farklıdır (74). Oval şekle sahip FLH'ler düz endoplazmik retikuluma, tübülözüküler tip mitokondri ve çok sayıda az gelişmiş bir Golgi cisimciği ve daha küçük lipit damlacıklarına sahip olmalarıyla yetişkin Leydig hücrelerinden farklıdır (75).

Farede fetal Leydig hücre popülasyonu yaklaşık 12,5 dpc, insanda ise 8. haftadan itibaren testiküler farklılaşmadan hemen kısa bir süre sonra Sertoli hücre farklılaşmasından yaklaşık 24 saat sonra ortaya çıkmaktadırlar (76, 77). FLH'lerin progenitör havuzu halen bilinmezken, çok fazla spekülasyon vardır. FLH'lerin, komşu mezonefroz, adrenal-gonadal primordiyum ve çöломik epitelyumdan ortaya çıktığı iddia edilmektedir, bu da FLH progenitörlerinin gonadal gelişimin başlangıcında bipotensiyel gonad içinde mevcut olduğu veya olma olasılığını belirtmektedir. FLH kök hücreleri, bilinmeyen bir sinyalle, doğumdan sonra ortadan kaybolmadan önce fetüsün maskülinizasyonu için gerekli olan androjenleri sentezleme yeteneği kazanmaya başlar (78). Dahası, FLH'lerin adrenokortikal hücrelerin, erken adrenogonadal primordiyumundan ayrılan ortak bir kaynağı paylaştığı yönünde güçlü bir öneri vardır. Bu önerilen progenitör havuzlarından hiçbirinin doğrudan FLH'ye yol açtığı gösterilmemiştir. Bu nedenle, muhtemel FLH kaynaklarının daha eksiksiz bir fikrinin elde edilmesi için, bu varsayımsal kanıtları göz ardı etmemek yararlıdır (79).

Farede fetal Leydig hücre fonksiyonunun, normal sentez ve sekresyonu için LH'ye bağlı olduğu da kanıtlanmıştır (55).

Steroidogenik Faktör 1 (SF-1) ve P450 enzim ekspresyonları, DHH (Desert Hedgehog) ve onun reseptörü PTCH1 (Protein patched homolog 1) sinyalleme ile ekspresyonları artarak, Leydig hücresi farklılaşmasını tetiklediği gösterilmiştir (80).



Şekil 2.11. Fetal Leydig hücre gelişimi. FLH'ler, gonadlar ve adrenal bezlerindeki çoklu steroidogenik olaylara katkıda bulunabilen bir steroidojenik soy progenitör popülasyonundan türerler. Öncü FLH'ler FLH soyu ile sınırlıdır ve PDGFRA (Platelet Derived Growth Factor Receptor Alpha) ifadesi ile tanımlanır. Olgunlaşmamış FLH'ler, steroidogenik enzim ekspresyonunu içeren fonksiyonel işaretleyicilerin edinilmesi ile karakterize edilir. Olgun FLH'ler, INSL3'ün ve ayırt edici bir çokyüzlü şeklinin ifadesiyle karakterize edilir. 3β-HSD: 3β-hidroksisteroid dehidrojenazlar (79).

2.6.2. Erişkin Leydig Hücreler

Testis gelişimi sırasında, iki ayrı Leydig hücresi, fetal Leydig hücresi ve erişkin Leydig hücre popülasyonu şeklinde ortaya çıktığı, farede ilk olarak fetal Leydig hücre (FLH) popülasyonunun yaklaşık 12,5 dpc gününde, testiküler farklılaşmadan hemen sonra, yetişkin Leydig hücre popülasyonun ise doğumdan hemen sonra farklılaşmaya başladığı gözlemlenmiştir (81).

Leydig hücrelerinin fetal gelişimi, Sertoli hücrelerinin aksine gonadotropinlerin varlığına bağlı olarak gerçekleştiği ortaya konulmuştur (82).

Testiküler Leydig hücreleri testosteron üretir ve erkek virilizasyon ve spermatogenez için gerekli olan hormonal ortamı sağlar. Fetal Leydig hücreleri (FLH) Wolf kanalı ve erkek dış genital organların gelişimi için gereklidir. Steroidogenik faktör 1 (Sf1) hormon biyosentez genlerinin transkripsiyonel düzenleyicisidir ve böylece Leydig hücresinde merkezi bir rol oynar. Bir Sertoli hücre ürünü olan Dhh, bir parakrin sinyalleme mekanizması yoluyla primordiyal gonaddaki FLH soyunu belirttiği ve FLH'lerin postnatal dönemde, morfolojik olarak farklı yetişkin Leydig hücrelerine (ALH'ler) farklılaştığı gösterilmiştir (83).

ALH'ler erken dönem postnatal testisin interstisyel kompartmanında bulunan farklılaşmamış mezenkimal benzeri Leydig kök hücrelerinden (SLH'ler) gelişir. SLH'ların ayrıca erişkin testiste peritübüler ve perivasküler alanlarda buldukları gözlemlenmiştir. Bu durum yetişkin hücrelerin kaybı üzerine yeni Leydig hücrelerini rejenere edebileceğini de akıllara getirmiştir. Son çalışmalar, nestin, PDGF α , COUP-TFII, CD51 ve CD90 dahil olmak üzere bu hücreleri tanımlamak için birçok protein markerini tanımlanmış ve SLH'lerin çoğalmasının DHH (Desert Hedgehog), FGF2 ve aktivin ile uyarıldığı gösterilmiştir. SLH'lerin testosteron üreten Leydig hücrelerine farklılaşmasında, TGF β , PDGF β , FGF2, Notch ve Wnt sinyalleri ile negatif olarak etkilemesine rağmen, DHH ve aktivin ile pozitif olarak etkilediği bulunmuştur. Dahası DHH'un kendi başına, LH'a duyarlı steroidogenik hücrelere SLH farklılaşmasını indüklediği bulunmuştur, bu da DHH'nin, SLH'nin Leydig hücresi üzerindeki önemli olası etkilerinin olduğunu ve kritik bir rol oynadığını gösterir (84).

Yetişkin Leydig hücrelerinin oluşumu, progenitörlerin olgun hücreye dönüşümünü içeren sürekli bir süreçtir. Bu değişiklikler kademeli olarak gerçekleşmesine rağmen, Leydig hücresinde proliferasyon, farklılaşma ve steroidogenik fonksiyon çalışmaları, yetişkin Leydig hücre soyunun üç farklı gelişim evresinin tanınmasına yol açmıştır: Leydig hücre progenitörleri, olgunlaşmamış Leydig hücreleri ve yetişkin Leydig hücreleri. İlk aşamada, Leydig hücre progenitörlerinin, postnatal yaşamın üçüncü haftası boyunca testis interstisiyumundaki mezenkimal benzeri kök hücrelerin aktif proliferasyonundan kaynaklandığı ve 3 β -hidroksisteroid dehidrogenaz (3 β -HSD) için pozitifdirler. LH ve androjen, Leydig hücre progenitörlerinin olgunlaşmamış Leydig hücrelerine

farklılaşmasını uyarmak için birlikte hareket eder. Luteinize edici hormon (LH) reseptörlerinin varlığını gösterir. Aktif olarak çoğalırlar ve olgunlaşmamış Leydig hücrelerine farklılaşır. İkinci aşamada, olgunlaşmamış Leydig hücreleri morfolojik olarak Leydig hücreleri olarak tanınabilir. Bol düz endoplazmik retikulumları vardır ve steroidogenik olarak aktiftirler, fakat esas olarak testosteron yerine indirgenmiş androjenler üretirler. Olgunlaşmamış Leydig hücreleri sadece bir kez bölünür ve yetişkin Leydig hücre popülasyonu ortaya çıkar, üçüncü ve son aşamada, yetişkin Leydig hücreleri tamamen farklılaşmış olup, öncelikle testosteron üretir ve nadiren bölünür. Ön veriler, insülin benzeri büyüme faktörü-1'in (Insl-3), olgunlaşmamış Leydig hücrelerinin, yetişkin Leydig hücrelerine dönüşümünde etkili olduğunu göstermiştir (12).

Progenitör hücrelere, öncü hücre farklılaşmasının başlangıcı LH'den bağımsızdır; bununla birlikte, LH, hücre çoğalmasını, hipertrofini indüklemek ve steroidogenik fonksiyon için gerekli olan tam organel komplemanı oluşturmak için Leydig hücre soyunun sonraki aşamaları için gereklidir. Testosteron ve östrojen, öncü hücre farklılaşmasının başlangıcına engel olur ve olgun Leydig hücreleri tarafından üretilen bu hormonlar, sabit sayıda Leydig hücrelerini muhafaza etmek için yetişkin testiste Leydig hücrelerine öncül hücrelerin daha fazla farklılaşmasını inhibe etmek için önemli olduğu bilinmektedir. Progenitör hücreler oluştuğunda, progenitör hücrelerin olgun yetişkin Leydig hücrelerine farklılaşması için androjenler gereklidir. Önceki çalışmalar, Leydig hücrelerinin farklılaşması için FSH'ın gerekli olduğunu ileri sürse de, daha yeni çalışmalar bu süreçte FSH'ın gerekli olmadığını göstermiştir. Anti-Müllerian hormonu, Leydig hücre farklılaşmasında negatif bir düzenleyici olarak önerilmiştir ve bu kavramın geçerliliğini doğrulamak için daha fazla araştırılması gerekmektedir. Trombosit kaynaklı büyüme faktörü yetişkin Leydig hücrelerinin farklılaşması için önemli bir faktördür; bununla birlikte, katılımının ayrıntıları hala bilinmemektedir. Testiküler makrofajlar tarafından salgılanan bazı sitokinler, Leydig hücrelerine mitojeniktir (85).

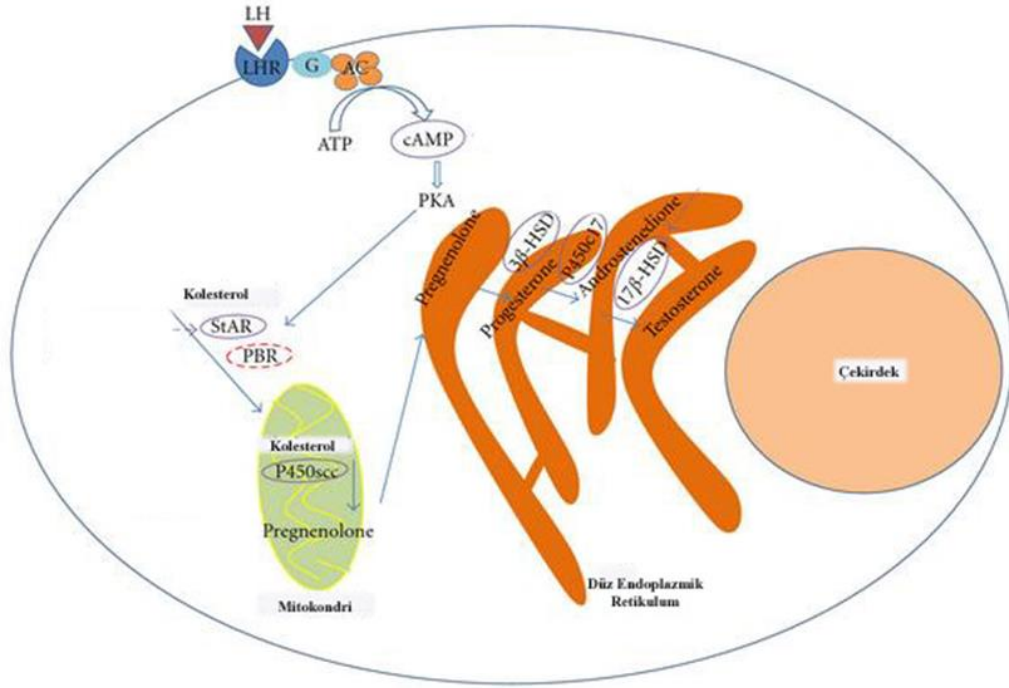
2.8. Steroidogenez

Steroidogenez steroid hormon sentezi demektir. Steroid hormonların, farklı fizyolojik etkilere sahip olan, yaşam için oldukça önemli etkilere sahip olup başta adrenal bezi ve gonadlar olmak üzere plasenta ve merkezi sinir sisteminde de sentezlendiği belirtilmiştir. Tüm steroid hormonlarının ortak bir özelliği, sentez kaynaklarının öncüsü kolesterolü kullanmalarıdır (92). Testosteron üretimi de diğer steroid hormonlar gibi kolesterolün 'de novo' (hiç yoktan) oluşumu ile gerçekleşir. Spermatogonyal, peritübüler miyoid ve Sertoli hücrelerinin de Leydig hücresi steroidogenezini üzerinde etki gösterdiği belirtilmiştir (93).

2.9. Steroidogenik Düzenleyici Protein (StAR)

StAR, 30 kDa'luk steroidogenik düzenleyici (akut, başlatıcı) proteindir. Steroidogenezde, kolesterolün iç mitokondriyal membrana taşınımı sürecinde etkili olan StAR'ın hormon stimülasyonuna yanıt olarak sitozolda sentezlendiği ve iç mitokondriyal membranda bulunan sitokrom P450 enzimi (P450_{scc}) ile kolesterolden pregnenolonu katalize ettiği belirtilmiştir (94). StAR'ın, aynı zamanda FLH'lerin fonksiyonel gelişiminin bir düzenleyicisi olmasıyla beraber FLH'lerinin erken bir belirteci olduğu belirtilmiştir (79).

Testosteron üretimi de diğer steroid hormonlar gibi kolesterolün 'de novo' (hiç yoktan) oluşumu ile gerçekleşir. Testis içerisinde interstisiyel alanda Leydig hücreleri tarafından salgılanan testosteron, seminifer tübül içerisinde Sertoli hücreleri tarafından salgılanan Androjen Bağlayıcı Protein (ABP) tarafından tutularak, tübül içerisindeki spermatogenez için gereklidir. Bu tez de Leydig hücrelerinde, ekspresyon seviyesini oldukça yüksek gördüğümüz SVIP proteinin StAR protein ile korelasyonuna bakarak steroidogenez ile ilişkili olduğunu belirlemeyi amaçladık.



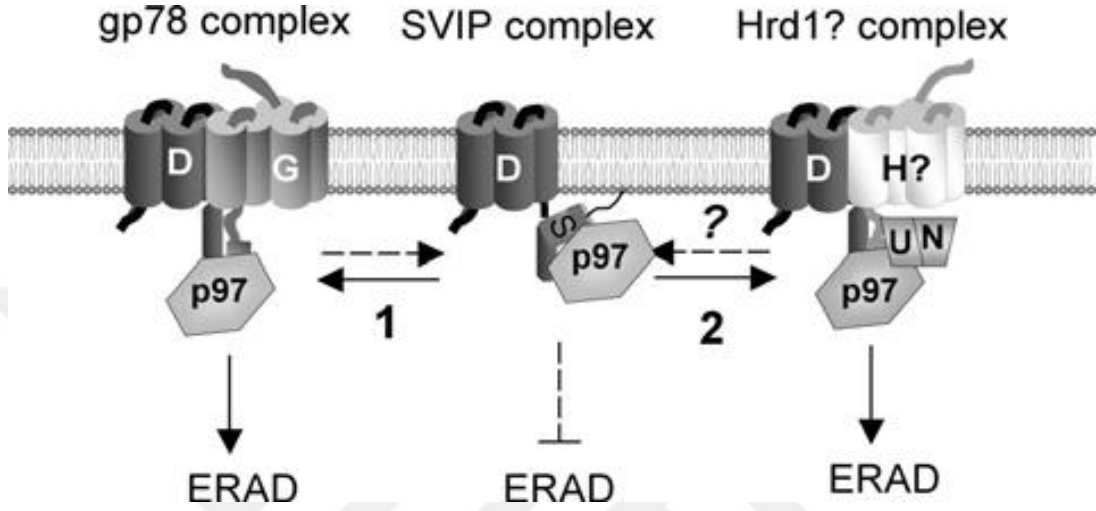
Şekil 2.14. Steroidogenezin şematik gösterimi. Leydig hücre içerisinde LH aracılığıyla 'de nova' hiç yoktan kandaki kolesterolün önce mitokondri içerisine StAR protein aracılığıyla alınması. Mitokondride bulunan sitokrom enzimleri ile (P450cc) işlenen kolesterolün Pregnenolona dönüşmesi ve sonrasında düz endoplazmik retikulumda HSD (hidroksi dehidrogenaz)'lar ile testosteron oluşumu gösterilmiştir (95).

2.10. Küçük VCP ile Etkileşen Protein (SVIP)

Küçük VCP ile etkileşen protein, SVIP (Small VCP-interacting protein) 76 aminoasitten oluşmuş 9-Kda'luk, p97/VCP'ye direk bağlanabilen bir adaptör Endoplazmik Retikulum (ER) proteindir (1). SVIP'i ilk olarak, VCP/p97 için yeni bir adaptör protein olarak (o zamanlar SVIP fonksiyonu henüz bilinmemekle birlikte) hücrelerde aşırı ekspresyonu, yoğun vakuollenme ve ER ve mikrotübüllerin deformasyonuna neden olduğunu gözlemleyerek SVIP'i M. Tagaya (Tokyo, Japonya) tanımladı (87).

Ökaryotik hücrelerde yeni oluşan proteinlerin %30'unu Endoplazmik retikulum (ER) içerir. ER içindeki kalite kontrol mekanizması, düzgün ve yanlış katlanmış proteinler arasında ayırım yapar ve yanlış katlanan proteinlerin ER ile ilişkili yıkılma (ERAD) yoluyla bozunduğu ve dahası ERAD'ın, ER'in normal proteinlerinin seviyelerini de düzenleyerek fizyolojik süreçler için de önemli olduğu belirtilmiştir (2). SVIP, ER membranının sitozolük yüzeyinde lokalizedir.

Ubikitinden bağımsız olarak yanlış katlanan proteinleri, proteozomal degrade eden ERAD yolağını, bu yolakta merkezi rol oynayan p97/VCP ile etkileşime girerek inhibe etmektedir (3, 4). Özellikle ERAD yolağı için SVIP proteini negatif düzenleyici olarak tanımlanmıştır (86).



Şekil 2.12. ERAD yolağında SVIP. SVIP, membrana bağlanır ve ERAD inhibisyonuna yol açar (88).

Dahası SVIP, gp78 ile rekabet eden iyi korunmuş bir VIM (p97/VCP-interacting motif) içeren gp78'den (ERAD ubiquitin ligaz olan), p97/VCP ve Derlin1'i (gp78 için bir substrat protein) ayırarak ERAD yolağını negatif olarak etkilediği belirtilmiştir. SVIP bir transmembran alanına sahip değildir ve ER membranına lokalizedir.

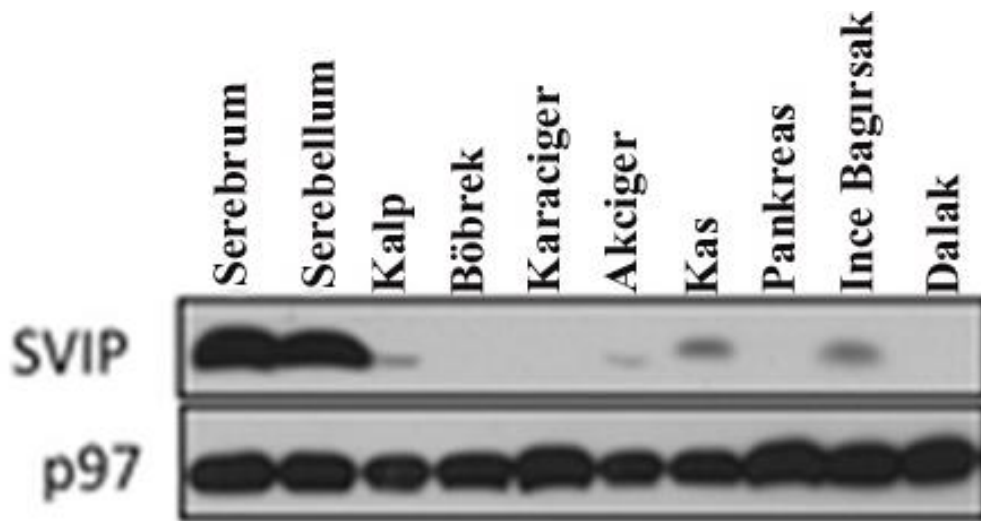
ERAD'daki rolüne ek olarak, SVIP'in aynı zamanda otofaji yolağının düzenleyici proteini olan LC3'nin lipidasyonunu artırdığı da belirlenmiştir (88, 89).

Aynı zamanda SVIP, VLDL (çok düşük yoğunluklu lipoprotein) partiküllerinin endoplazmik retikulumdan, Golgi'ye taşınması sırasında VTV'lerin (VLDL transport vezikülü) SVIP içerdiğini, SVIP'in apolipoprotein B100 (apoB100) ile birlikte lokalize olduğunu gösterilmiştir. Hepatositlerde SVIP proteinini siRNA tarafından SVIP'in susturulduğu veya spesifik antikorlarla SVIP proteinin bloke edildiğinde, VTV oluşumunda önemli bir azalmaya neden olduğu, VLDL

sekresyonunu azalttığını ve SVIP'nin hücre içi VLDL sekresyonunda fizyolojik bir rol oynadığı belirtilmiştir (90).

SVIP'in VCP ile birlikte sinir sisteminde ve nöronal hücre gövdelerinde birlikte lokalize olduğu da gösterilmiş ve SVIP'in VCP'nin olmadığı kompakt miyelinde, miyelin temel proteini (MBP) ile lokalize olduğunu da gözlemlenmiştir (91).

Son çalışmalarda ERAD bileşenlerinin ekspresyonlarının androjenler tarafından düzenlendiği belirtilmiştir. Androjenler testis için hem bir kaynak, hem de önemli bir hedef olmakla beraber androjenlerin, spermatogenezin kontrolünde hayati bir rol oynadığı belirtilmiştir (9). SVIP androjene duyarlı gen olarak bulunmuş, promotör veya düzenleyici bölgesinde, potansiyel androjen tepki elementlerinin (ARE' ler) var olduğu kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) kullanılarak doğrulanmıştır (5). Ve sonrasında, prostat kanser hücrelerinde SVIP'in ekspresyonunun androjenlerce baskılandığı gösterilerek bu proteinin prostat kanserindeki önemi vurgulanmıştır (2). En son olarak ise, prostat kanserine benzer bir mekanizma ile glioma (beyin tümörü) hastalarında, kanser dışı hastaların serum testosteron seviyelerinde anlamlı artış gözlemlenmiş ve androjenlerce SVIP protein ekspresyonunun baskılandığı ve glioma tedavisinde bu proteinin kullanılması gerektiği önerilmiştir (6).



Şekil 2.13. SVIP proteininin birçok fare dokusundaki Western Blot analizi. (7).

Fare testisinde ise 15G11 genlerinden oluşan bir ata genin, SVIP proteinin genleri ile gen duplikasyonu yoluyla bir ata genden olarak evrimleştiği ortaya çıkarılmıştır (8).

Androjen reseptörü (AR) olarak belirtilen SVIP'in erkek üreme ve gelişimi ile de yakından ilişkili olabileceği bu tez çalışmasında hipotez edilmiştir. Androjen reseptör geni (ARG) tarafından eksprese edilen androjen reseptörleri (AR) aracılığı ile androjenler etkilerini gösterirler (9). Söz konusu androjenler, gonadal steroid hormonu olan özellikle testosteron ve dihidrotestosteron olarak testiste Leydig hücreleri tarafından, aynı zamanda adrenal steroidlerin periferik dönüşümü ile oluşturulur. Başta erkek üreme sistemi fonksiyonel gelişimi olmak üzere ve diğer sistemler için (örneğin: prostat, folikülogenez ve meme bezi gelişimi) üretilir, dişi de ise eser miktarda üretilirler. Testosteron, üreme fonksiyonuna aracılık ettiği gibi davranış ve nöroendokrin fizyolojik cevaplar üzerinde de rol oynar. Dahası testosteron, östrojen gibi beynin cinsel farklılaşmasında kritik bir rol oynar (10). Çünkü AR, sadece erkek üreme sisteminin geliştirilmesi ve sürdürülmesinde değil, memeli dokularında birçok yerde bulunur ve bu nedenle androjenler, nöral dokuların gelişiminden, bağışıklık fonksiyonunun düzenlenmesine kadar çeşitli rollere sahiptir (11).

Fetal Leydig hücre gelişimi için gerekli olmasa da, erişkin Leydig hücre gelişimi için androjen ve LH gerekli olduğu bildirilmiştir (12, 13).

Fakat bugüne kadar androjene cevap veren protein olarak tanımlanmış SVIP'in androjen reseptörlerinin fazlaca ekspre edildiği bir erkek üreme organı olan fare testis dokusunda, SVIP proteinin hücreSEL lokalizasyonu ve olası fonksiyonu araştırılmamıştır.

Bizde bu bilgiler ışığında bu tez çalışmasında, androjen reseptörü olarak belirtilen SVIP proteinin öncelikle fare testis dokusunda gelişimsel olarak incelenmesi, testis dokusu gelişimsel sürecindeki rolünü saptamak amaçlanmıştır. Bir sonraki hedef olarak testosteronun esas olarak üretildiği Leydig hücrelerinde steroidogenezde anahtar bir protein olan StAR ile ilişkisini araştırmak amaçlanmıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Tezimin bu bölümünde yaptığımız çalışmalar kapsamında, deneyler boyunca kullanılan sarf malzemeler, deney aletleri ve ait oldukları kaynaklar ayrı başlıklar halinde aşağıdaki şekilde verilmiştir.

3.1. Kimyasallar ve Ait Oldukları Kaynaklar

Ksilol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Etanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Igepal CA-630 (NP-40)	Sigma-Aldrich, Steinheim
β -Merkaptoethanol	AppliChem, Darmstadt
Methanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Süttozu	Bio-Rad, München
Formaldehit	Merck, Darmstadt
Ponseu S	Roth, Karlsruhe
Potasyum klorit	Merck, Darmstadt
Sodyum klorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Sodyum dodesil sülfat	Merck, Darmstadt
Sodyum hidroksit	Merck, Darmstadt
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tween-20	Roth, Karlsruhe
Bromfenol blue	Sigma-Aldrich, Steinheim
Hidrojen peroksit	Sigma-Aldrich, Steinheim
Super block	Abcam
Entellan	Sigma-Aldrich, Steinheim
Parafin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Parafilm	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris	Merck, Darmstadt
Glisin	Merck, Darmstadt
EDTA	Merck, Darmstadt

Bovine serum albumin	Vector Laboratories
Rabbit serum	Vector Laboratories
Paraformaldehit	Sigma-Aldrich, Steinheim
ABC immuno kit	Abcam
Su bazlı kapatma medyumu	Thermo Fischer
Floresan kapatma medyumu	Abcam
Sitrik asit	Sigma-Aldrich, Steinheim
Proteinaz inhibitör kokteyl	Sigma-Aldrich, Steinheim

3.2. Antikorlar, Ait oldukları Kaynaklar ve Kullanım Oranları

Primer antikorlar	Firması	Dilüsyon oranı	Dilüsyon oranı
		(Western)	(İmmunositokimya)
StAR (ab58013)	Abcam	1:300	1:40
SVIP (HPA039807)	Sigma	1:500	1:50
SVIP (ab122590)	Abcam	1:500	1:50
Beta aktin (ab82229)	Abcam	1:1500	

Sekonder antikorlar

Goat anti rabbit HRP	Abcam	1:1500
Anti rabbit IgG FITC	Abcam, UK	1:300
Anti mouse IgG Texas Red	Abcam, UK	1:300
Goat anti mouse HRP	Abcam	1:1500

3.3. Deney Aletleri ve Markaları

Mikrodalga fırın	Arçelik, Türkiye
Mini santrifüj	Biosan, Türkiye
Orbital karıştırıcı	Sigma, Almanya
Vorteks	Thermo Scientific
Mikrotom	Leica, Almanya

Etüv	Nüve, EN500
Soğutmalı santrifüj	Hettich, Almanya
Çeker ocak	Hedlab, Türkiye
Klass II biyogüvenlik kabini	Scanlaf Mars Labogene
CO2 li inkübatör	Panosonic
Su banyosu	JSR
İnvert mikroskop ve kamera sistemi	Olympus
Buzdolabı	Arçelik
-80 ⁰ C derin dondurucu	Thermo Scientific
Binoküler çift başlı mikroskop	Nikon
Ph metre	Hanna
Hassas terazi	Ragwag
Manyetik karıştırıcı	Thermo Scientific
Western blot seti	İnvitrogen
Sonikatör	Bandelin, Almanya
Semidry blotlama cihazı	Scie-Plas
UVP görüntüleme cihazı	Kutay Lab Cihazları
Distile su arıtma cihazı	Alga
Mikropipet seti	Brand
Nemli ortam kapları	Hayat Medikal
Zeiss Axio İmager M2 floresan mikroskobu	Zeiss

3.4. Kromojenler

DAB (Diaminobenzidine)	Sigma, Germany
AEC	Invitrogen

3.5. Hücreler

Leydig TM3	ATCC, CRL-1714
Leydig Tümör MA-10	ATCC, CRL-3050

3.6. Hücre Kültürü Malzemeleri

DMEM/F-12, HEPES	Thermo Scientific
PBS	Gibco
Streptomycin/Penicillin	Gibco
Trypsin	Gibco

Fetal bovine serum	Gibco
12, 24, 6 wellik plateler	Orange Scientific
75 lik flaks	Orange Scientific
Pipetler	Orange Scientific
Cell skraper	Orange Scientific
Cover slip	Nest
Mikropipet seti	Brand
Lipofektamin transfeksiyon medyumu	İnvitrogen

3.7. siRNA, Aktivatör ve İnhibitörler

SVIPsi (AM16708/508716)	Ambion , Thermo Fischer
Kontrolsi (AM4611, kontrol1)	Ambion, Thermo Fischer

3.8. Etik Kurul, Deneklerin Temini ve Deney Grupları

3.8.1. Etik Kurul Onayı

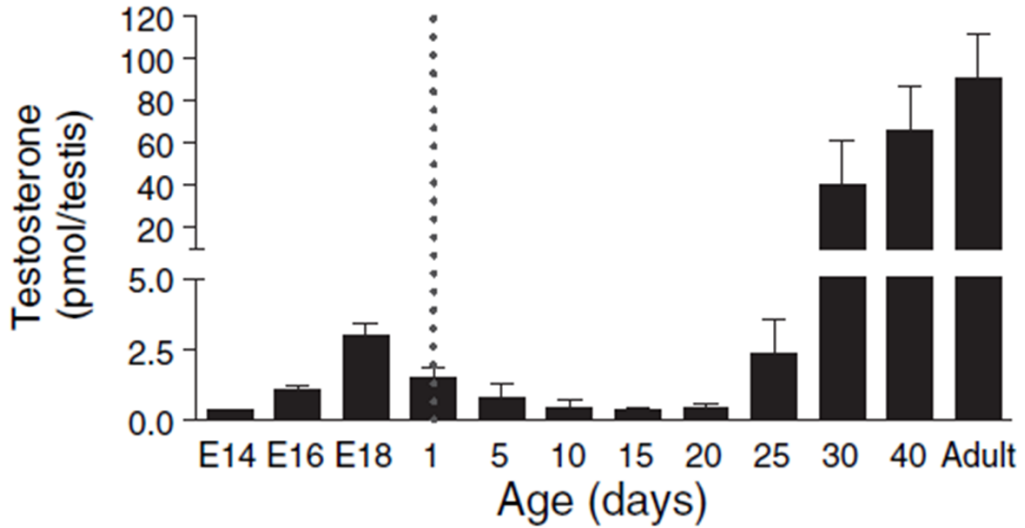
‘Küçük VCP ile etkileşen protein (SVIP)’nin fare testisinde ekspresyonunun ve fonksiyonunun belirlenmesi’ isimli çalışmanın Kobay Deney Hayvanları, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı’nın, 277sayılı protokol kararıyla, etik kurallara uygun bir çalışma olarak kabul edilmiştir.

3.8.2. Deneklerin Temini ve Özellikleri

Çalışmada kullanılan toplam 36 adet fare ortalama 1- 30 gram ağırlığında Balb-c cinsi erkek fare, Kobay Deney Hayvanları Laboratuvarı’ndan temin edilerek kullanılmıştır. Optimum laboratuvar koşulları altında, musluk suyu ile beraber %21 oranında protein içeren standart pelet yemlerle (purina) beslenmiş, oda sıcaklığında (12 saat aydınlık/12 saat karanlık döngüsünde) tutulmuştur. Yedi haftalık ve ağırlıkları 60-80 gr olan yetişkin erkek fareler rastgele olarak farklı kafeslere yerleştirildikten sonra çiftleştirme, bir kafeste 2 dişiye 1 erkek olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Ertesi gün vajinal plak oluşumu gözlenen dişi fareler gebeliğin

0.gününde kabul edilerek, doğum öncesi ve doğum sonrası takip edilerek elde edilen erkek yavru fare sayısı saptanmıştır. Elde edilen yavrular 1.grup erkek fareler (Fetal 18.gün, n=6), 2.grup erkek fareler (postnatal 1.gün, n=6), 3.grup erkek fareler (postnatal 5.gün, n=6), 4.grup erkek fareler (postnatal 15.gün, n=6), 5.grup erkek fareler (postnatal 35.gün, n=6), 6.grup erkek fareler (postnatal 50.gün, n=6) olarak sınıflandırılarak diseksiyon tarihleri belirlenmiştir. Deney süresince hayvan deney prosedürleri standart etik kurallara uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

Seçilen bu günlerin her biri fare testisindeki gelişimsel basamaklara denk gelmektedir.



Şekil 3.1. Testosteron üretimi ile korele olan çalışma gruplarımızın belirlenmesi.

Günler boyunca önemli olduğu görülen testosteron sentezinin oldukça arttığı prenatal 18. gün, neonatal 1. gün itibariyle sentezin azalması, 5. ve 15. günde en az seviyede olması ve 30. gün sonrası sentezin neredeyse üç katına çıkması. Tez içinde çalışma gruplarının oluşturulmasında önemli katkısı olmuştur (96).

3.8.3. Çalışma Grupları

Çalışmada hem deney hayvanları hem de eş zamanlı olarak iki ayrı hücre kültürü hücresi ile çalışılmıştır.

Çalışma grubu 1: deney hayvanları grubunu,

Çalışma grubu 2: ise hücre kültürü çalışmalarını ifade etmektedir.

Çalışma grubu 1 için; 6 ayrı grup oluşturulmuştur.

Oluşturulan gruplar sırasıyla aşağıdaki gibi adlandırılmıştır.

1.Grup (6 hayvan): 18-19 günlük fetal (doğmamış) erkek fare testisi

2.Grup (6 hayvan): Postnatal 1.gün erkek fare testisi

3.Grup (6 hayvan): Postnatal 5. gün erkek fare testisi

4.Grup (6 hayvan): Postnatal 15. gün erkek fare testisi

5.Grup (6 hayvan):Postnatal 35. gün erkek fare testisi

6.Grup (6 hayvan): Erişkin 50. gün erkek fare testisi

Çalışma grubu 2 için;

TM3(Leydig hücresi) ve MA-10(Leydig tümör hücresi) kullanılmıştır. Hücre kültürü yöntemleri ile kültüre edilen hücrelerin hücre medyumunu olarak, DMEM/F-12 HEPES, Thermo Fisher Scientific (Catalog number: 31330038) kullanılmıştır. TM3 hücresi için, hücre kültür mediyumuna ilaveten %10 FBS (Fetal Bovine Serum) ve Streptomisin eklenerek kullanılmıştır. MA-10 hücresi içinse, hücre kültürü mediumuna ilaveten %6 FBS (Fetal Bovine Serum), Streptomisin ve ek olarak %4 Horse Serum eklenerek kültüre edilmiştir.

3.9. Çalışmanın Değerlendirilmesinde Kullanılan Yöntemler

3.9.1. Dokuların Elde Edilmesi ve Hazırlanması

Prenatal ve postnatal günlerde fareler anestezi ile sakrifiye edildikten sonra testis dokularının (her hayvanda 2 tane) bir tanesi İmmünohistokimyasal çalışmalar için Bouin fiksatifine konulmuş olup, diğer bir eşi ise -80⁰C'de, Western blot

çalışmaları için saklanmıştır. Çalışmada yapılan İmmünohistokimya ve Western blot metodları 3.9.3.'de ve 3.9.4'de belirtilen ayrıntılı protokole göre gerçekleştirilmiştir.

Stereomikroskop altında diseke edilen erkek fetüslerden veya doğan erkek yavrulardan belirtilen günlerde alınan doku örnekleri Bouin fiksatifinde 24 saat oda ısısında bekletildikten sonra 2 saat su ile yıkandıktan sonra artan dereceli alkol serilerinden geçirilerek dokunun dahidratasyonu sağlanıp, içerisine alkol alımını sağlamak amacıyla, öncelikle 1 saat %75'lik alkole alınmıştır. Alkol yenilenerek tekrar 1 saat %75'lik alkole alınmıştır. Daha sonra %96'lık alkolde 1 saat bekletildikten sonra tekrar %96'lık alkol yenilenerek gece boyu bekletilmiştir. Bir sonraki gün %100'lük alkole alınarak 1 saat bekletilmiş ve yine alkol yenilenerek %100'lük alkolde 1 saat daha bekletilmiştir. Dokunun şefaflanması amacıyla dereceli artan alkol uygulaması sonrası dokular ksilene alınmıştır. Doku büyüklüğü ve hacmine bağlı olarak 30 dakikayı (5 ila 30 dakika arasında) geçmeyecek şekilde ksilende bekletilmiştir. Ksilene sonrası 3 saat parafinde tutulmuştur. Sonrasında metal gömme kapları ve kasetler yardımıyla doku sabitlenerek parafine gömülmüştür.

Parafine gömülmüş olan dokulardan 4 mikron kalınlığında kesitler alınıp, histokimya ve immünohistokimya öncesi kurutulup, preparatlar 1 gece boyunca etüvde 58°C'de bekletilerek parafinleri uzaklaştırılmıştır ve preparatlar boyanmaya hazır hale getirilmiştir.

3.9.2. Histokimyasal Değerlendirme

Prenatal ve postnatal testis dokuları histolojik değerlendirme için hematoksilin-eozin ile boyanmıştır. Bu boyama yönteminde öncelikle kesitler 2 şer kez 15 dakika ksilolden geçirilip, dereceli azalan alkol serilerinden geçirilerek doku içerisine boya öncesi su alması sağlanarak öncelikle 3 dakika %100'lük alkolde bekletilmiştir. Sonrasında 3 dakika %96'lık alkolde bekletilmiş ve son olarak 3 dakika %75'lik alkolde bekletilip, akarsuda yıkanmıştır (3-5 kere). 3 dk hematoksilende bekletilmiştir.

Hematoksilen boyasından sonra akarsuda yıkanmıştır (3-5 kere). Eozinde 1 dakika tutulmuş (sitoplazmayı pembe boyar). Preperatı kapatabilmek için dereceli artan alkol serilerinden geçirilip önce %75'lik alkole daldırıp çıkartılmış, sonra

%96'lık alkolde 2 dakika bekletilmiş ve son olarak %100'lük alkolde 2 dakika bekletilmiştir. Kapatma öncesi ksilen de bekletilmiş ve entellan kapatma solüsyonu kullanılarak, lamel ile kapatılmıştır.

3.9.3. İmmünohistokimya Tekniği

Fetal, postnatal ve erişkin fare testis dokularında SVIP ve Leydig hücre işaretleyicisi STAR proteinlerinin lokalizasyonlarının belirlenmesi ve gelişime bağlı olarak karşılaştırılması amacıyla; farelerden elde edilen testis dokuları, rutin histolojik takipler sonrasında poli lizin kaplı lamalar üzerine alınan 4 mikron kalınlığındaki parafin kesitler, bir gece 60⁰C'lik etüvde bekletilmiştir. Deparafinizasyon için iki kere 10'ar dakika ksilollerden geçirildikten sonra, her birinde beşer dakika olmak kaydıyla %100, %90, %70' lik alkol serilerinden geçirilerek rehidrate edilmiştir. Daha sonra, distile suda çalkalanarak, fosfat tamponunda (PBS; pH: 7,2-7,4) üç kere, beşer dakika yıkanmıştır. Antijenik maskenin giderilmesi amacıyla kesitler (antijen geri dönüşümü /retrieval) 0.1 M sitrat tamponu (pH:6) içerisinde mikrodalga fırında 10 dakika muamele edildikten sonra 20 dakika oda ısısında soğumaya bırakılmıştır.

Doku içerisindeki endojen peroksidaz aktivitesini engellemek için PBS ile 3 kez 5'er dakika yıkama işleminden sonra, dokular %3'lük hidrojen peroksit ile 20 dakika inkübe edilmiştir. Tekrar PBS ile 3 kez 5'er dakika yıkama işleminden sonra, oda ısısında 20 dakika Ultra V blok ile bloklanmıştır (protein bloklama). Bloklama aşamasından sonra, slâytlar belirli dilüsyon oranlarında 1 gece boyu primer antikor (SVIP 1:50, STAR 1:35 dilüsyon) ile muamele edilmiştir. PBS ile tekrarlanan yıkama aşamalarından sonra ticari kit sekonder antikorunu kullanılarak biyotinlenmiş sekonder uygulanmıştır. Biyotinlenmiş sekonder antikor uzaklaştırılarak 30 dk süreyle Avidin Biotin Complex (ABC) peroksidaz kiti uygulanmıştır. PBS ile yıkama aşamasından sonra DAB ile reaksiyon görünür hale getirilmiştir.

3.9.4. Western Blot Tekniği

Western blot analizi için, prenatal ve postnatal dönemlere ait -80°C 'de saklanan testis dokularının homojenizasyonu dokuların soğuk havanda ezilmesi ve sonra proteinaz inhibitörü içeren lizis solusyonu (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, %1 NP-40) ile lizis edilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Lizis solusyonu içinde ultrasonik homojenizatör (sonikatör) ile 30-60 saniye kadar lizis edilmesi sağlanarak homojenize edilen hücreler, 21'lik insulin iğneleri ile süspansiyon haline getirilip ve sonrada 10 dakika 4°C 'de $13,000 \times g$ 'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatant korunup, pellet kısmı atılarak korunan süpernatant ile Western blot çalışmaları sürdürölmüştür. Süpernatantlardaki protein konsantrasyonları Bradford testi ile tayin edilmiştir. Western blot için hazır gradient jel Novex 4-12% Bis-Tris Gel (NuPAGE, Invitrogen) kullanılmıştır. 30 μg protein olacak şekilde, süpernatant sample buffer (%20SDS, 625 mM Tris, %9 β merkaptoetanol, %0,3 bromphenol blue, %50 gliserol) ile dilüye edilerek, hücre ekstratları Laemli sample buffer ile 95°C 'de 5 dakika kaynatılıp ardından jele yüklenmiştir. Herbir güne ait örnekler jele yüklendikten sonra güç kaynağı 120V'a ayarlanarak proteinlerin jelde ayrıştırılması sağlanmıştır. Protein transferi yarı-kuru transfer sistemi olan semidry blotlama (VWR) cihazı kullanılarak jeldeki proteinlerin nitroselöloz membranlara aktarımını sağlamak amacıyla 1 saat 300 miliamper altında gerçekleştirilmiştir. Blotlama süresi bitiminde, membrana transferi yapılan proteinlerin, Ponceu boyası ile transfer edilme başarıları tesbit edildikten sonra, %5'lik süt tozu ile %0,1'lik Tween 20 içeren PBS özeltisi içinde (protein bloklama için) 1 saat oda ısısında inkübe edilmeleri sağlanmıştır. İmmünolojik tespiti belirlenen dilüsyon oranlarında hazırlanmış primer antikolar (her primer antikor için ayrı ayrı farklı dilüsyon oranları denenerek, örneğin SVIP 1:500 için, StAR 1:300) 1 saatlik bloklama sonunda membran primer antikolar (SVIP 1:500 ve STAR 1:300) ile gece boyu 4°C 'de inkübe edilmiş ve sonrasında membran 3 kez %0.1'lik Tween 20 içeren PBS özeltisi ile 5 dakika süre ile yıkanıp bu süre sonunda, sekonder antikor uygulaması yapılmıştır. HRP-konjuge-sekonder antikolar (anti-rabbit ve anti-mouse, 1:2000-1:3000 oranında) kullanılarak HRP Luminol/Enhancer ve Peroxide buffer (Abcam) sistemi ile UVP görüntüleme cihazı altında görüntülenmeleri sağlanmıştır. İkincil antikora bağlı bulunan horseradish peroksidaz enzimi, ECL özeltisi içinde bulunan Lumigen PS-3

substratını katalizler. Bu reaksiyon sonucu açığa çıkan luminol ışımaya yol açacağından, bu ışıma UVP cihazı ile gözlenmiştir.

Görüntüleme sonrası elde edilen bantların yoğunlukları Image J programında analiz edilerek prenatal ve postnatal günlere ait bantlar arasındaki farklılıklar değerlendirilmiştir.

3.9.5. Hücre Kültürü Yöntemi

Bu tez çalışmasında fare TM3 Leydig hücre hattı (ATCC numara: CRL-1714, hücre hattı) ve MA-10 fare Leydig hücreleri (ATCC number: CRL-3050) %10'luk fetal bovine serumu (FBS) içeren Dulbecco Modifiye Eagle Medyumu'nda (DMEM)/F12'de, 37°C'de kültüre edilmiştir. 75 cm²'lik flask içerisinde kültüre edilen hücreler %80-%90 konfluensiye ulaşıncaya, içindeki hücre kültürü medyumunu uzaklaştırılarak, iki kez PBS ile yıkanmıştır. Daha önceden oda ısısında bekletilmiş Tripsin-EDTA solüsyonundan 2-3 ml eklenerek, 3 dk 37°C'lik etüvde bekletilerek hücrelerin birbirinden ve flasktan ayrılması sağlanmıştır. Birbirinden ayrılan hücreler mikroskop altında gözlendikten sonra, hücre kültürü medyumunu eklenerek tripsinin aktivitesi durdurulmuştur. Elde edilen hücre süspansiyonu 15 ml'lik falkon tüp içerisine alınarak 10 dakika, 1400 RPM'de, 22°C'de santrifüj edilerek tripsin ortamdan uzaklaştırılmıştır. Santrifüj sonrası hücreleri içeren pelet kısmı kalacak şekilde, üst süpernatant kısmı atılmıştır. Kalan hücre peleti içerisine 1 ml hücre medyumunu eklenerek, pipetaj yapılarak hücrenin süspansiyon olması sağlanmıştır. Bu hücre süspansiyonundan 1 µl alınıp Thoma lamında sayılarak istenilen miktarda yeni hücre ekimi yapılmıştır. Hücre sayısı ve miktarı ekilecek well plate (6 wellik, 12 ve ya 24 wellik) ve flaks büyüklüğüne göre belirlenmiştir (Flask başına 4X 10⁶ hücre olacak şekilde ekilmiş olup, 6 wellik kültür kabına 1X10⁶ hücre olacak şekilde ekilmiş ve kültüre edilmiştir) (97, 98). Yeni flaks veya wellere ekim sonrası artı kalan hücre süspansiyonu, %5'lik dimetilsülfoksit (DMSO) içeren medyum içinde kriyotüpler içinde -80°C'de dondurulmuştur.

Hücre Western Blot analizi için, pasaj sonrası süspansiyon durumundaki hücreden, 12'lik well plate ya da 6'lık well plate kullanılarak, hücreler hücre kültürü medyumunu

içerisine pipetaj yapılarak ekilmiştir. %90 veya %100 konfluensiye ulaşan well plate'ler, soğuk PBS ile yıkandıktan sonra, lysis buffer 6'lık well plate için 100 µl (12'lik well plate için 50 µl) eklenerek skrap'er yardımıyla ortamdaki hücrelerin alınması sağlanmıştır. Alınan hücre örnekleri sonikatör yardımıyla parçalanıp, +4°C'de 13000 RPM'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Üst süpernatant kısmı alınıp pelet kısmı atılmıştır. Hücre örnekleri Western Blot yöntemi için hazırlanmıştır.

3.9.6. SiRNA Aracılığıyla İndükleme

Leydig hücrelerinde SVIP geninin ifadesi farklı konsantrasyonlarda (50, 100 ve 150 pmol) siRNA kullanılarak baskılanması sağlanmıştır. Transfeksiyondan bir gün önce, hücreler 6 vellik ve 24 vellik flakslara her velde 2×10^5 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Daha önceki çalışmalarımızda kullandığımız protokole uygun bir şekilde, SVIP için belirlenen siRNA (50, 100 pmol ve 150 pmol, Ambion) Lipofectamine (Invitrogen) transfeksiyon ajanı ile hücrelere verilmiştir. Transfeksiyon günü, hücrelerin mikroskop altında 70-80% konfluensiye ulaşmış kontrol edilmeden sonra siRNA'lar öncelikle serum içermeyen DMEM medyumunu ile dilüye edilmiş ve 5 dakika medyum içinde inkübe edilmiştir. Aynı şekilde, transfeksiyon ajanı (Lipofektamin) serumsuz DMEM medyumunu içinde dilüye edilerek 5 dakika kabin altında bekletilmiştir. Zaman sonunda, dilüye transfeksiyon ajanı ile dilüye siRNA'lar birleştirilerek 5 dakika daha birlikte inkübasyonları sağlanmıştır. Sonrasında weller'de hazır hücrelerin üzerine bu karışım yayılarak eklenmiş ve flakslar CO₂'li etüve yerleştirilmiştir. Transfeksiyon 30 saat sonra sonlandırılmıştır. Fakat transfeksiyondan 6 saat sonra, hücre üzerindeki medyum yenisi ile değiştirilip 24 saat sonra hücreler, soğuk PBS ile yıkandıktan sonra flakslardan kazınarak -80°C'de Western blot için saklanmıştır.

Flakslar üzerindeki hücreler üzerinde immünohistokimya ve immünofloresan yapılacak çalışmalar için PBS ile yıkama aşamasından sonra coverslipler üzerinde bulunan hücreler kazınmadan bırakılarak, immünohistokimyanın ilk basamağı olan fiksasyon aşamasına geçilmiştir. İmmünohistokimya ve immünofloresan çalışmaları için olan deneyler aşağıda daha detaylı bir şekilde anlatılmaktadır.

3.9.7. İmmünohistokimya ve İmmünohistofloresan Çalışmaları

İmmünohistokimyasal çalışmalar için, hücreler 12 kuyucuklu kültür kaplarında ve coverslipler (15x15mm, yuvarlak, Nest) üzerine kültür edilmiştir. Hücreler, PBS ile 3 kez yıkandıktan sonra, 15 dakika %4 formalin ile tespit edilmiştir. Fiksasyon sonrası 3 kez 5 dk süreyle PBS ile yıkandıktan sonra, istenmeyen antijenlerin bloklanması amacıyla 1 saat oda ısısında bloklama solüsyonu (%3 Bovine serum albumin, %10 rabbit serum) ile muamele edilmiştir. Bloklama sonrası hücreler yıkanmadan, primer antikorlar belirlenen dilüsyonlarda hazırlanıp, hücreler üzerine damlatılıp, gece boyu 4⁰C' de inkübe edilmiştir. Ertesi gün, inkübasyon sonrası 3 kez 5 dk süreyle PBS ile yıkanıp, 1 saat oda ısısında uygun sekonder antikorlarla muamele edilip, tekrar 3 kez 5 dk süreyle PBS ile yıkanmıştır. Işık mikroskopik gözlemler için son aşamada hücreler DAB kromojeni ile inkübe edilip ışık mikroskobu (Olympus BX43) altında görüntülenmiştir. Floresan mikroskopik incelemeler için ise, gece boyu primer antikorla muameleden sonra ertesi gün hücreler FITC veya Texas Red ile işaretlenmiş uygun sekonder antikorlar ile 1 saat oda ısısında inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonrası floresan kapatma medyumunu (fluoroshield mounting medium with DAPI, Abcam) ile kapatılarak Olympus BX53 floresan mikroskobu ve floresan mikroskobu kamerası ile (Zeiss Axio Imager M2) incelenip ve fotoğraflandırılmıştır.

3.9.8. Ko-lokalizasyon Çalışmaları

Hücre kültürü slaytlarına ekilen hücreler bölüm 3.3.7'de anlatılan immünohistofloresan çalışmalarındaki basamaklara uygun şekilde fiske edilip, bloklama basamağından sonra rabbit SVIP ile birlikte lokalize olacağı düşünülen ikinci bir proteine (mouse STAR) ait antikor birlikte bir ependorf içinde uygun dilüsyonlarda hazırlanıp gece boyu 4⁰C' de inkübe edilmiştir. Ertesi gün 3 kez 5' er dakika PBS ile yıkandıktan sonra sırasıyla birinci sekonder (texas red işaretli anti mouse sekonderi) ile 1 saat oda ısısında ve ardından ikinci sekonder antikor (FITC işaretli anti rabbit sekonderi) ile 1 saat oda ısısında inkübe edilmiştir. İnkübasyon aralarında ve inkübasyon sonrası 3 kez PBS ile yıkandıktan sonra floresan kapatma solüsyonu (Abcam) ile kapatılıp, Zeiss Axio Imager M2 floresan mikroskobu veya Olympus BX53 floresan mikroskobu altında görüntüleme yapılmıştır. Primer antikor sonrası

basamaklar karanlık ortamda gerçekleştirilmiş ve slaytlar 4⁰C’de karanlık kutu içinde saklanmıştır.

3.10. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analizler

3.10.1. Semiquantitative HSCORE Analizi

Farklı günlerdeki hayvanlara ait testis dokusundaki SVIP’e ait immünohistokimyasal değerlendirme HSCORE analizi ile gerçekleştirilmiştir. Her hayvandan 3 farklı kesit üzerinde değerlendirme yapılmıştır. Her bir kesit için ışık mikroskobu altında 40X büyütmede birbirinden habersiz iki araştırmacı tarafından rastgele beş alan seçilmiş 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 yapılmıştır. Hesaplama için HSCORE formülü kullanılmıştır [$\sum P_i(i+1)$: i boyanma yoğunluğu skorunu, P_i boyanan hücrelerin yüzdesini gösterir]. İki gözlemcinin hesapladığı skorların ortalaması alındı ve HSCORE değerleri grafikte gösterilmiştir.

İstatistiksel değerlendirmeler Sigma Plot versiyon 10 (Jandel Scientific Corp. San Rafael, CA) kullanılarak ve anlamlılık p < 0.05 olarak değerlendirilmiştir.

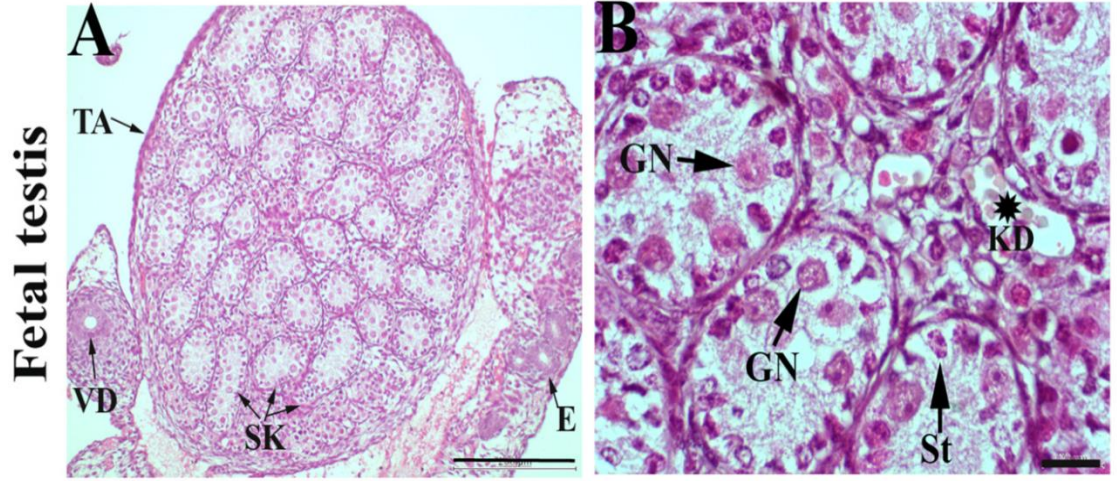
Hücre kültüründeki TM3 ve MA-10 Leydig hücrelerine ait floresan boyanmalardaki yoğunluk farkları Image J Analiz programı ile yapılmıştır. Western blot çalışmaları sonrası band yoğunlukları ve gruplar arası karşılaştırmalar Image J analiz programında okutulmuştur. Okutulan değerler arasındaki farklılıklar Sigma Plot versiyon 10 (Jandel Scientific Corp. San Rafael, CA) kullanılarak belirlenmiştir ve anlamlılık p < 0.05 olarak değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Fetal, Neonatal, Postnatal ve Ergin Fare Testis Dokularının Histolojik İncelemesi

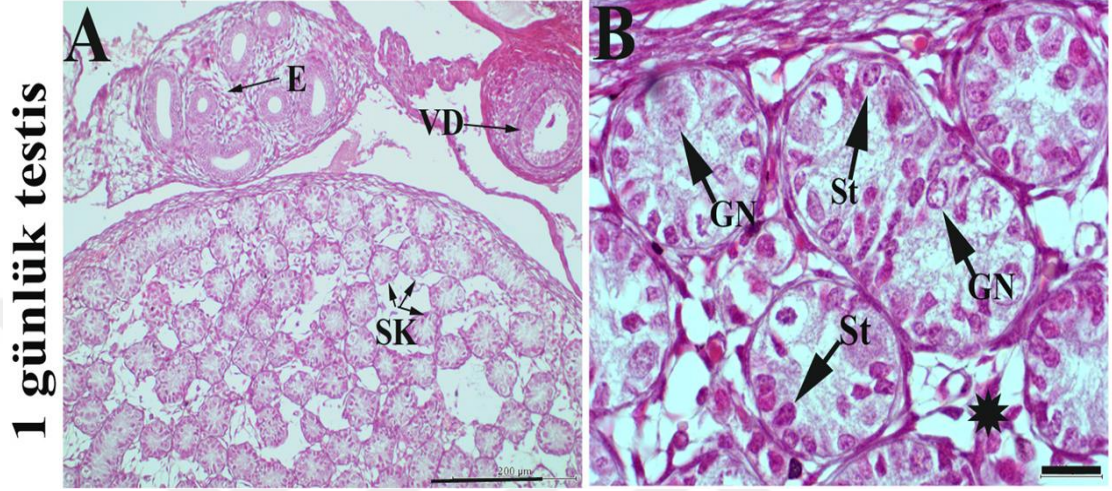
Fetal 18. gün, neonatal 1.gün ve postnatal 5., 15., 35. gün ve erişkin 50. günde fare testislerinin histolojik incelenmesi hematoxilen eozin ile boyanmaları sonucunda değerlendirilmiştir.

Fetal 18. günde belirgin seminifer kordonları içeren testis dokusu ve testis etrafında Duktus epididimis, Vasdeferens izlenmektedir (Şekil 4.1.A). Testis seminifer kordonlarının içinde düzensiz yerleşimli gonositler gözlenmektedir. Gonositlerin çoğu tübül lümeninde dağınık halde yerleşim gösterdiği belirlenmiştir. Gonositleri çevreleyen Sertoli hücrelerinin oval şekilli nükleusları bulunmaktadır. Sertoli hücrelerinin bazal membrana oturdukları gözlenmektedir. Seminifer kordonların aralarındaki intertisyel alanlar belirgindir. Bu alanlarda kan damarları ve asidofilik sitoplazmalı, yuvarlak nükleuslu hücreler yer almaktadır (Şekil 4.1.B).



Şekil 4.1. Fare 18 günlük fetal testisinin histolojik özelliklerinin hüresel düzeyde Hematoxilen Eozin boyaması ile gösterilmesi (A-B).A'da bar: 200 µm, B'de bar: 20 µm Tunika albuginea (TA) ile çevrelenmiş testis içerisinde seminifer kordonlar (SK) ve testis çevresinde vas deferens (VD), epididimis (E) gözlenmektedir (A). Seminifer kordonların içinde bazale yerleşmiş oval nükleuslu Sertoli hücreleri (St) ve dağınık yerleşimli yuvarlak nükleuslu Gonositler (GN) izlenmektedir. Seminifer kordonlar arasında kan damarları (yıldız, KD) ve yuvarlak çekirdekli eozinofilik hücreler belirgindir.

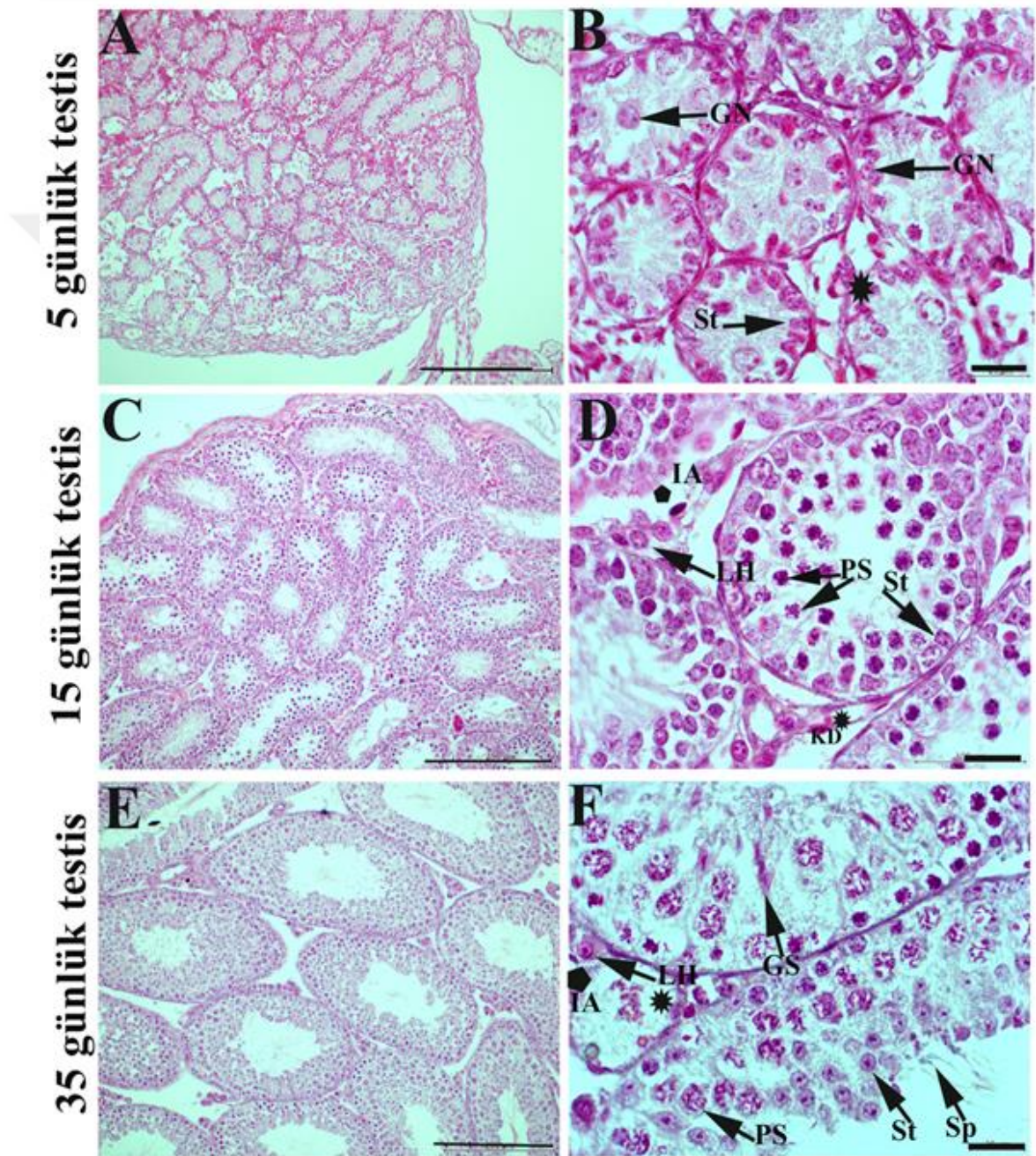
Neonatal 1. gün fare testisinde, testis içerisinde seminifer kordonların sayıca arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.2.A). Testis seminifer kordonları incelendiğinde, gonositlerin tübül lümeninden bazale doğru çekilmeye başladığı ve Sertoli hücrelerinin yanlarına yerleştikleri gözlenmektedir. Halen tübül lümeninde Gonosit izlenmektedir. Seminifer kordonlar arasındaki intertisyel alanlar belirgindir.



Şekil 4.2. Fare neonatal 1 günlük testisinin histolojik özelliklerinin hücresel düzeyde Hematoksilen Eozin boyaması ile gösterilmesi (A,B).A’de bar: 200 µm, B’de bar: 20 µm. Tunika albuginea (TA) ile çevrelenmiş testis içerisinde artmış sayıda seminifer kordonlar (SK) ile testis çevresi vas deferens (VD), epididimis (E) gözlenmektedir (A). Seminifer kordonların içinde bazale yerleşmiş oval nükleuslu Sertoli hücreleri (St) ve tübül lümeninden bazale doğru çekilmiş yuvarlak nükleuslu Gonositler (GN) izlenmektedir. Seminifer kordonlar arasında interstisiyel alan (yıldız, İA) ve yuvarlak çekirdekli eozinofilik hücreler gözlenmektedir.

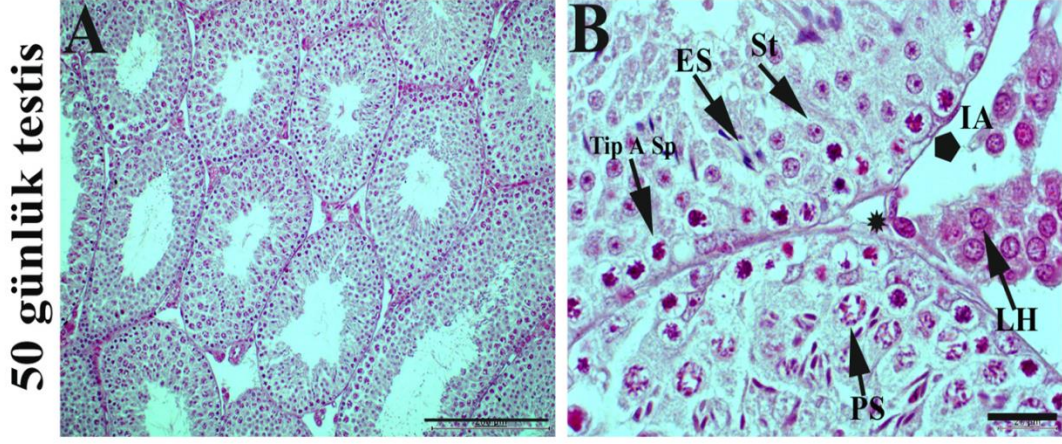
Postnatal 15. günde, spermatogonyumlara farklanmak üzere bazı gonositlerin bazale göçleri devam etmektedir. Fakat hala tübül lümeninde gonosit izlenmektedir. Bazaldeki gonositlerin yanlarında oval nükleuslu Sertoli hücreleri gözlenmektedir (Şekil 4.3.A-B). **Postnatal 15. günde** fare testisinde ilk spermatogenik dalganın başladığı bilinmektedir. Seminifer tübüllerde olgunlaşmasına devam eden Sertoli hücrelerinin yanında spermatogonyumlar izlenmektedir. Spermatogonyumların üstündeki sırada lümeneye yakın mayoz bölünme aşamasında spermatositler de izlenmektedir (Şekil 4.3C-D). Bu postnatal günden sonraki günlerde puberte başlamaktadır. Dolayısıyla seminifer tübül lümenine doğru yuvarlak spermatidler ve uzamış spermatidler **postnatal 35. günde** belirgin bir şekilde göze çarpmaktadır. Bu postnatal günde bazalde tip A ve B spermatogonyumlar ve Sertoli hücreleri de izlenmektedir. Şekil 4.3.E-F).

Posnatal 50. günde, erişkin testisinde spermatogenez serisine ait tüm hücreler (spermatogonya, spermatozoid, yuvarlak ve uzamış spermatid) tübül duvarında izlenirken Sertoli hücreleri bu seriyeye destek hücreler olarak spermatogenez hücreleri arasında görülmüştür. Geniş intertisyel alanlarda kan damarları ve Leydig hücre gruplarına rastlanılmıştır (Şekil 4.4).



Şekil 4.3. Fare postnatal 5, 15 ve 35 günlük testisinin histolojik özelliklerinin hücresel düzeyde Hematoksilen Eozin boyaması ile gösterilmesi (A, B, C, D, E, F) A-C-E’de bar 200 μ m, B-D-F’ de bar 20 μ m. A-B) 5 günlük testis, C-D) 15 günlük testis, E-F) 35 günlük testis morfolojisinden farklı olarak seminifer tübül içerisinde gonosit hücrelerinin

birinci mayoz bölünmelerini tamamlayarak, primer spermatosit (PS) halini aldıkları gözlenmiştir. Ek olarak, interstisyel alanda Leydig hücrelerin büyüdüğü ve hacimlerini artırdıkları görülmüştür. E-F) 35 günlük testis, 15 günlük testis morfolojisine ek olarak geç spermatid (GS) ve spermatosit gözlenmiştir.



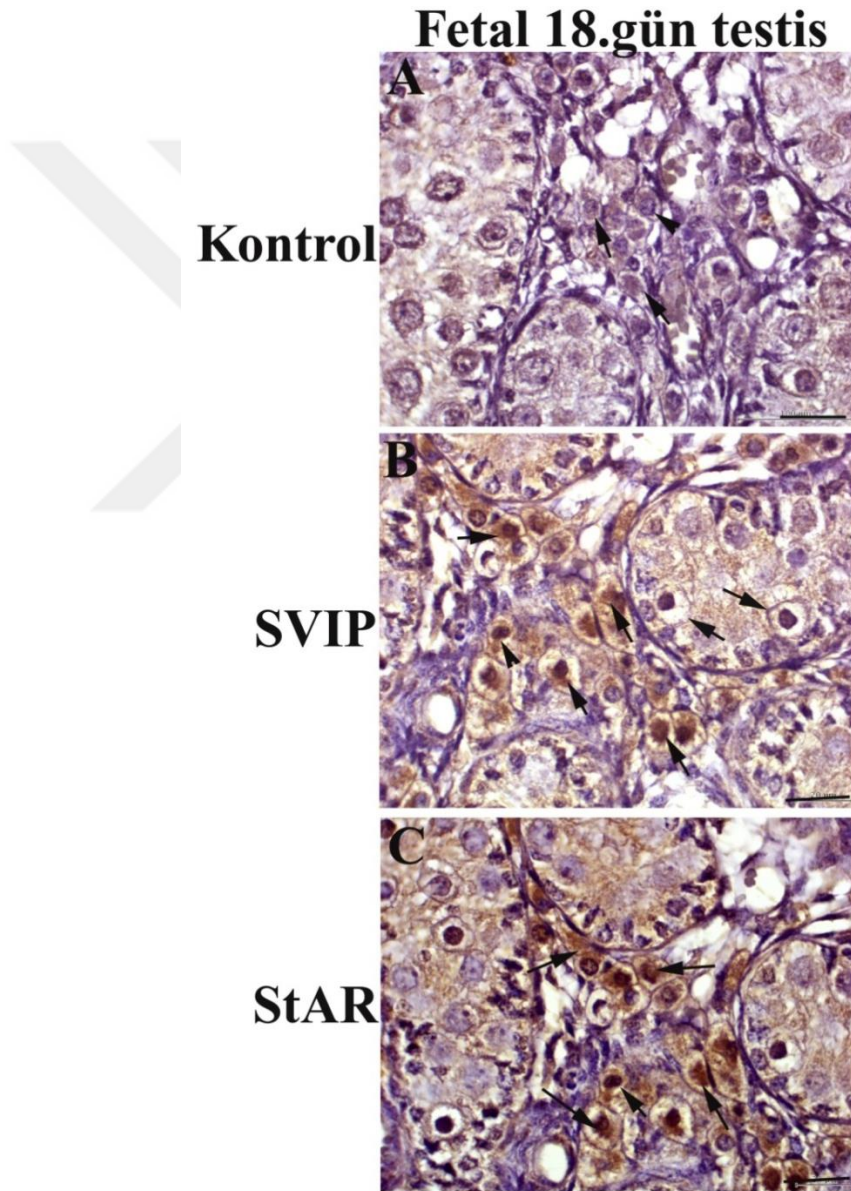
Şekil 4.4. Fare postnatal 50 günlük testisinin histolojik özelliklerinin hüresel düzeyde Hematoksilen Eozin boyaması ile gösterilmesi (A, B). A’de bar: 200 µm, B’de bar: 20 µm. A) 50 günlük testis B) 50 günlük testis 100X büyütmede 35. günde puberteye girdiği gözlenen testis morfolojisi ve seminifer tübül içerisindeki hücre serisi aynı şekilde gözlenmektedir.

4.2. Fetal, Neonatal, Postnatal ve Ergin Fare Testis Dokularında SVIP ve STAR Ekspresyonlarının İmmünohistokimyasal Değerlendirilmesi

Fetal, neonatal, postnatal ve ergin fare testislerinin genel histolojik özelliklerini inceledikten sonra, tezin esas amacı olan Küçük-VCP ile etkileşen proteinin aynı gelişmekte olan günlerdeki fare testislerinde ekspresyonlarını belirlemek oldu. Bunun yanında yapılan pilot çalışmalarda SVIP’in testisin interstisyel alanında ekspresyonlarının diğer testis bölgelerine göre daha yoğun ve baskın olduğu belirlendiği için, Leydig hücre işaretleyicisi olarak bilinen steroidogenik akut regülör protein (STAR)’in immunohistokimyasal ekspresyonu aynı seri kesitlerde değerlendirildi. Bu amaçla, belirlenen günlerde fare testis dokuları üzerinde her iki protein için de immunohistokimyasal incelemeler yapıldı. Bu incelemeler sonucu elde edilen immunohistokimyasal bulgular aşağıdaki gibidir.

4.2.1. Fetal 18. günde Fare Testis Dokusunda SVIP ve STAR Ekspresyonları

Fetal 18. günde testis kordonları içerisinde gonosit membranlarında ve bazı Sertoli hücrelerinde çok zayıf boyanma izlenirken, testis kordonları arasındaki intertisyel alanlardaki hücrelerde hem sitoplazmik hem de nüklear şiddetli boyanmalar gözlenmiştir (Şekil 4.5). Ayrıca STAR proteini intertisyel alanlarda hem sitoplazmik hem de nüklear ekspresyon göstermiştir.

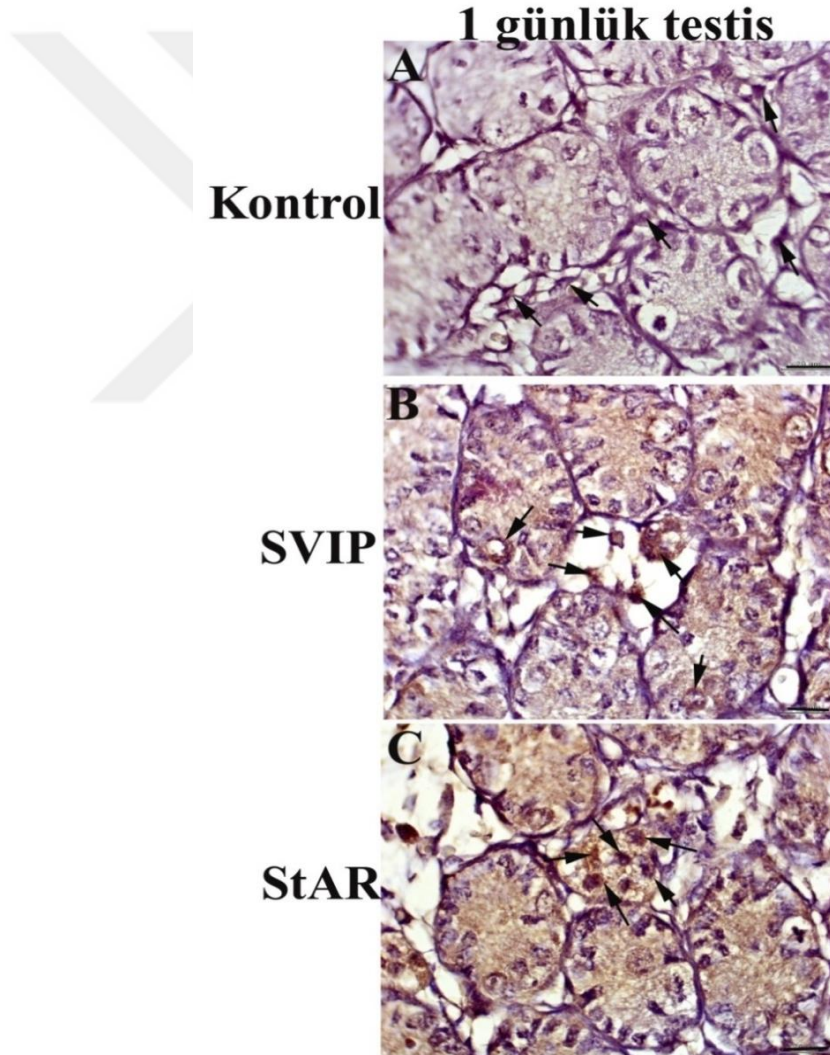


Şekil 4.5. 18 günlük fetal fare testis dokusunda SVIP ve StAR proteinlerinin ekspresyonları. (A-B-C). A: Negatif kontrol. B: İnterstisyel alanda görülen Leydig hücrelerinin SVIP protein ekspresyonları (oklar). SVIP ekspresyonu hem sitoplazmik hem de nüklear alanlarda gözlenmektedir. Az da olsa sürüntü şeklinde Seminifer kordonlar içinde gonosit membranlarında zayıf boyanmalar izlenmiştir. C: İnterstisyel alanda Leydig

hücrelerinde StAR protein ekspresyonları (ok) hem sitoplazmik hem de nükleer boyanma olarak gözlemlenmiş. Bar: A:20 µm, B:20 µm, C:20 µm.

4.2.2. Neonatal 1. günde Fare Testis Dokusunda SVIP ve STAR Ekspresyonları

Doğum sonrası 1. günde fare testislerinde SVIP ekspresyonu çoğunlukla ve şiddetli olarak interstisyel alanlardaki Leydig hücrelerinde gözlenmiştir (Şekil 4.6). Bazı tübüllerde, tübül içi alanlarda bazı gonositlerde de zayıf membranal SVIP ekspresyonlarına rastlanılmıştır. STAR ise hem sitoplazmik hem de nükleer olarak Leydig hücrelerinde baskın ekspresyon göstermektedir.

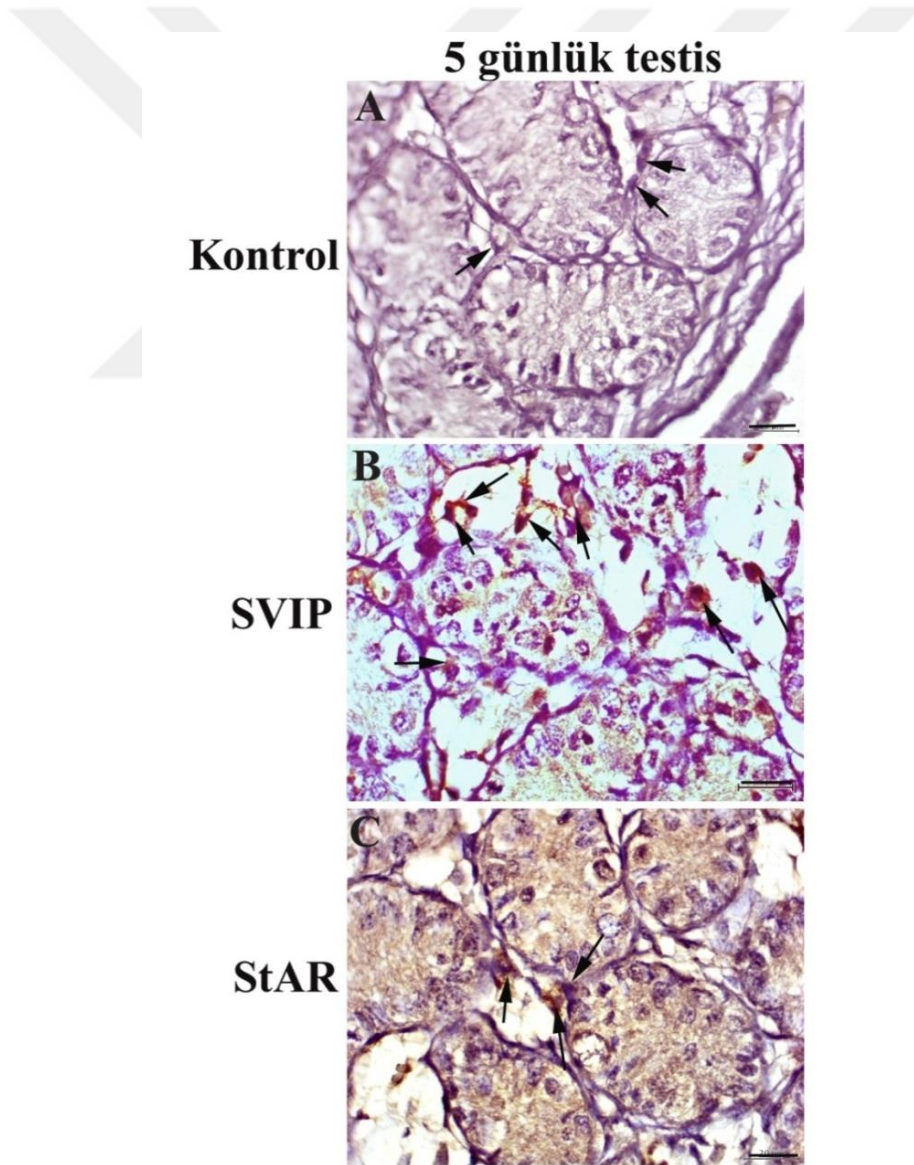


Şekil 4.6. Neonatal 1 günlük fare testis dokusunda SVIP ve StAR proteinlerinin ekspresyonları (A-B-C). A: Negatif kontrol. B: İnterstisyel alanda görülen Leydig hücrelerinin SVIP protein ekspresyonları ok ile gösterilmiştir. SVIP ekspresyonu çoğunlukla sitoplazmik gözlenmiş ve çekirdek boyanmaları ile beraber ok ile gösterilmiştir C: İnterstisyel alanda Leydig hücrelerinde StAR

protein ekspresyonları ok ile hem sitoplazmik hem de nükleer boyanma olarak izlenmektedir. A:20 μ m, B:20 μ m, C:20 μ m

4.2.3. Postnatal 5. günde Fare Testis Dokusunda SVIP ve STAR Ekspresyonları

Doğum sonrası 5. günde, fare testislerinde SVIP ekspresyonu çoğunlukla ve şiddetli olarak intertisyel alanlardaki Leydig hücrelerinde gözlenmiştir (Şekil 4.7). Bazı tübüllerde, tübül içi alanlarda zayıf SVIP ekspresyonlarına rastlanılmıştır. STAR ise hem sitoplazmik hem de nükleer olarak Leydig hücrelerinde baskın ekspresyon göstermektedir.

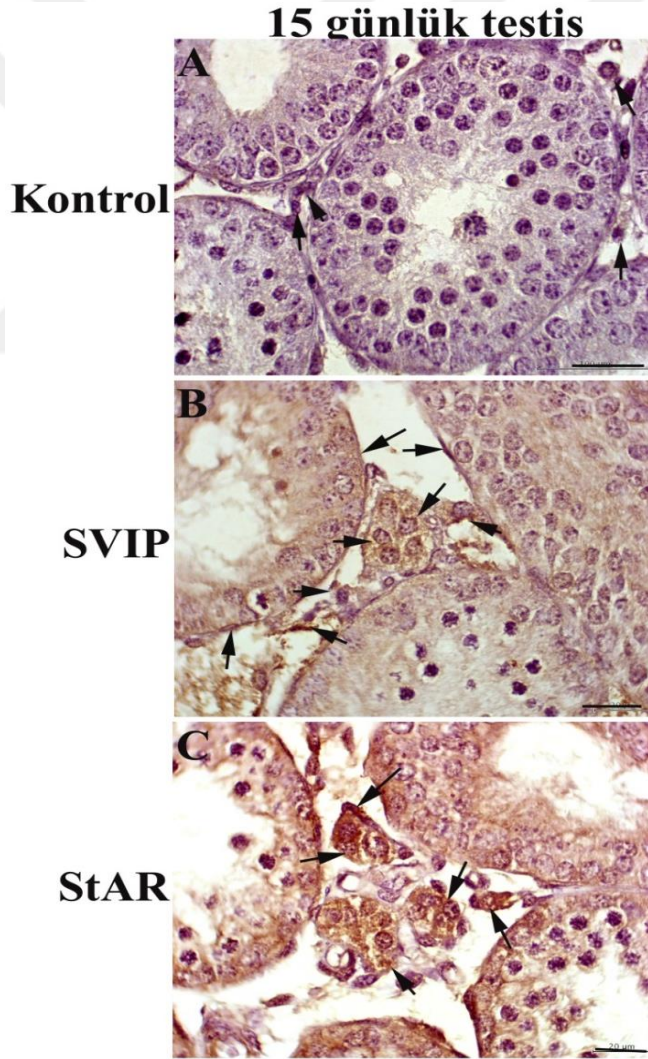


Şekil 4.7. Postnatal 5 günlük fare testis dokusunda SVIP ve StAR proteinlerinin ekspresyonları (A-B-C). A: Negatif kontrol B: İnterstisyel alanda görülen Leydig

hücrelerinin SVIP protein ekspresyonları ok ile gösterilmiştir. SVIP ekspresyonu çoğunlukla sitoplazmik gözlenmiş ve çekirdek boyanmaları ile beraber ok ile gösterilmiştir. C: İnterstisyel alanda Leydig hücrelerinde StAR protein ekspresyonları ok ile hem sitoplazmik hem de nükleer boyanma olarak gözlemlenmiş (OK). A:20 µm, B:20 µm, C:20 µm

4.2.4. Postnatal 15. günde Fare Testis Dokusunda SVIP ve STAR Ekspresyonları

Doğum sonrası 9-10. günden sonra seminifer kordonlar artık seminifer tübüller diye adlandırılmaktadır. Çünkü artık bu günlerden sonra spermatogonyumlar lümende bazale göç etmiş ve seminifer tübüllerde bir lümen ortaya çıkmıştır. Tip A spermatogonyumlarda mitoz bölünmelerle Tip A ve B spermatogonyumlar oluşmuştur. Sertoli hücreleri mitotik bölünmelerini tamamlamışlardır.



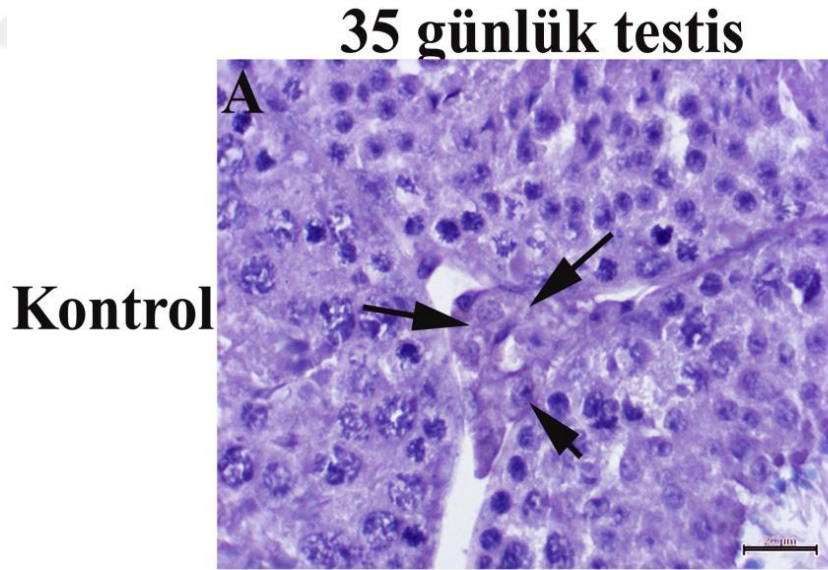
Şekil 4.8. Postnatal 15 günlük fare testis dokusunda SVIP ve StAR proteinlerinin ekspresyonları (A-B-C). A: Negatif kontrol. B: İnterstisyel alanda görülen Leydig hücrelerinin SVIP protein ekspresyonları ok ile gösterilmiştir. SVIP ekspresyonu çoğunlukla sitoplazmik gözlenmiş ve çekirdek boyanmaları ile beraber ok ile gösterilmiştir. Tübül çevresini döşeyen miyoid hücrelerde de

SVIP ekspresyonu izlenmektedir. C: İnterstitiyel alanda Leydig hücrelerinde StAR protein ekspresyonları (ok). A:20 µm, B:20 µm, C:20 µm

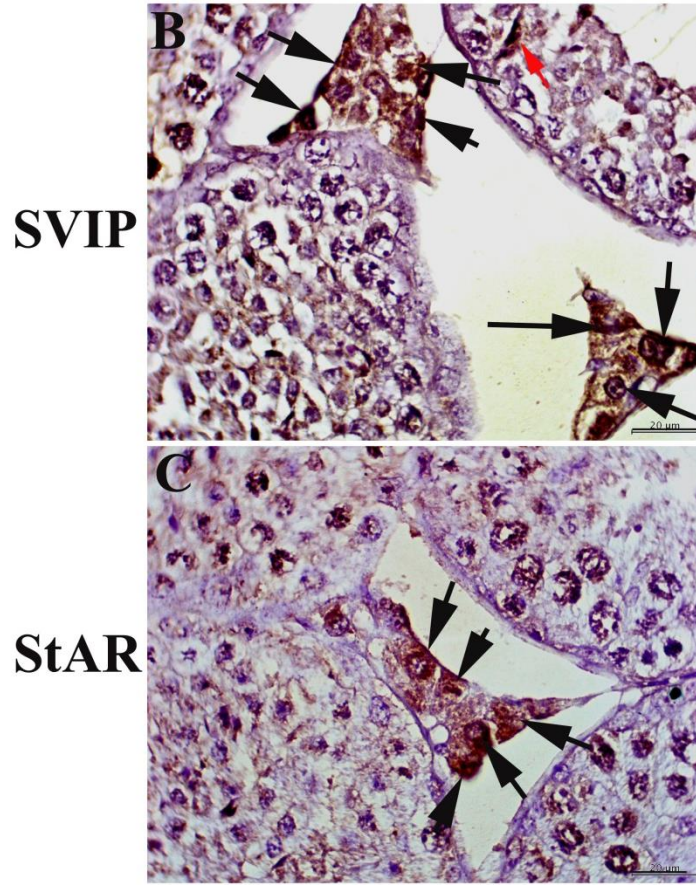
Doğum sonrası 15. günde ise, artık spermatogonyumlar yanında spermatoisitler de tübül duvarında gözlenmiştir ve ilk mayotik bölünme bu günde başlamıştır. SVIP immuno ekspresyonu tübül duvarında saptanmazken, tübülü döşeyen miyositlerde ve intertisyel alanlarda belirgindir (Şekil 4.8.B). İntertisyel alanlarda gözlenen SVIP ekspresyonuna paralel yapılan Leydig hücre markeri STAR immuno ekspresyonlarında belirgin bir şekilde bu gün de saptanmıştır (Şekil 4.8.C).

4.2.5. Postnatal 35. günde Fare Testis Dokusunda SVIP ve STAR Ekspresyonları

Doğum sonrası 35. günde, fare testislerinde SVIP ekspresyonu çoğunlukla ve şiddetli olarak intertisyel alanlardaki Leydig hücrelerinde gözlenmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Postnatal 35 günlük fare testis dokusunda SVIP ve StAR proteinlerinin ekspresyonları (A-B-C). A: Negatif kontrol.



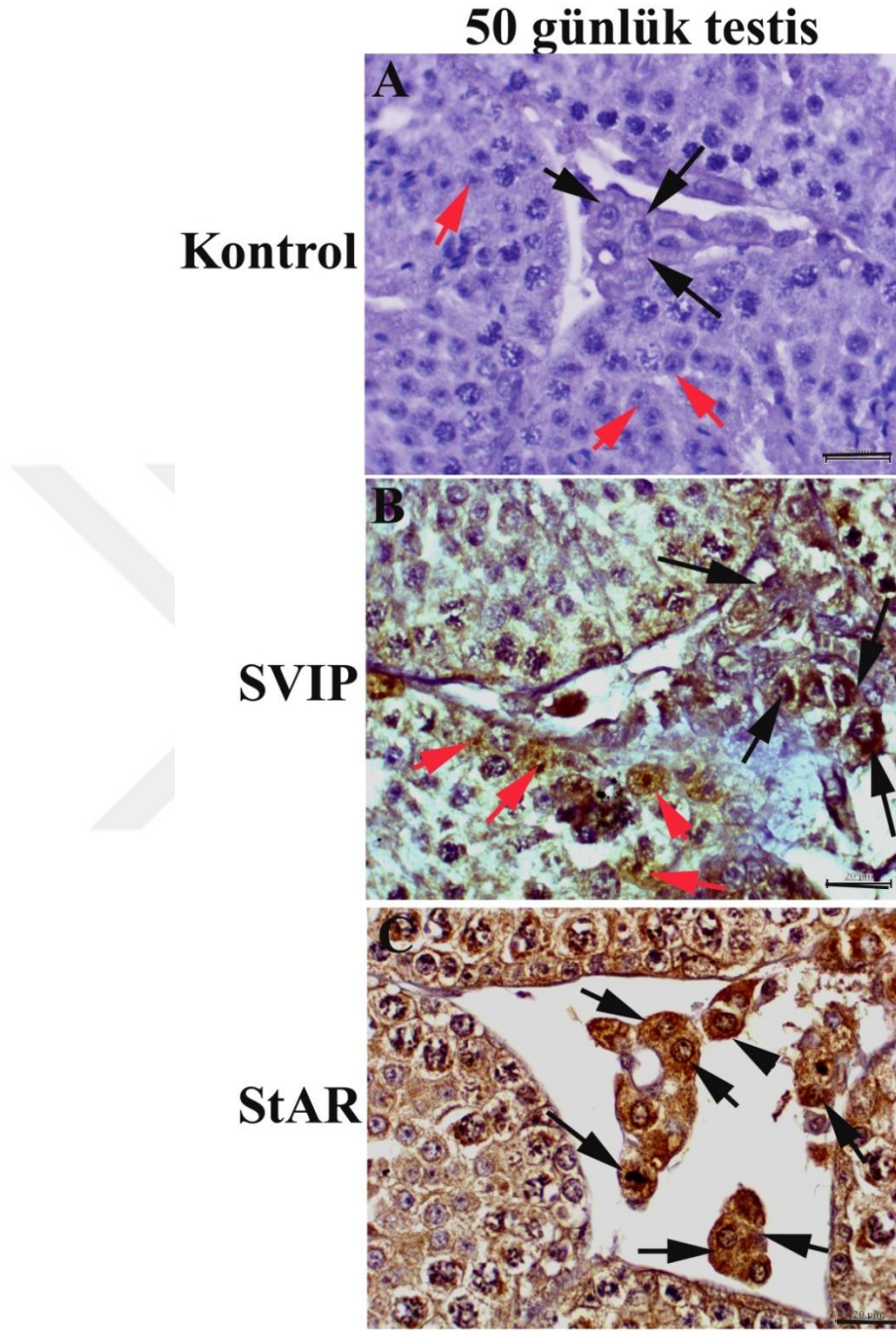
Şekil 4.9. (devam) Postnatal 35 günlük fare testis dokusunda SVIP ve StAR proteinlerinin ekspresyonları (A-B-C). A: Negatif kontrol. B: İnterstisiyel alanda görülen Leydig hücrelerinin SVIP protein ekspresyonları ok ile gösterilmiştir. SVIP ekspresyonu çoğunlukla sitoplazmik gözlenmiş ve çekirdek boyanmaları ile beraber ok ile gösterilmiştir. Kırmızı ok: Sertoli hücrelerinde görülen SVIP proteini ekspresyonu gösterilmiştir. C: İnterstisiyel alanda Leydig hücrelerinde StAR protein ekspresyonları (ok). A:20 μm, B:20 μm, C:20 μm

35. gün fare testis dokularında Sertoli hücrelerinde de ekspresyonlarının olduğu gözlemlenmiştir. STAR ise hem sitoplazmik hem de nüklear olarak Leydig hücrelerinde baskın ekspresyon göstermektedir.

4.2.6. Postnatal 50. günde Fare Testis Dokusunda SVIP ve STAR Ekspresyonları

Doğum sonrası 50. günde, fare testislerinde SVIP ekspresyonu çoğunlukla ve şiddetli olarak interstisyel alanlardaki Leydig hücrelerinde gözlenmiştir (Şekil 4.10). Bazı tübüllerde, tübül içi alanlarda zayıf SVIP ve StAR ekspresyonlarına

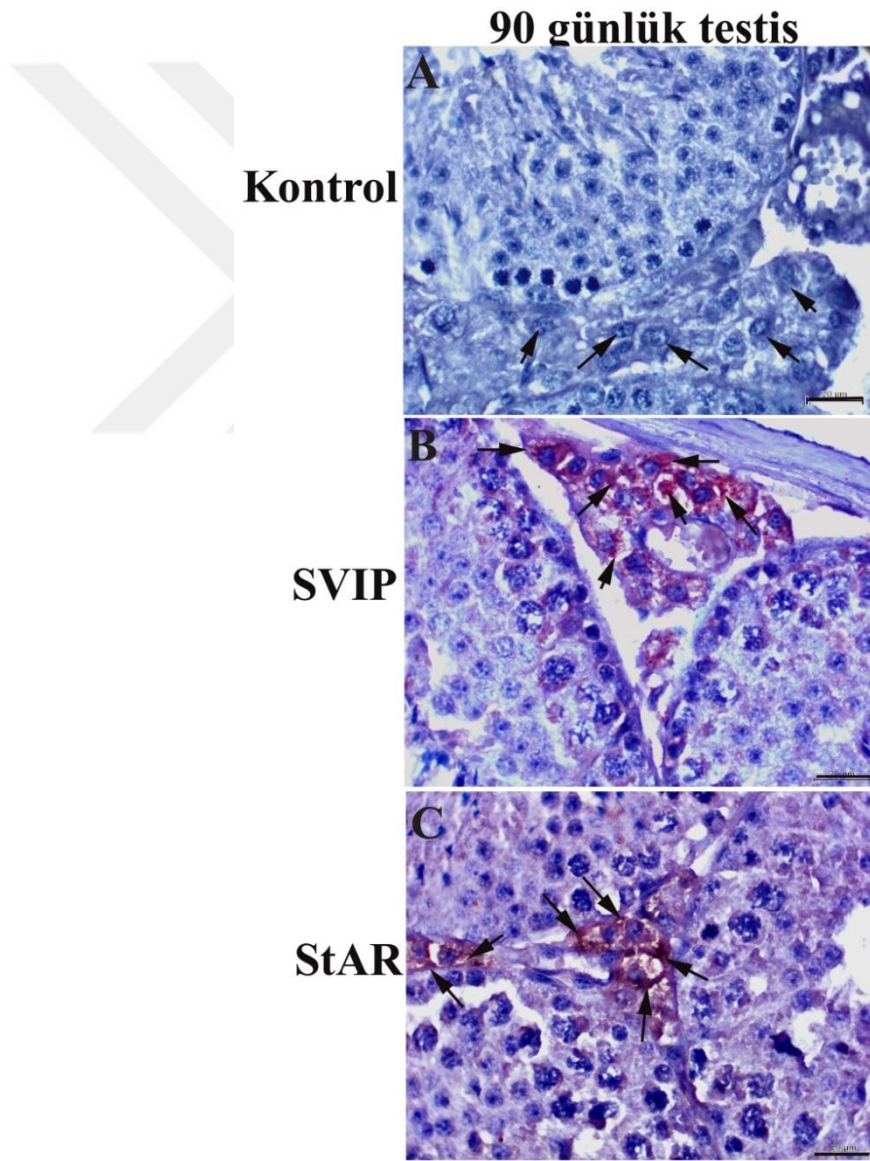
rastlanılmıştır. STAR ise hem sitoplazmik hem de nüklear olarak Leydig hücrelerinde baskın ekspresyon göstermektedir.



şekil 4.10. Postnatal 50 günlük fare testis dokusunda SVIP ve StAR proteinlerinin ekspresyonları (A-B-C). A: Negatif kontrol. B: İnterstisyel alanda görülen Leydig hücrelerinin SVIP protein ekspresyonları ok ile gösterilmiştir. SVIP ekspresyonu ggnlukla sitoplazmik gözlenmiş ve gkerdek boyanmaları ile beraber ok ile gösterilmiştir. C: İnterstisyel alanda Leydig hücrelerinde StAR protein ekspresyonları (ok). A:20 μ m, B:20 μ m, C:20 μ m

4.2.7. Postnatal 90. günde Fare Testis Dokusunda SVIP ve STAR Ekspresyonları

Doğum sonrası 90. günde, fare testislerinde SVIP ekspresyonu çoğunlukla ve şiddetli olarak intertisyel alanlardaki Leydig hücrelerinde gözlenmiştir (Şekil 4.11'de). Bazı tübüllerde, tübül içi alanlarda zayıf SVIP ve StAR ekspresyonlarına rastlanılmamıştır. STAR ise hem sitoplazmik hem de nüklear olarak Leydig hücrelerinde baskın ekspresyon göstermektedir (Bu preperasyon DAB kromojeninin aksine AEC kromojeni ile geliştirilmiştir).

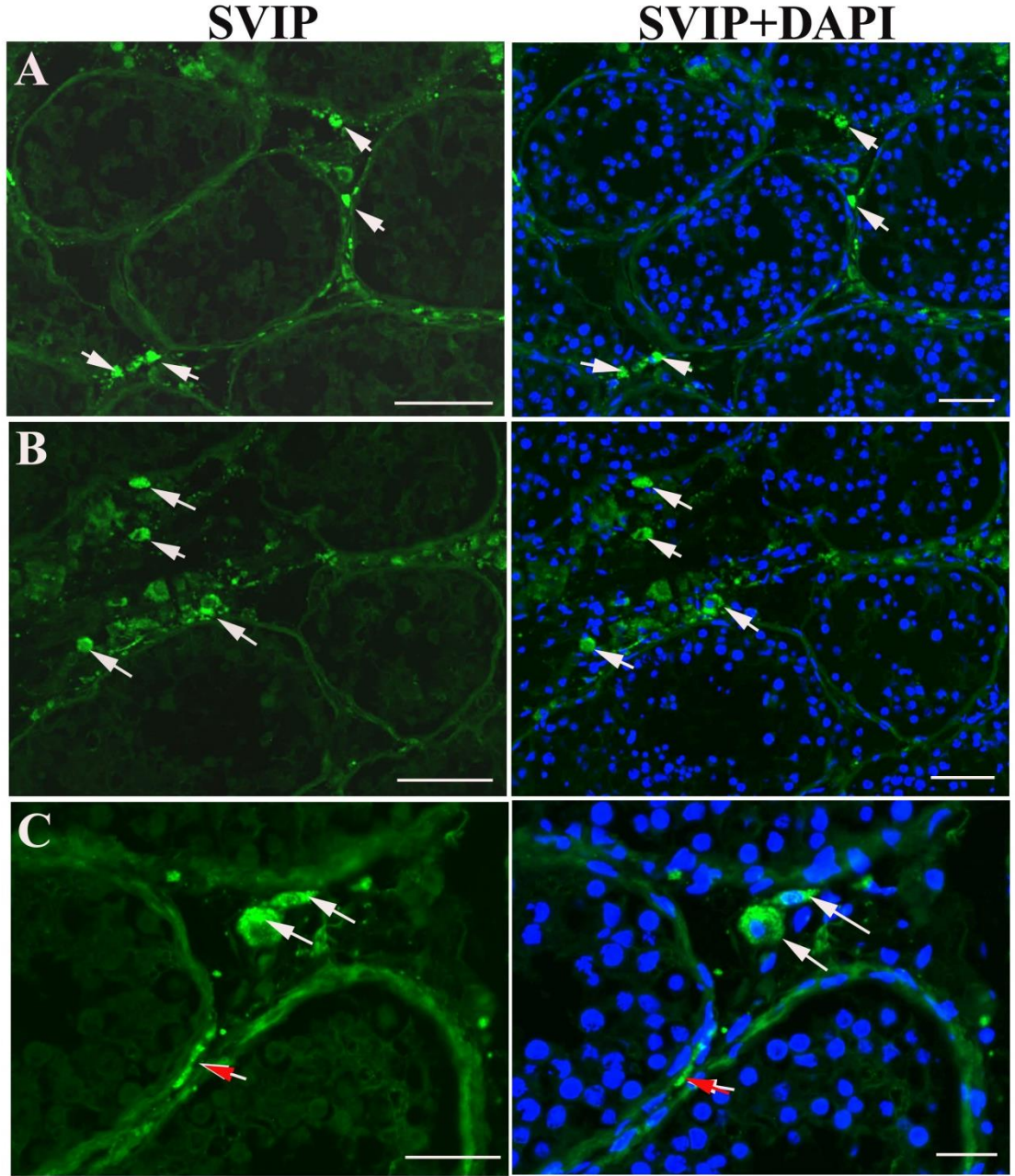


Şekil 4.11. Postnatal 90 günlük fare testis dokusunda SVIP ve StAR proteinlerinin ekspresyonları (A-B-C). A: Negatif kontrol. B: İnterstisyel alanda görülen Leydig hücrelerinin SVIP protein ekspresyonları ok ile gösterilmiştir. SVIP ekspresyonu çoğunlukla sitoplazmik gözlenmiş ve

çekirdek boyanmaları ile beraber ok ile gösterilmiştir. C: İnterstisyel alanda Leydig hücrelerinde StAR protein ekspresyonları (ok). A:20 µm, B:20 µm, C:20 µm

4.3. Postnatal 90. günde fare testis dokusunda SVIP ekspresyonunun immünofloresan ile gösterilmesi

Bu zamana kadar farklı testis gelişim günlerinde gösterdiğimiz SVIP ekspresyonu immünofloresan boyama yöntemiyle de doğrulanmıştır (Şekil 4.12).

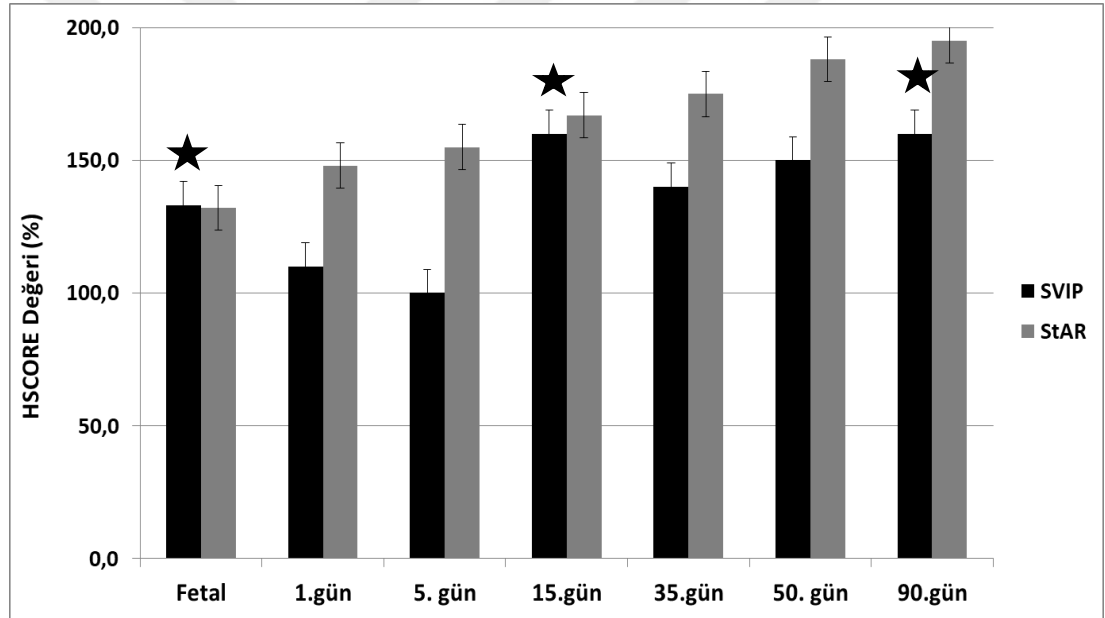


Şekil 4.12. Postnatal 90 günlük fare testis dokusunda SVIP ekspresyonunun immünofloresan incelenmesi (A-B-C). Sol kolon: SVIP ekspresyonunun (yeşil) FITC işaretli

sekonder antikorla (oklar) işaretlenmesi. Sağ Kolon: Birleştirilmiş (FITC ve DAPI birlikte), Nükleer DAPI boyanması (mavi) ile birleştirilmiş SVIP ekspresyonu. Tübül çevresini döşeyen miyoid hücreler (kırmızı ok) ve intertisyel alandaki hücrelerin SVIP ekspre ettikleri izlenmektedir.

4.4. Fetal, Neonatal, Postnatal ve Ergin Fare Testis Dokularında SVIP ve StAR İmmüno Ekspresyonlarının HSCORE Analizi ile Belirlenmesi

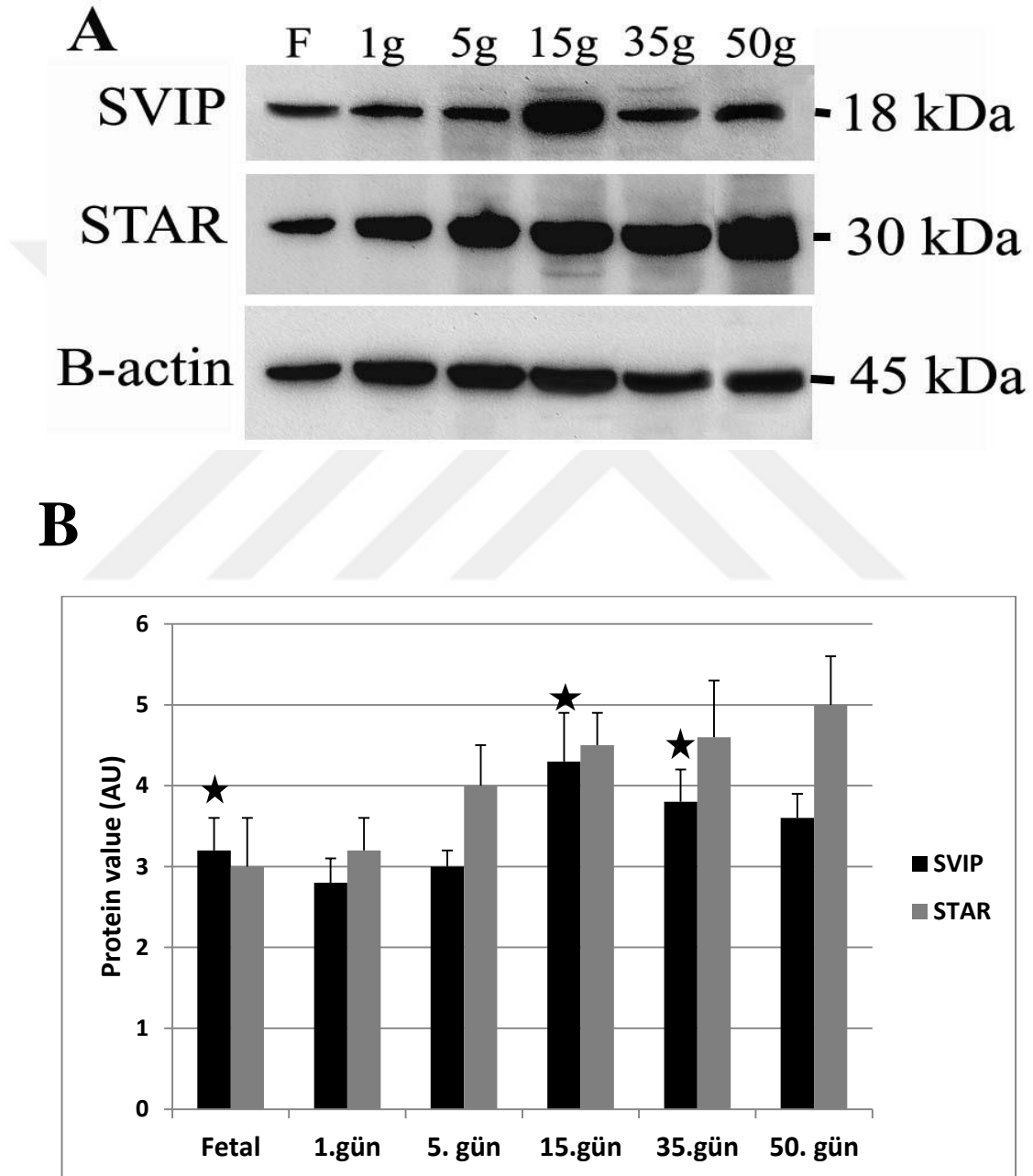
Fetal, neonatal, postnatal ve ergin fare testis dokularında SVIP ve StAR immüno ekspresyonları HSCORE analizi ile değerlendirilmiştir (Şekil 4.12). Grafikte de görüldüğü gibi, SVIP ekspresyonunun fetal, postnatal 15 ve 50. günlerde en yüksek seviyede olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.13. Fetal, neonatal, postnatal ve ergin fare testis dokularında SVIP ve StAR immüno ekspresyonlarının HSCORE analizi

4.5. Fare Testis Dokularının Western Blot Analizi

Fare testis dokusunda farklı gelişim günlerinde SVIP immünohistokimyasal ekspresyonlarının doğrulamak amacıyla, protein ekspresyonunu belirlemede kullanılan Western blot yöntemiyle de immünohistokimyasal çalışmalar doğrulanmıştır (Şekil 4.14).



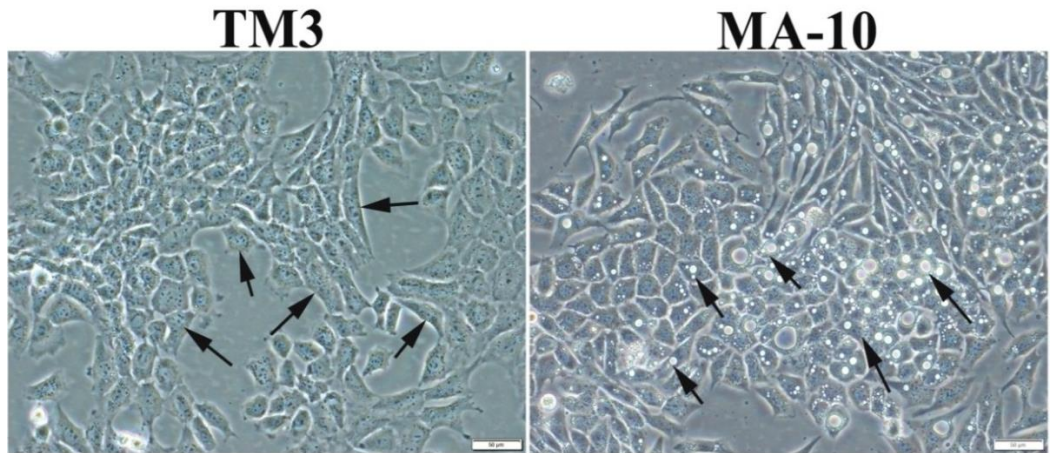
Şekil 4.14. Fetal, neonatal, postnatal ve ergin fare testis dokularında SVIP ve STAR immüno ekspresyonlarının Western blot analizi (A-B). Fetal (F), 1, 5, 15, 35, 50 ve ergin fare testisinde SVIP 18 kda, STAR 30 kda ve beta aktin 45 kda olarak belirlenmiştir (A). Gelişime bağlı olarak SVIP ve STAR ekspresyonlarında artış izlenmiştir (B). Western blot bandlarının okunması İmage J analizi ile gerçekleştirilmiş ve her band beta aktin bandıyla orantılandırılmıştır.

4.6. Fare Leydig Hücre Kültürü Çalışmaları

Bu zamana kadar ki tez çalışmalarımda fetal, neonatal, postnatal ve ergin fare testis dokularında SVIP ve StAR ekspresyonları immünohistokimyasal, immünofloresan ve Western blot çalışmalarıyla değerlendirilmiştir. Gelişmekte olan fare testisinde belirgin bir SVIP ekspresyonunun varlığı saptanmış ve bu ekspresyonun testis dokusunda özellikle Leydig hücrelerinde baskın olduğu belirlenmiştir. Fare testisinde Leydig hücrelerinde SVIP'in fonksiyonu bilinmemektedir. Bu nedenle bundan sonraki çalışmalarımız ticari olarak satın aldığımız Leydig hücre hatlarında gerçekleştirdiğimiz hücre kültürü çalışmaları üzerine odaklanmıştır. Hücre kültürü çalışmalarında sırasıyla, TM3 ve MA-10 Leydig hücrelerinin ekimi, pasajlanması, SVIP ekspresyonunun belirlenmesi ve SVIP protein ekspresyonunun SVIP siRNA'sı ile baskılanmasına özgü deneyler gerçekleştirilmiştir.

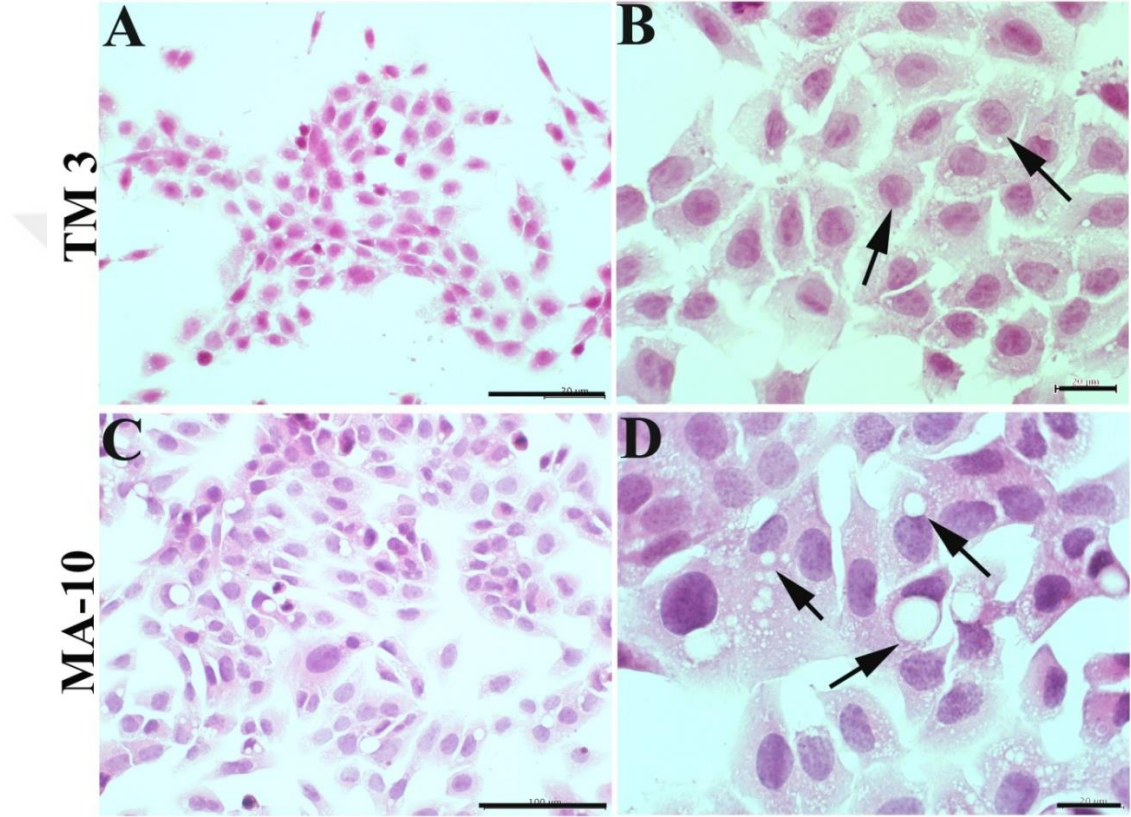
4.6.1. Fare Leydig Hücrelerin Ekimi, Pasajlanması ve Histolojik Özellikleri

MA-10 Leydig hücresi ekimi ve pasajlanması materyal ve ve metod 3.9.5'de anlatıldığı şekilde yapılmıştır. İnvirt mikroskop altında incelendiğinde adherent, yuvarlak şekilli ve bol vakuollü görünüme sahip oldukları belirlenmiştir. TM3 Leydig hücreleri ise iğsi görünümde olup yuvarlak nükleuslu hücrelerdir (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. TM3 ve MA-10 fare Leydig hücrelerinin invert mikroskop altındaki görüntüleri. Oklar hücreleri işaret ederken gösterirken, MA-10 Leydig hücrelerinin bol vakuollü görüntüleri dikkat çekicidir. Barlar: 200 µm

İnvert mikroskop altında hücre morfolojileri incelendikten sonra, fare Leydig hücrelerinin 12 kuyucuklu hücre kültürü kaplarının altına yerleştirilen özel lameller üzerine ekimi gerçekleştirilip çoğalmaları sağlanıp, hematoksilin eozin ile boyanmıştır (Şekil 4.16). Hücrelerin yuvarlağımsı nükleusları eozinofilik bol vakuollü sitoplazmalı oldukları belirlenmiştir.

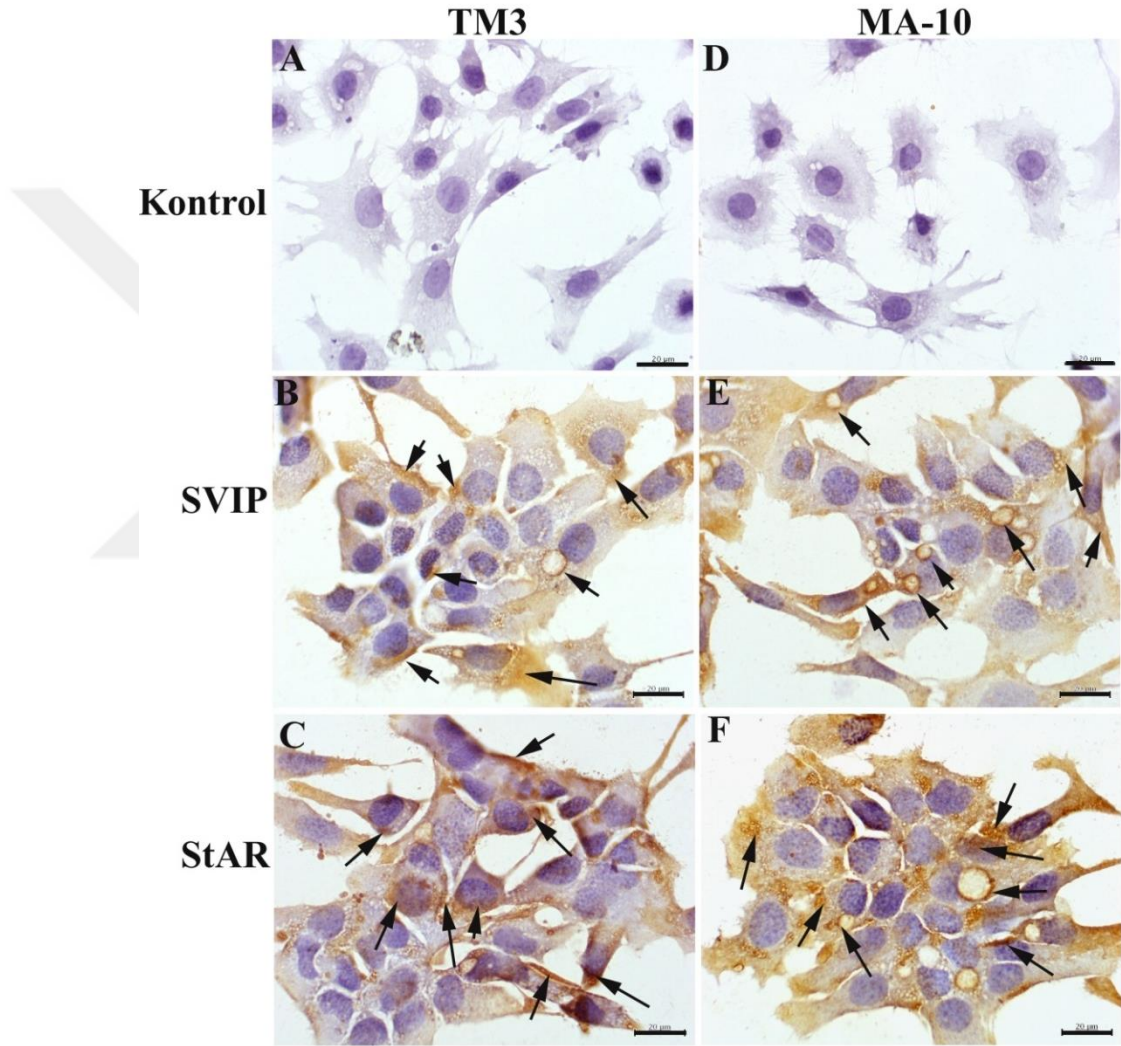


Şekil 4.16. TM3ve MA-10 fare Leydig hücrelerinin Hematoksilin-Eozin ile boyandıktan sonraki ışık mikroskopik görüntüleri. Oklar hücreleri işaret ederken gösterirken, MA-10 Leydig hücrelerinin bol vakuollü görüntüleri dikkat çekicidir. TM3 hücresinde vakuollerin az sayıda olduğu izlenmektedir.

Barlar: A-C: 200 µm, B-D: 20 µm.

4.6.2. Fare Leydig Hücrelerinde SVIP ve StAR Ekspresyonları

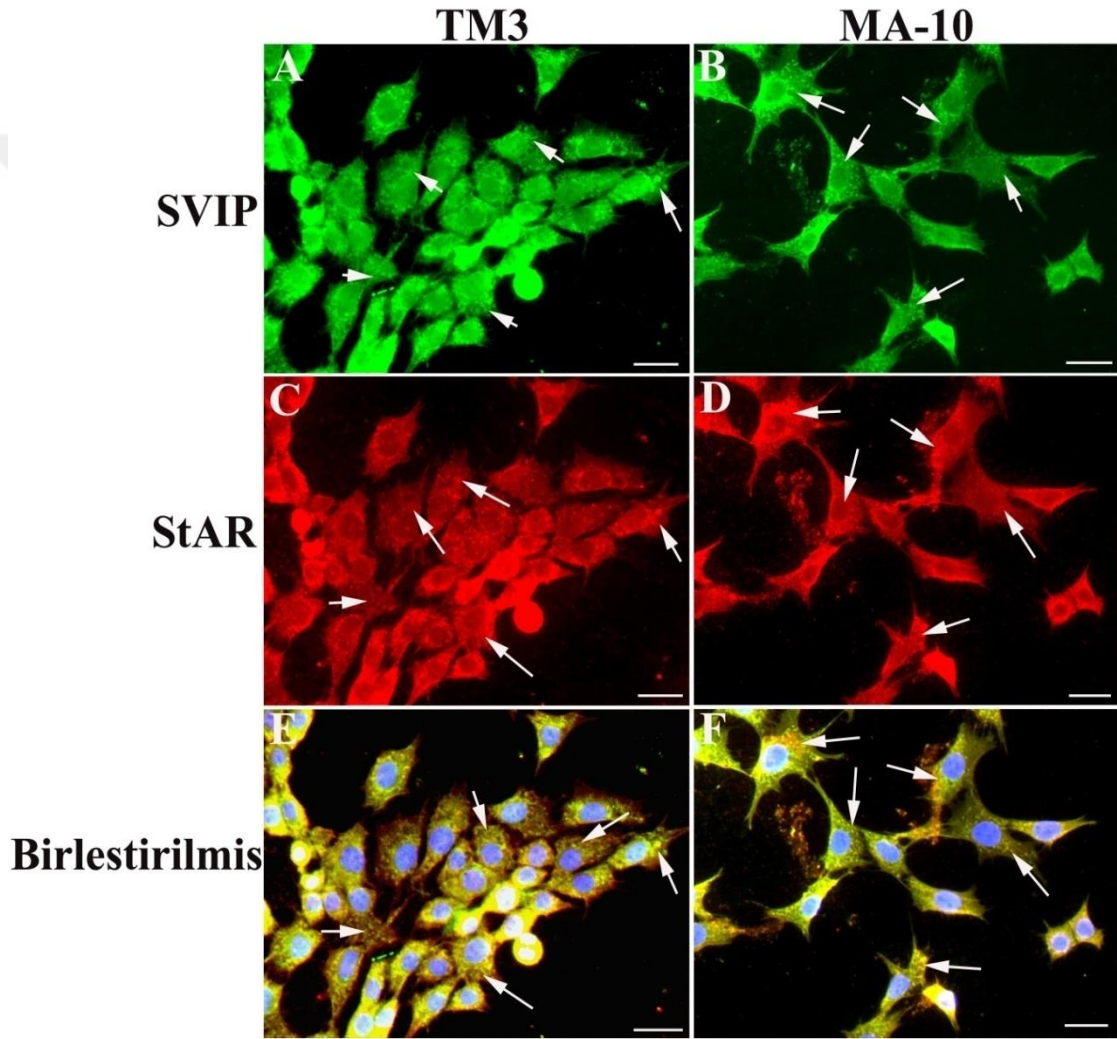
TM3 fare Leydig hücrelerinde SVIP ekspresyonunun hem çekirdekte hem de sitoplazmada olduğu gözlenmiştir ve özellikle vakuol etrafında ekspresyonlarının daha fazla olduğu gözlenmiştir. StAR protein de genellikle sitoplazmik ve vakuol etrafında boyanmasının daha fazla olduğu görülmesi ile birlikte hücre çekirdeğinde de StAR protein varlığı gözlenmiştir.



Şekil 4.17. TM3 ve MA-10 fare Leydig hücrelerinde SVIP ve StAR proteinlerinin ekspresyonlarının immünohistokimya ile gösterilmesi. TM3 Leydig hücrelerinde SVIP ve StAR protein ekspresyonlarının, MA-10 Leydig hücrelerindeki SVIP ve StAR protein ekspresyonlarından daha az olduğunu gözlemlenmiştir. SVIP'in sitoplazmada özellikle vakuol etrafında fazlaca ekspresyonu olduğu izlenmektedir. StAR proteini de hem hücre çekirdeğinde, hem de yoğunlukla vakuol etrafında ekspresyonu görülmektedir.

4.6.3. Fare Leydig Hücrelerinde SVIP ve StAR'ın Kolokalizasyonu

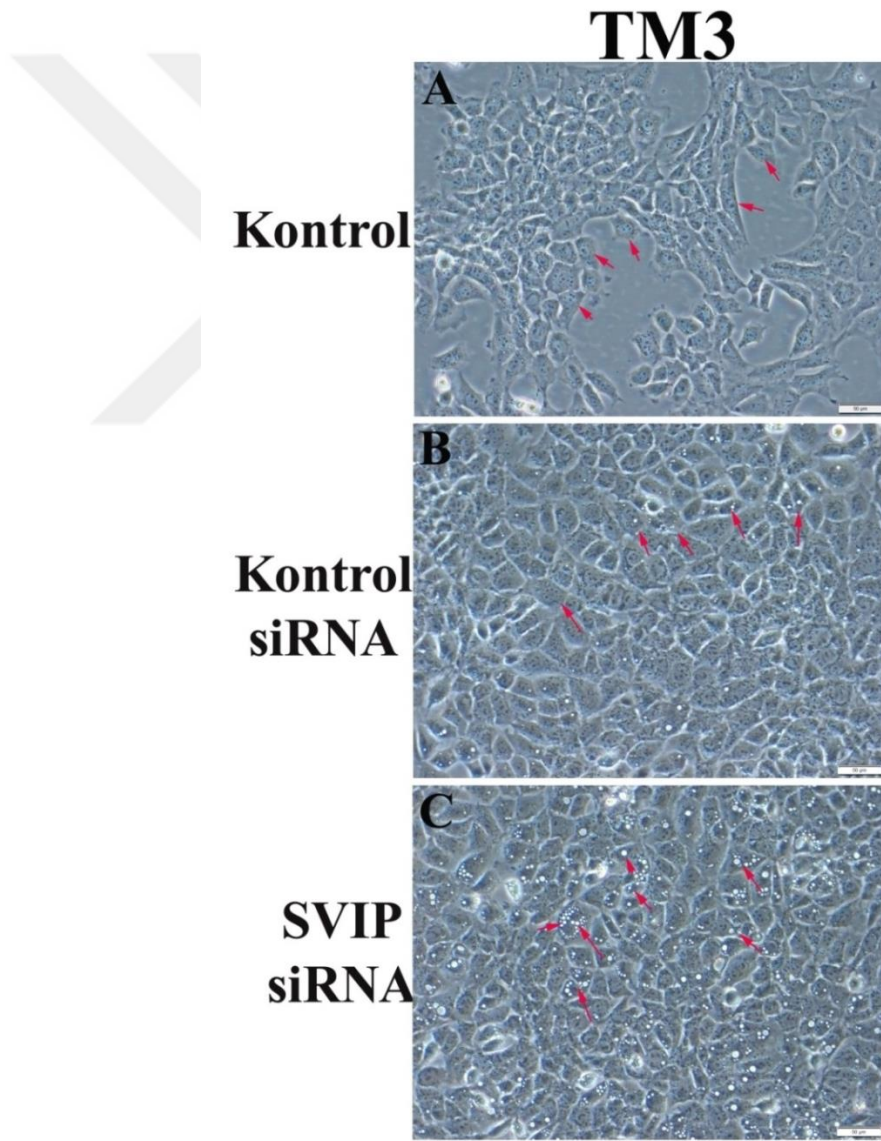
Fare Leydig hücrelerinde yaptığımız immunositokimya çalışmalarında SVIP ve STAR ekspresyonunda benzerlikler gözlemlendiği için bu iki proteinin lokalizasyonlarının çakıştığı alanları belirlemek için immunfloresan yöntemiyle birlikte lokalizasyonlarını (ko-lokalizasyon) belirlendi (Şekil 4.18). Hem TM3 hem de MA-10 Leydig hücrelerinde kolokalize alanların nükleus çevresi ve sitoplazma içinde noktasal olduğu tesbit edildi.



Şekil 4.18. TM3 ve MA-10 fare Leydig hücrelerinde SVIP ve Star proteinlerinin kolokalizasyonlarının çiftli immunofloresan boyanması ile gösterilmesi. Ok işaretleri ile immünoekspresyonlar gösterilmiş olup, özellikle SVIP proteinin ekspresyonu nokta şeklinde görülmüş ve genellikle hücre sitoplazmasında ekspresyonları gözlemlenmiştir.

4.6.4. Fare Leydig Hücrelerinde SVIP siRNA ile Ekspresyonunun Baskılanması

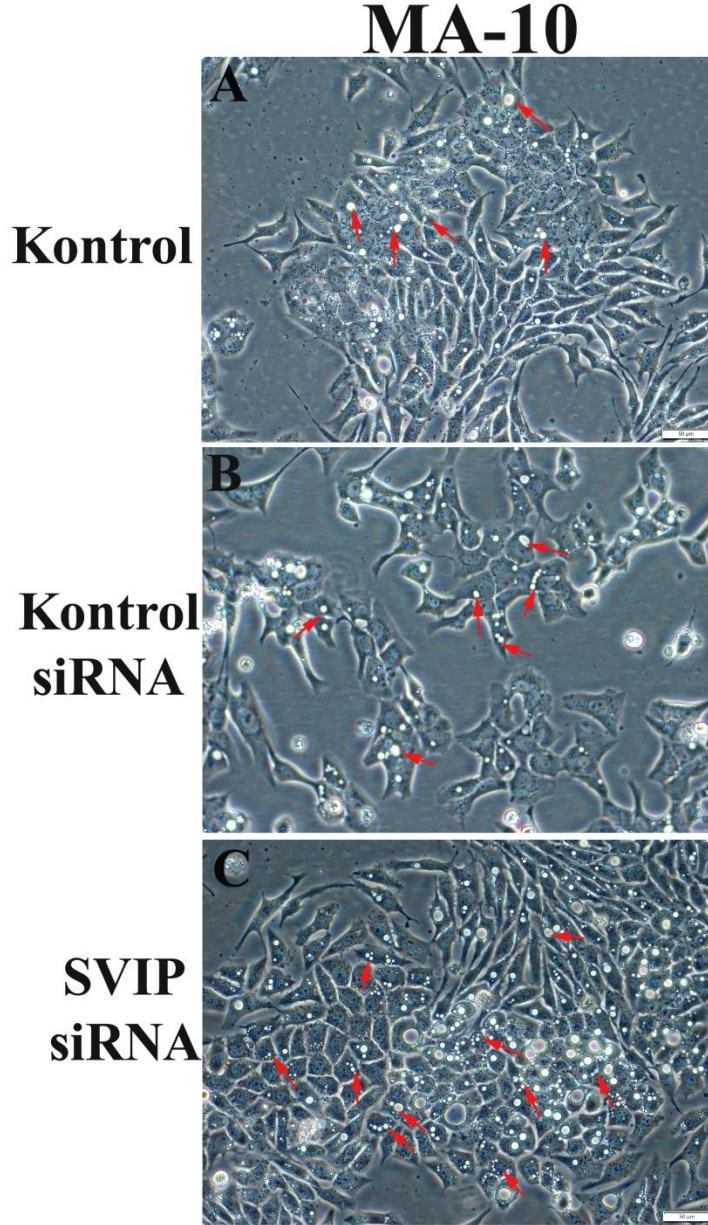
Fare Leydig hücrelerinde SVIP protein ekspresyonunun belirlenmesi sonrasında bu proteinin fonksiyonunun araştırılması için bu tezde ön çalışmalara yer verilmiştir. Öncelikle TM3 Leydig hücrelerinde uygun SVIP siRNA kullanılarak hücreler bu siRNA ile transfekte edilmiş ve transfeksiyonun 36. saatinde hem hücre morfolojilerindeki değişiklikler invert mikroskop altında (4.19'da) hem de protein ekspresyon düzeyindeki değişiklikler Western blot yöntemiyle incelenmiştir (4.21-4.22'de).



Şekil 4.19. TM3 Leydig hücrelerinde SVIP ekspresyonunun baskılanması (A, B, C) A: Kültüre TM3 Leydig hücresi. Kırmızı oklar Leydig hücresini işaret etmektedir. B: TM3 Leydig hücreleri kontrol siRNA'si ile transfekte edildikten 36 saat sonraki görüntüsü. C: TM3 Leydig

hücreleri SVIP siRNA'si ile transfekte edildikten 36 saat sonraki görüntüsü. SVIP siRNA ile transfeksiyon hücre sitoplazması içinde vakuolleşmede artış yaratmıştır.

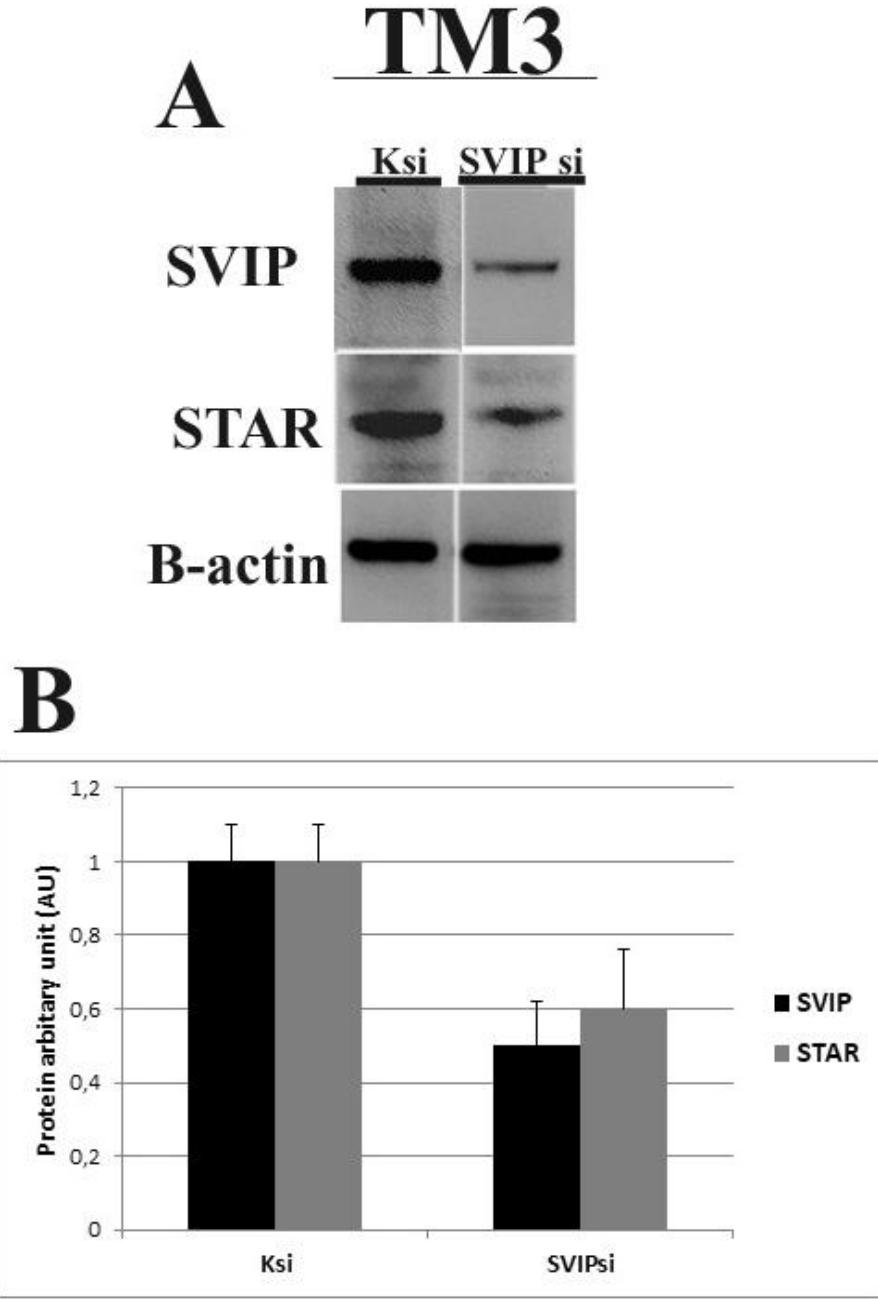
Şekil 4.19'da da görüldüğü gibi, SVIP siRNA ile transfekte edilen hücrelerde kontrol ve kontrol siRNA ile transfekte edilen hücre morfolojilerinde değişiklik izlenmemiştir. Fakat SVIP siRNA ile transfeksiyon sonrası hücre sitoplazmalarında yerleşik vakuollerde artış belirlenmiştir.



Şekil 4.20. MA-10 Leydig hücrelerinde SVIP ekspresyonunun baskılanması (A, B, C) A: Kültüre MA-10 Leydig hücresi. Kırmızı oklar Leydig hücresini işaret etmektedir. B: MA-10 Leydig hücreleri kontrol siRNA'si ile transfekte edildikten 36 saat sonraki görüntüsü. C: MA-10 Leydig hücreleri SVIP siRNA'si ile transfekte edildikten 36 saat sonraki görüntüsü. SVIP siRNA ile transfeksiyon hücre sitoplazması içinde vakuolleşmede artış yaratmıştır.

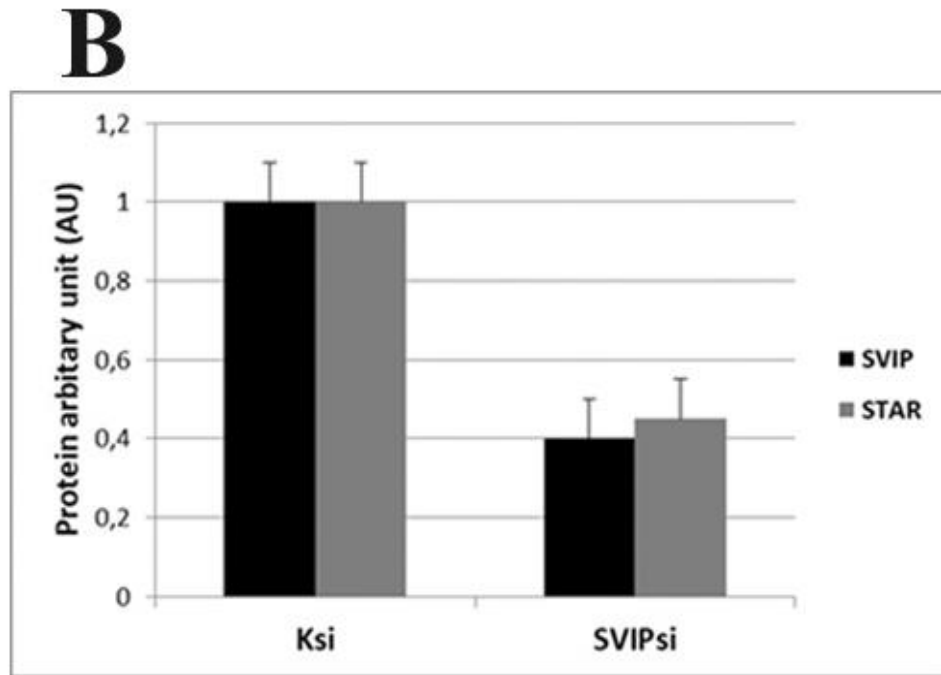
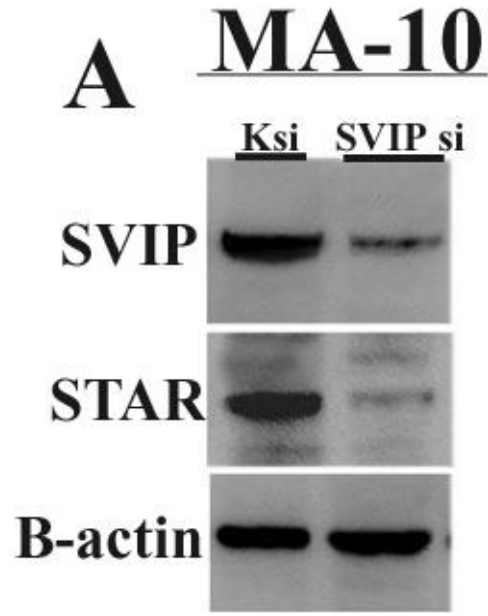
Şekil 4.20' de de görüldüğü gibi, SVIP siRNA ile transfekte edilen hücrelerde kontrol ve kontrol siRNA ile transfekte edilen hücre morfolojilerinde değişiklik izlenmemiştir. Fakat SVIP siRNA ile transfeksiyon sonrası hücre sitoplazmalarında yerleşik vakuollerde artış belirlenmiştir.

SVIP proteinin hücrede baskılanmasını ve bu baskılanma sonucundan STAR proteininin etkilenip etkilenmediğini belirlemek amacıyla aynı hücrelerle transfeksiyon sonrası Western blot çalışmaları yapılmıştır (Şekil 4.21). Öncelikle Kontrol siRNA (Ksi) ve SVIP siRNA (SVIPsi) ile Leydig hücrelerinin transfeksiyonu sonrası hücre lizatları Western blot için jele yüklenip değerlendirildiğinde SVIP'in %70-80 oranında protein ekspresyonunda azalma saptanmıştır. Bunun yanında aynı blot üzerinde STAR ekspresyonu değerlendirildiğinde SVIP ekspresyonunun azaldığı (baskılandığı) hücrelerde STAR proteininde de anlamlı dercede (%60-70) bir düşüş gözlenmiştir (Şekil 4.22 A-B).



Şekil 4.21. TM3 Leydig hücrelerinde SVIP ekspresyonunun baskılanması sonucu SVIP ve STAR proteinlerinin Western blot analizi (A-B).

A: Kontrol siRNA (Ksi) ve SVIP siRNA (SVIP si) ile transfekte edilmiş hücrelerdeki SVIP ve STAR protein ekspresyonlarındaki azalma. B: Western blot bandları Image J analiz programı ile okunup değerlendirildikten sonraki SVIP ve STAR ekspresyonlarındaki belirgin azalma



Şekil 4.22. MA-10 Leydig hücrelerinde SVIP ekspresyonunun baskılanması sonucu SVIP ve STAR proteinlerinin Western blot analizi (A-B).

A: Kontrol siRNA (Ksi) ve SVIP siRNA (SVIP si) ile transfekte edilmiş hücrelerdeki SVIP ve STAR protein ekspresyonlarındaki azalma. B: Western blot bandları İmage J analiz programı ile okunup değerlendirildikten sonraki SVIP ve STAR ekspresyonlarındaki belirgin azalma.

5. TARTIŞMA

Testis gelişimi, öncelikle embriyoda Y kromozomunun bulunmasına ve Y kromozomunun üzerinde SRY geninin aktif olmasıyla başlayıp, birçok moleküler etkileşim sonrası gonad gelişimi, duktal yapılarının gelişimi ve sentezlenen steroid hormonlar vasıtasıyla sürdürülür (99). Gonad gelişimi sırasında seminiferöz kordonlarda yer alan fetal Leydig hücreleri doğumdan sonra yerini erişkin Leydig hücrelerine bırakırlar (79). Leydig hücrelerin gelişimi ve fonksiyonu erişkin hayatı için oldukça önemlidir. Leydig hücre disfonksiyonunun, spermatogenez ile ilişkili olduğu belirtilmiş ve infertilite sebebi olacağı gösterilmiştir (100, 101). Fetal dönem gelişimi için gerekli olmasa da erişkin Leydig hücre gelişimi ve olgunlaşmasının, androjen reseptörleri (AR) tarafından yönlendirildiği ortaya koyulmuştur (81). Androjen reseptörlerinin Sertoli hücrelerinde, Leydig hücrelerinde ve testisin peritübüler miyoid hücrelerinde, androjene bağlanmasıyla hedef hücrelerde fonksiyon gösterdikleri bildirilmiştir (102, 103). Kanda dolaşan kolesterolün, de nova (hiç yoktan) Leydig hücrelerinde, mitokondri ve endoplazmik retikulum aracılığıyla işlendiği ve androjene dönüştürüldüğü gösterilmiştir (104). Androjenlerin hem testis gelişim aşamasında ve spermatogenezin şekillenmesinde hem de sekonder seks karakterlerinin sürdürülmesinde çok önemli rolleri vardır. Bu çalışmaya da konu olan küçük VCP ile etkileşen protein (SVIP) androjene cevap veren gen (androjen-response gen) olarak tanımlanmış, promoter bölgesinde, potansiyel androjen tepki elementlerinin (ARE' ler) var olduğu kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) kullanılarak doğrulanmıştır (5). SVIP'in varlığı ve fonksiyonu farklı dokularda çalışılmış olmasına rağmen, androjenin en bol bulunduğu erkek üreme sistemine ait testis doku ve hücrelerindeki ekspresyonu ve derecesi literatürdeki eksik konulardan bir tanesidir.

Küçük VCP ile etkileşen protein (SVIP: small VCP interacting protein)'nin, ilk olarak Nagahama ve arkadaşları tarafından Endoplazmik retikulumla ilişkili protein yıkımında (ERAD) da görevli yapan ve p97/VCP (Valosin içeren protein)'ye direk bağlanan bir protein olduğu bulunmuştur (1). Daha sonraki yıllarda ise,

SVIP'in p97/VCP ile etkileşerek otofajik hücre yolağını düzenlediği ortaya çıkarılmıştır (105) ve farklı sistemlerde SVIP'in rolü araştırılmıştır. Fare testisinde 15G11 genlerinden oluşan bir ata genden evrimleştiği ortaya çıkarılmış olan SVIP'in (8), varlığı fare serebrum, serebellumunda, kalp, akciğer, iskelet kası ve ince bağırsakta gösterilmiştir (7). SVIP'in VCP ile birlikte sinir sisteminde ve nöronal hücre gövdelerinde birlikte lokalize olduğu gösterilmiştir (91). Bir başka çalışmada SVIP'in, çok düşük yoğunluklu lipoprotein partiküllerinin Endoplazmik retikulumdan (ER) Golgi'ye taşınması için karaciğer tarafından salgılanmasının gerekliliği literatürde yer almıştır (90). Ve hemen sonrasında, prostat kanser hücrelerinde SVIP'in ekspresyonunun androjenlerce baskılandığı gösterilerek bu proteinin prostat kanserindeki önemi vurgulanmıştır (2). En son olarak ise, prostat kanserine benzer bir mekanizma ile glioma (beyin tümörü) hastalarında androjenlerce SVIP protein ekspresyonunun baskılandığı ve glioma tedavisinde bu proteinin kullanılması gerektiği önerilmiştir (6).

Literatürdeki bu bilgilerden anlaşıldığı üzere ERAD düzenleyicisi olarak bilinen SVIP hakkında kısıtlı sayıda bilgi mevcuttur. Bu nedenle, bu tez çalışmasında son yıllarda androjen reseptörü olarak da tanımlanan SVIP proteini, androjen reseptörünün fazlaca ekspresyonunun görüldüğü fare testis dokusunun gelişiminde gözlemlendi ve sonrasında hücre kültüründe SVIP proteininin fonksiyonuna yönelik çalışmalar yapıldı. İmmunohistokimyasal bulgulara göre, SVIP fetal testislerde özellikle interstisyel alanlarda hücre nükleus ve sitoplazmalarında belirgin bir şekilde izlendi. Semifer kordonlar içindeki gonositlerde ise ekspresyonu çok zayıf derecede ve hücre membranlarındaydı. Doğum sonrası neonatal günlerden başlayarak ergin testis gelişimine kadar SVIP lokalizasyonunda bir değişiklik saptanmadı. Genel olarak fetal, neonatal, pubertal ve erişkin testisleri incelendiğinde testis tübülleri arası alanlarda ekspresyonun şiddetli, testis periferinde ve tübül içinde çok zayıf bir reaksiyon saptandı. Fakat gelişime paralel olarak bu ekspresyon derecesinde bir artış izlendi. SVIP immuno boyanmalarına paralel olarak testis interstisyel alanlardaki Leydig hücrelerini işaretlemek adına STAR proteini görüntüledi. Ve yapılan çiftli immüno floresan boyanmaları SVIP'in STAR proteini ile kolokalize olduğunu gösterdi. Gelişimsel olarak tüm günlerde çiftli immüno floresan işaretlemeler yapılsa da, ergin testisinde yaptığımız kolokalizasyon çalışmaları SVIP'in Leydig hücrelerinde şiddetli bir

immünoekspresyonu olduğunu gösterdi. Çalışmanın ilk basamağından elde ettiğimiz sonuçlar SVIP'in Leydig hücre gelişimi ve fonksiyonunda görev yapabileceğini düşündürmüştür.

SVIP'in Leydig hücresindeki steroidogenezdeki olası fonksiyonunu belirlemek amacıyla TM3 (Leydig hücresi) ve MA-10 (Leydig tümör hücresi) hücre hatları ile yapılan çalışmalar, SVIP'in STAR proteinin ekspresyonunu etkilediğini ortaya çıkarmıştır. SVIP siRNA'i kullanılarak Leydig hücrelerinde SVIP ekspresyonunun baskılanması, aynı hücrelerde STAR proteininin ekspresyonunun azalmasına neden olmuştur. Bu ön sonuç SVIP'in STAR proteini üzerinden steroidogenezi etkileyebileceğini göstermektedir. Fakat steroidogenezde rol oynayan birçok anahtar proteinin SVIP ile ilişkili olup olmadığı ve ya SVIP'in testosteron sentezinin hangi basamağında etkili olup olmadığının anlaşılması için daha detaylı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Çalışmamızın sonuçları literatürde androjen reseptörü olarak tanımlanan SVIP'in fare testis gelişimi sürecinde ekspre edildiğini, özellikle Leydig hücrelerinde immünoekspresyonlarının baskın olduğunu ve steroidogenez de görevli STAR proteinin ekspresyonunu etkilediği ortaya çıkarmıştır. İlerleyen çalışmalar ile SVIP ve steroidogenez ilişkisini daha detaylı bir şekilde araştırılacaktır ve bu çalışmanın ileriki çalışmalar için referans olabileceği düşünülmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tezde, ilk basamakta gelişiminin farklı evrelerinde olan fare testis dokularında SVIP ekspresyonu ve bu proteinin hücresel lokalizasyonu belirlenmiştir. Çalışmanın ikinci basamağında ise Leydig hücrelerinde SVIP'in STAR proteini ile olan ilişkisi araştırılmış ve aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

- 1- İmmünohistokimyasal ve Western blot yöntemleriyle fetal, neonatal, pubertal ve erişkin fare testis dokularında SVIP'in ekspre edildiği ve gelişime paralel olarak artan ekspresyon gösterdiği bulunmuştur.
- 2- Çiftli immünofloresan yöntemiyle SVIP ve STAR proteinlerinin Leydig hücrelerinde birlikte lokalize olduğu saptanmıştır.
- 3- Leydig hücre kültürü çalışmaları ve SVIP siRNA'leri ile yapılan çalışmalar SVIP ekspresyonunun baskılanmasının STAR protein ekspresyonunu etkilediğini ve azalttığını göstermiştir.

Sonuç olarak, bu yüksek lisans tez projesi kapsamında SVIP'in fare testis dokusu gelişimine bağlı olarak ekspre edildiği ve Leydig hücre steroidogenezinde anahtar bir protein olan STAR ile birlikte çalıştığı araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar literatürde kısıtlı bilgiye sahip olduğumuz SVIP'in erkek üreme sistemindeki önemi hakkında yapılacak yeni çalışmalar için aydınlatıcı bilgiler sunmaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. Nagahama M, Suzuki M, Hamada Y, Hatsozawa K, Tani K, Yamamoto A, Tagaya M. SVIP Is a Novel VCP/p97-interacting Protein Whose Expression Causes Cell Vacuolation, *Mol Biol Cell.*, 2003, 14(1): 262–273.
2. Erzurumlu Y, Ballar P. Androgen Mediated Regulation of Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation and its Effects on Prostate Cancer, *Sci Rep.*, 2017, 7(November 2016): 1–12.
3. Vij N. AAA ATPase p97/VCP: Cellular functions, disease and therapeutic potential: Point of View, *J Cell Mol Med.*, 2008, 12(6A): 2511–2518.
4. Zhong Y, Shen H, Wang Y, Yang Y, Yang P, Fang S. Identification of ERAD components essential for dislocation of the null Hong Kong variant of α -1-antitrypsin (NHK), *Biochem Biophys Res Commun.*, 2015, 458(2): 424–428.
5. Romanuik TL, Wang G, Holt RA, Jones SJM, Marra MA, Sadar MD. Identification of novel androgen-responsive genes by sequencing of longSAGE libraries, *BMC Genomics*, 2009, 10: 476.
6. Bao D, Cheng C, Lan X, Xing R, Chen Z, Zhao H, Sun J, Wang Y, Niu C, Zhang B, Fang S. Regulation of p53 wt glioma cell proliferation by androgen receptor-mediated inhibition of small VCP/p97-interacting protein expression, *Oncotarget*, 2017, 8(14): 23142–23154.
7. Wang Y, Ballar P, Zhong Y, Zhang X, Liu C, Zhang YJ, Monteiro MJ, Li J, Fang S. Svip induces localization of p97/VCP to the plasma and lysosomal membranes and regulates autophagy, *PLoS One*, 2011, 6(8).
8. Yoshida M, Yamashita A, Idoji Y, Nishiguchi S, Shimada K, Yasunaga T, Yamanishi H. In silico study of a novel gene evolved from an ancestral SVIP gene and highly expressed in the adult mouse testes, *Int J Mol Med.*, 2008, 22(2): 143–148.
9. Ziyapak T, Adanur Ş. Androjen reseptör bozuklukları ve erkek infertilitesi,

- Journal Agent, 2014, (11): 280–285.
10. Simerly RB, Swanson LW, Chang C, Muramatsu M. Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: An in situ hybridization study, *J Comp Neurol.*, 1990, 294(1): 76–95.
 11. Quigley CA, Bellis A De, Marschke KB, El-Awady MK, Wilson EM, French FS. Androgen receptor defects: Historical, clinical, and molecular perspectives, *Endocr Rev.*, 1995, 16(3): 271–321.
 12. Benton L, Shan L, Hardy M. Differentiation of adult Leydig cells, *J Steroid Biochem Mol Biol.*, 1995, 53(1): 61–68.
 13. Lejeune H, Habert R, Saez JM. Review. Origin, proliferation and differentiation of Leydig cells, *J Mol Endocrinol.*, 1998, 20(1): 1–25.
 14. Wilson MJ, Jeyasuria P, Parker KL, Koopman P. The transcription factors steroidogenic factor-1 and SOX9 regulate expression of Vanin-1 during mouse testis development, *J Biol Chem.*, 2005, 280(7): 5917–5923.
 15. Koopman P, Münsterberg a, Capel B, Vivian N, Lovell-Badge R. Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation, *Nature*. 1990, 348(6300): 450–452.
 16. Vidal VPI, Chaboissier MC, De Rooij DG, Schedl A. Sox9 induces testis development in XX transgenic mice, *Nat Genet.*, 2001, 28(3): 216–217.
 17. Otake T, Kuroiwa A. Molecular mechanism of male differentiation is conserved in the SRY-absent mammal, *Tokudaia osimensis*, *Sci Rep.*, 2016, 6(August): 1–9.
 18. Scheludko AD, Derjaguin B., Churaev N., Radoev BP, Scheludko AD, Manev ED *et al.* Abnormal sexual development in transgenic mice chronically expressing Mullerian inhibiting Substance, *J Colloid Interface Sci.*, 1990, 345(6271): 167–170.
 19. Svingen T, Koopman P. Building the mammalian testis: Origins, differentiation, and assembly of the component cell populations, *Genes Dev.*, 2013, 27(22): 2409–2426.

20. Arango NA, Lovell-Badge R, Behringer RR. Targeted Mutagenesis of the Endogenous Mouse *Mis* Gene Promoter, *Cell*, 1999, 99(4): 409–419.
21. Hacker A, Capel B, Goodfellow P, Lovell-Badge R. Expression of *Sry*, the mouse sex determining gene, *Development*, 1995, 121: 1603–1614.
22. Jeske YWA, Bowles J, Greenfield A, Koopman P. Expression of a linear *Sry* transcript in the mouse genital ridge, *Nat Genet.*, 1995, 10(4): 480–482.
23. Barbara P d. S, Moniot B, Poulat F, Boizet B, Berta P. Steroidogenic Factor-1 Regulates Transcription of the Human Anti-mullerian Hormone Receptor, *J Biol Chem.*, 1998, 273(45): 29654–29660.
24. Hatano O, Takayama K, Imai T, Waterman MR, Takakusu A, Omura T, Morohashi K. Sex-dependent expression of a transcription factor, Ad4BP, regulating steroidogenic P-450 genes in the gonads during prenatal and postnatal rat development, *Development*, 1994, 120: 2787–97.
25. Ikeda Y, Shen WH, Ingraham HA, Parker KL. Developmental expression of mouse steroidogenic factor-1, an essential regulator of the steroid hydroxylases., *Mol Endocrinol.*, 1994, 8(5): 654–662.
26. Reinhart AJ, Williams SC, Clark BJ, Stocco DM, Biology C, Biochemistry a JR. SF-1 (Steroidogenic Factor-1) and C/EBP β (CCAAT/Enhancer Binding Protein- β) Cooperate to Regulate the Murine StAR (Steroidogenic Acute Regulatory) Promoter, *Sci York.*, 1999, 1: 729–741.
27. Phillips NB, Racca J, Chen YS, Singh R, Jancso-Radek A, Radek JT, Wickramasinghe NP, Haas E, Weiss MA. Mammalian testis-determining factor SRY and the enigma of inherited human sex reversal: Frustrated induced fit in a bent protein-DNA complex, *J Biol Chem.*, 2011, 286(42): 36787–36807.
28. Mamsen LS, Ernst EH, Borup R, Larsen A, Olesen RH, Ernst E, Anderson RA, Kristensen SG, Andersen CY. Temporal expression pattern of genes during the period of sex differentiation in human embryonic gonads, *Sci Rep.*, 2017, 7(1): 1–16.

29. Zhao GQ, Garbers DL. Male germ cell specification and differentiation, *Dev Cell.*, 2002, 2(5): 537–547.
30. Güngör NE, Özenci ÇÇ. Fetal, Neonatal, Puberte Ve Erişkin Fare Testisinde Parp-1, Parp-2 Ve Par Ekspresyonlarının Araştırılması, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıp Fakültesi, Yüksek Lisans Tezi, Histoloji ve Embriyoloji AD., Antalya, Akdeniz Üniversitesi 2010.
31. Tam PPL, Snow MHL. Proliferation and migration of primordial germ cells during compensatory growth in mouse embryos, *J Embryol Exp Morphol.*, 1981, 64(1): 133-147.
32. Anderson R, Copeland TK, Schöler H, Heasman J, Wylie C. The onset of germ cell migration in the mouse embryo, *Mech Dev.*, 2000, 91(1–2): 61–68.
33. Rossant J, Tam PPL. and Embryonic Patterning in Early Mouse Development, *Dev Cell*, 2004, 7(2): 155–164.
34. Matthew Kaufman, Alexander Yu. Nikitin JPS. *Histologic Basis of Mouse Endocrine System Development*, 2009.
35. Shimamura R, Fraizer GC, Trapman J, Lau YFC, Saunders GF. The Wilms' tumor gene WT1 can regulate genes involved in sex determination and differentiation: SRY, Mullerian-inhibiting substance, and the androgen receptor, *Clin Cancer Res.*, 1997, 3(12 II): 2571–2580.
36. Hanley NA, Ball SG, Clement-Jones M, Hagan DM, Strachan T, Lindsay S, Robson S, Ostrer H, Parker KL, Wilson DI. Expression of steroidogenic factor 1 and Wilms' tumour 1 during early human gonadal development and sex determination, *Mech Dev.*, 1999, 87(1–2): 175–180.
37. Birk OS, Casiano DE, Wassif CA, Cogliati T, Zhao L, Zhao Y, Grinberg A, Huang S, Kreidberg JA, Parker KL, Porter FD, Westphal H. The LIM homeobox gene Lhx9 is essential for mouse gonad formation, *Nature*, 2000, 403(6772): 909–913.
38. Kim Y, Capel B. Balancing the bipotential gonad between alternative organ fates: A new perspective on an old problem, *Dev Dyn.*, 2006, 235(9): 2292–

2300.

39. Ross AJ, Capel B. Signaling at the crossroads of gonad development, *Trends Endocrinol Metab.*, 2005, 16(1): 19–25.
40. Wilhelm D, Palmer S, Koopman P. Sex Determination and Gonadal Development in Mammals\10.1152/physrev.00009.2006, *Physiol Rev.*, 2007, 87(1): 1–28.
41. Brennan J, Capel B. One tissue, two fates: Molecular genetic events that underlie testis versus ovary development, *Nat Rev Genet.*, 2004, 5(7): 509–521.
42. Park SY, Jameson JL. Minireview: Transcriptional regulation of gonadal development and differentiation, *Endocrinology*, 2005, 146(3): 1035–1042.
43. Moore, Keith L. Persuad, Torchia MG. *İnsan Embriyolojisi*, Dalçık H. (Çeviri editörü). *Human Development*, Onuncu bas. Nobel Tıp Kitabevleri: İstanbul, 2016.
44. Olaso R, Habert R. Genetic and cellular analysis of male germ cell development, *J Androl.*, 2000, 21(4): 497–511.
45. Magre S, Jost A. The initial phases of testicular organogenesis in the rat. An electron microscopy study., *Arch Anat Microsc Morphol Exp.*, 1980, 69: 297–318.
46. Orth JM. Proliferation of sertoli cells in fetal and postnatal rats: A quantitative autoradiographic study, *Anat Rec.*, 1982, 203(4): 485–492.
47. Vergouwen RP, Huiskamp R, Bas RJ, Roepers-Gajadien HL, Davids JA, de Rooij DG. Postnatal development of testicular cell populations in mice, *J Reprod Fertil.*, 1989, 99(2): 479–85.
48. Vergouwen RPPA, Jacobs SGPM, Huiskamp R, Davids JAG, de Rooij DG. Proliferative activity of gonocytes, Sertoli cells and interstitial cells during testicular development in mice., *J Reprod Fertil.*, 1991, 93(1): 233–43.
49. Nagano R, Tabata S, Nakanishi Y, Ohsako S, Kurohmaru M, Hayashi Y.

- Reproliferation and relocation of mouse male germ cells (gonocytes) during prespermatogenesis, *Anat Rec.*, 2000, 258(2): 210–220.
50. Beaumont HM, Mandl a M. a Quantitative Study of Primordial Germ Cells in the Male Rat., *J Embryol Exp Morphol.*, 1963, 11(December): 715–40.
 51. Boulogne B, Olaso R, Levacher C, Durand P, Habert R. Apoptosis and mitosis in gonocytes of the rat testis during foetal and neonatal development, *Int J Androl.*, 1999, 22(6): 356–365.
 52. Habert R, Lejeune H, Saez JM. Origin, differentiation and regulation of fetal and adult Leydig cells, *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2001, 179(1–2): 47–74.
 53. Warren DW, Haltmeyer GC, Eik Nes KB. Testosterone in the fetal rat testis, *Biol Reprod.*, 1973, 8(5): 560–565.
 54. Habert R, Picon R. Testosterone, dihydrotestosterone and estradiol-17 β levels in maternal and fetal plasma and in fetal testes in the rat, *J Steroid Biochem.*, 1984, 21(2): 193–198.
 55. O’Shaughnessy PJ, Baker P, Sohnius U, Haavisto A-M, Charlton HM, Huhtaniemi I. Fetal Development of Leydig Cell Activity in the Mouse Is Independent of Pituitary Gonadotroph Function, *Endocrinology*, 1998, 139(3): 1141–1146.
 56. Saez JM. Leydig Cells: Endocrine, Paracrine, and Autocrine Regulation, *Endocr Rev.*, 1994, 15(5): 574–626.
 57. Sancak B, Cumhuri M. *Fonksiyonel Anatomi Baş Boyun Ve İç Organlar*, 11. Basım. Odtü Yayıncılık: ANKARA, 2017.
 58. Paulsen F, Waschke J, Böckers TM. *Sabotta Anatomi Konu Kitabı*, Sargon MF. (Çeviri editörü), 1. basım. Güneş Tıp Kitapevleri, 2016.
 59. Sargon MF. *Anatomi Akıl Notları*, 1. basım. Güneş Tıp Kitapevi: ANKARA, 2018.
 60. Ross MH, Pawlina W. *Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas*, Baykal B. (Çeviri editörü), *Histology subject expression and atlas*, 6. Basım. Palme Yayıncılık,

2017.

61. Bellve R, Cavicchia JC, Millette CF, O'Brien DA, Bhatnagar YM, Dym M. Spermatogenic cells of the prepubertal mouse. Isolation and morphological characterization., *J Cell Biol.*, 1977, 74(1): 68–85.
62. Aydos K. Testis İnterstisyumu Ve Leydig Hücreleri, 2012., <http://www.kaanaydos.com.tr/testis-interstisyumu-ve-leydig-hucreleri.html>. 10.10.2018.
63. Eşrefoğlu M. *Özel Histoloji*, İstanbul Tıp Kitapevi: İstanbul, 2016.
64. Skinner MK, Griswold MD. Sertoli cells synthesize and secrete transferrin-like protein, *J Biol Chem.*, 1980, 255(20): 9523–9525.
65. Abuç ÖÖ, Ünal B. Nanopartiküllerin Fare Testis Dokusunda Endoplazmik Retikulum Stresi Üzerine Olan Etkileri, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji AD., Yüksek Lisans Tezi, 2015, 119(3).
66. Ross MH. The fine structure and development of the peritubular contractile cell component in the seminiferous tubules of the mouse, *Am J Anat.*, 1967, 121(3): 523–557.
67. Leblond CP, Clermont Y. Spermiogenesis of rat, mouse, hamster and guinea pig as revealed by the periodic acid fuchsin sulfurous acid technique, *Am J Anat.*, 1952, 90(2): 167–215.
68. Oakberg EF. A description of spermiogenesis in the mouse and its use in analysis of the cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewal, *Am J Anat.*, 1956, 99(3): 391–413.
69. Oakberg E. Duration of Spermatogenesis in the mouse and timing of stages of the cycle of the seminiferous epithelium, *Am J Anat.*, 1956, 99(3): 507–516.
70. Sassone-Corsi P. Transcriptional checkpoints determining the fate of male germ cells, *Cell*, 1997, 88(2): 163–166.
71. Abney TO. The potential roles of estrogens in regulating Leydig cell development and function: A review, *Steroids*, 1999, 64(9): 610–617.

72. Payne AH, Hardy MP. *The Leydig Cell in Health and Disease*, Springer, 2007.
73. Whitehead R. The embryonic development of the interstitial cells of Leydig, *Am J Anat.*, 1904, 3: 167–187.
74. Yao HH-C, Barsoum I. Fetal Leydig Cells, *Leydig Cell Heal Dis.*, 2014, (43493): 47–54.
75. Haider SG. Cell Biology of Leydig Cells in the Testis, In: Jeon KW (ed). *International Review of Cytology: A Survey of Cell Biology*. 2004.
76. O’Shaughnessy PJ, Baker PJ, Johnston H. The foetal Leydig cell--differentiation, function and regulation., *Int J Androl.*, 2006, 29(1): 90-5; discussion 105-8.
77. Barsoum IB, Yao HHC. Fetal Leydig cells: Progenitor cell maintenance and differentiation, *J Androl.*, 2010, 31(1): 11–15.
78. Tremblay JJ. Molecular regulation of steroidogenesis in endocrine Leydig cells, *Steroids*, 2015, 103: 3–10.
79. Griswold SL, Behringer RR. Fetal Leydig Cell Origin and Development, *Sexual Development*, 2009, 77030: 1–15.
80. Yao HHC, Whoriskey W, Capel B. Desert Hedgehog/Patched 1 signaling specifies fetal Leydig cell fate in testis organogenesis, *Genes Dev.*, 2002, 16(11): 1433–1440.
81. Shaughnessy PJO, Johnston H, Willerton L, Baker PJ. Failure of normal adult Leydig cell development in androgen-receptor-deficient mice, *J Cell Sci.*, 2002, : 3491–3496.
82. Baker PJ, O’Shaughnessy PJ. Role of gonadotrophins in regulating numbers of Leydig and Sertoli cells during fetal and postnatal development in mice, *Reproduction*, 2001, 122(2): 227–234.
83. Park SY, Tong M, Jameson JL. Distinct roles for Steroidogenic factor 1 and Desert hedgehog pathways in fetal and adult leydig cell development, *Endocrinology*, 2007, 148(8): 3704–3710.

84. Chen H, Wang Y, Ge R, Zirkin BR. Leydig cell stem cells: Identification, proliferation and differentiation, *Mol Cell Endocrinol.*, 2017, 445: 65–73.
85. Mendis-handagama SM, Ariyaratne HB. Minireview Differentiation of the Adult Leydig Cell Population in the Postnatal Testis, *Biol Reprod.*, 2018, 671(April): 660–671.
86. Dargemont C, Ossareh-Nazari B. Cdc48/p97, a key actor in the interplay between autophagy and ubiquitin/proteasome catabolic pathways, *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.*, 2012, 1823(1): 138–144.
87. Maurizi MR, Li CC. AAA proteins: in search of a common molecular basis. International Meeting on Cellular Functions of AAA Proteins., *EMBO Rep.*, 2001, 2(11): 980–5.
88. Ballar P, Fang S. Regulation of ER-associated degradation via p97/VCP-interacting motif., *Biochem Soc Trans.*, 2008, 36(Pt 5): 818–22.
89. Chen Z, Du S, Fang S. gp78: a Multifaceted Ubiquitin Ligase that Integrates a Unique Protein Degradation Pathway from the Endoplasmic Reticulum, *Curr Protein Pept Sci.*, 2012, 13(5): 414–424.
90. Tiwari S, Siddiqi S, Zhelyabovska O, Siddiqi SA. Silencing of small valosin-containing protein-interacting protein (SVIP) reduces very low density lipoprotein (VLDL) secretion from rat hepatocytes by disrupting its endoplasmic reticulum (ER)-to-Golgi trafficking, *J Biol Chem.*, 2016, 291(24): 12514–12526.
91. Wu J, Peng D, Voehler M, Sanders CR, Li J. Structure and expression of a novel compact myelin protein - Small VCP-interacting protein (SVIP), *Biochem Biophys Res Commun.*, 2013, 440(1): 173–178.
92. Stocco DM. The role of the StAR protein in steroidogenesis: Challenges for the future, *J Endocrinol.*, 2000, 164(3): 247–253.
93. Pres P. Testicular Steroidogenesis, *Reproductive Endocrinology*, 1977.
94. Stocco DM, Clark BJ. The role of the steroidogenic acute regulatory protein in steroidogenesis., *Steroids*, 1997, 62(1): 29–36.

95. Svechnikov K, Izzo G, Landreh L, Weisser J. Endocrine Disruptors and Leydig Cell Function, *J Biomed Biotechnol.*, 2010, 2010: 1–10.
96. O’Shaughnessy PJ, Baker PJ, Johnston H, Skakkebaek NE, Page D, O’Shaughnessy P, Sharpe R, Ivell R. The foetal Leydig cell - Differentiation, function and regulation, *Int J Androl.*, 2006, 29(1): 90–95.
97. Gao HB, Tong MH, Hu YQ, You HY, Guo QS, Ge RS, Hardy MP. Mechanisms of glucocorticoid-induced Leydig cell apoptosis, *Mol Cell Endocrinol.*, 2003, 199(1–2): 153–163.
98. Klinefelter GR, Ewing LL. Optimizing Testosterone Production By Purified Adult Rat Leydig Cells In Vitro, *Vitr Cell ~ Dev Biol.*, 1988, 24(6): 546.
99. Bühler EM. A synopsis of the human Y chromosome, *Hum Genet.*, 1980, 55(2): 145–175.
100. Andersson AM, Jørgensen N, Frydelund-Larsen L, Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek NE. Impaired Leydig cell function in infertile men: A study of 357 idiopathic infertile men and 318 proven fertile controls, *J Clin Endocrinol Metab.*, 2004, 89(7): 3161–3167.
101. Xu Q, Lin HY, Yeh S Der, Yu IC, Wang RS, Chen YT, Zhang C, Altuwajri S, Chen LM, Chuang KH, Chiang HS, Yeh S, Chang C. Infertility with defective spermatogenesis and steroidogenesis in male mice lacking androgen receptor in Leydig cells, *Endocrine*, 2007, 32(1): 96–106.
102. Mooradian AD, Morley JE, Korenman SG. Biological actions of androgens, *Endocr Rev.*, 1987, 8(1): 1–28.
103. Zhou X, Kudo A, Kawakami H, Hirano H. Immunohistochemical localization of androgen receptor in mouse testicular germ cells during fetal and postnatal development, *Anat Rec.*, 1996, 245(3): 509–518.
104. Hall PF, Irby DC, De Kretser DM. Conversion of cholesterol to androgens by rat testes: comparison of interstitial cells and seminiferous tubules., *Endocrinology*, 1969, 84(3): 488–496.
105. Ballar P, Zhong Y, Nagahama M, Tagaya M, Shen Y, Fang S. Identification of

SVIP as an endogenous inhibitor of endoplasmic reticulum-associated degradation, *J Biol Chem.*, 2007, 282(47): 33908–33914.

8. EKLER

EK-1. Etik Kurul Onay Formu



Kobay Deney Hayvanları Laboratuvarı Sanayi ve Ticaret A.Ş.
I.O.S.B 21. Cd. 520. Sk. No:2/2 Yenimahalle ANKARA
Tel & Fax: 0 (312) 394 70 94
www.kobay.com.tr

KOBAY DHL A.Ş. YEREL ETİK KURULU BAŞVURU ONAYI		
BAŞVURU BİLGİLERİ	Protokol Numarası	277
	Protokol Adı	<i>Fare Testisinde Küçük-UCP ile Etkileşen Proteinin (SVIP) Ekspresyonu ve Fonksiyonun Belirlenmesi</i>
	Başvuru Tarihi	05.02.2018
	Sorumlu Araştırmacı Adı-Unvanı	Prof. Dr. Sevil Çaylı
	Sorumlu Araştırmacı Çalıştığı Kurum	Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi
	Yardımcı Araştırmacılar	Bio Gülben Akça
KARAR BİLGİLERİ	Onay Numarası	277
	Onay Tarihi	23.03.2018
	Onaylanan Hayvan Türü ve Sayısı	Fare Balb-c 36 Adet
	Onay Bilgileri	Proje amaç, gereke, yaklaşım ve yöntem yönünden incelenmiş ve çalışmanın gerçekleştirilmesinde Etik sakınca bulunmadığına karar verilmiştir.
KOBAY DHL A.Ş. YEREL ETİK KURUL ÜYELERİ	Etik Kurul Başkanı Veteriner Hekim A. Begüm BUĞDAYCI AÇIKKOL	
	Etik Kurul Üyesi Doç. Dr. M. Orhan ULUDAĞ	
	Etik Kurul Üyesi Doç. Dr. Güneş Esendağlı	
	Etik Kurul Üyesi Dr. Buğra Adil BUYRUKÇU	
	Etik Kurul Üyesi Dr. Can KOŞAL	
	Etik Kurul Üyesi Vet. Hekim Ergun KARAGENÇ	
	Etik Kurul Üyesi Veteriner Hekim Salih Salar	
	Etik Kurul Üyesi Diğdem Yöyen Ermiş	
	Etik Kurul Üyesi Turgut ALTUN	
	Etik Kurul Üyesi Adil Kış	
	Etik Kurul Üyesi Oğuz GÜRAY	

EK-2. Özgeçmiş

KİŞİSEL BİLGİLER	
Adı Soyadı	: Gülben AKCAN
Doğum tarihi	: 22.06.1992
Doğum yeri	: Ankara
Medeni hali	: Bekar
Uyruğu	: T.C.
Adres	: T.C. Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji & Embriyoloji Anabilim Dalı, Bilkent yolu 3. Km. Bilkent/ANKARA
Tel	: 0312 3241555
E-mail	: glbenakcan@gmail.com
EĞİTİM	
Lise	: Anıttepe Anadolu Lisesi
Lisans	: Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü
YABANCI DİL BİLGİSİ	
İngilizce	: YÖKDİL : 58,75
ÜYE OLUNAN MESLEKİ KURULUŞLAR	
Türk Histoloji ve Embriyoloji Derneği (2016 / --)	

EK-3. Ulusal Platformda Sunulmuş Bildiri (Sözlü Sunum 1)



14. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi 10-13 Mayıs 2018, Antalya - Türkiye

S61

Küçük VCP ile etkileşen protein (SVIP)'nin gelişmekte olan fare testisinde ekspresyonunun ve fonksiyonunun belirlenmesi

Gülben Akcan, Ebru Alimoğulları, Radwan Abu Issa, Sevil Çaylı
Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji AnaBilim Dalı, Ankara

Giriş: Küçük VCP ile etkileşen protein (SVIP: Small VCP-Interacting Protein), Endoplasmik retikulum ile ilişkili protein yıkımı (ERAD) ailesine ait 76 aminoasitten oluşmuş 9-Kda'lık bir proteindir. SVIP'in fare beyninin serebrum ve serebellumunda yüksek oranda eksprese edildiği, kalp, akciğer, iskelet kası ve ince bağırsakta da normal seviyelerde ekspresyonunun olduğu gösterilmiştir. Son yapılan çalışmalarda, SVIP'in androjene cevap veren bir protein olduğu ve androjenler tarafından SVIP ekspresyonunun düzenlendiği belirlenmiştir. Fakat bugüne kadar SVIP'in androjen reseptörlerinin fazlaca ekspre edildiği bir erkek üreme organı olan testis dokusundaki hücrel lokalizasyonu ve olası fonksiyonu araştırılmamıştır. Bu nedenle bu çalışmada öncelikle SVIP proteinin gelişmekte olan fare testisindeki ekspresyonunu hücrel düzeyde belirlemek ve ikincil olarak da SVIP protein ekspresyonu belirlenen hücrelerde bu proteinin olası fonksiyonunu hücre kültürü çalışmaları ile saptamak amaçlanmıştır.

Materyal-Metod: Gelişmekte olan fare testislerinde SVIP'in protein ekspresyonunu belirlemek amacıyla fetal (18 ve 19 günlük, n:6), postnatal (1, 5, 15, 35 günlük, n:6) ve ergin fareler (50 günlük, n:6)'den elde edilen testis dokuları immunohistokimya ve Western blot çalışmaları için kullanıldı. Ayrıca ATCC firmasına ait TM3 ve MA-10 fare Leydig hücreleri kültüre edilip, bu hücrelerde SVIP ve Steroidogenik akut regülör protein (STAR)'nin ekspresyonları kolokalizasyon çalışmalarıyla floresan mikroskopisi altında değerlendirildi.



**TÜRK OFTALMOLOJİ
DERNEĞİ**
Diyarbakır Şubesi
31. YAZ SEMPOZYUMU
7-9 EYLÜL 2018
DoubleTree by Hilton
VAN

Türk Oftalmoloji Derneği
7-9 Eylül 2

SS-17

**Tavşan Sklera Hasar Modelinde
Siliyer Bölgenin Morfolojik ve
Immünohistokimyasal Olarak İncelenmesi**

Gamze Dereli Can¹, Gülben Akcan²,
Mehmet Erol Can¹, Özge Ekin Akdere³, Sevil Çayır²,
Menemşe Gümüşderelioğlu³

¹Bursa Yüksek İhtisas Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Gör
Hastalıkları Kliniği, Bursa

²Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji
Anabilim Dalı, Ankara

³Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik
Anabilim Dalı, Ankara

AMAÇ: Sklera defekt modeli oluşturularak farklı greft materyalleri ile onarım uygulanan tavşanlarda defekte komşu siliyer bölgenin morfoloji ve inflamasyon derecesinin incelenmesi.

GEREÇ-YÖNTEM: 45 Yeni Zelanda tavşanı 5 gruba ayrıldı (n=9). Limbustan 3 mm geride sklera kalınlığının yansını içeren hasar modeli oluşturuldu. A grubu defekt oluşturmadan takip (negatif kontrol), B grubu defekt+greft yok (pozitif kontrol), C grubu defekt+insan amniyotik membran (zenojenik), D grubu defekt+tavşan sklerası (allojenik), E grubu defekt+trombositten zengin fibrin (otojenik) olarak belirlendi. Gruplara 1. hafta, 1. ve 2. aylarda ötenazi uygulanarak H&E, Mallory Trikróm, TGFBR1, FGF, BMP2, Kollajen1, Agrekan, MMP2 boyamaları yapıldı.