

T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

**TESTİSTE, ePABP [EMBRİYONİK POLİ(A) BAĞLANMA  
PROTEİNİ] VE PABPC1 [POLİ(A) BAĞLANMA PROTEİNİ,  
SİTOPLAZMİK 1] GENLERİNİN EKSPRESYON  
DÜZEYLERİ VE HÜCRESEL DAĞILIMLARININ  
BELİRLENMESİ**

**Saffet ÖZTÜRK**

**Doktora Tezi**

**Antalya, 2013**

T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

**TESTİSTE, ePABP [EMBRİYONİK POLİ(A) BAĞLANMA  
PROTEİNİ] VE PABPC1 [POLİ(A) BAĞLANMA PROTEİNİ,  
SİTOPLAZMİK 1] GENLERİNİN EKSPRESYON  
DÜZEYLERİ VE HÜCRESEL DAĞILIMLARININ  
BELİRLENMESİ**

**Saffet ÖZTÜRK**

**Doktora Tezi**

**Tez Danışmanları**

**Prof. Dr. Necdet DEMİR**

**Doç. Dr. Emre SELİ**

Bu çalışma, Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. (Proje No: 2010.03.0122.003)

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir.”

**Antalya, 2013**

## **Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kurulu ve Senato Kararı**

Sağlık Bilimleri Enstitüsünün 22/06/2000 tarih ve 02/09 sayılı enstitü kurul kararı ve 23/05/2003 tarih ve 04/44 sayılı senato kararı gereğince 'Sağlık Bilimleri Enstitülerinde lisansüstü eğitim gören doktora öğrencilerinin tez savunma sınavına girebilmeleri için, doktora bilim alanında en az bir yurtdışı yayın yapması gerektiği' ilkesi gereğince yapılan yayınların listesi aşağıdadır.

- 1. Ozturk S,** Guzeloglu-Kayisli O, Demir N, Sozen B, Ilbay O, Lalioti MD, Seli E. Epab and Pabpc1 are differentially expressed during male germ cell development. Reproductive Sciences 2012;19(9):911-922.
- 2. Ozturk S,** Demir N. DNA repair mechanisms in mammalian germ cells. Histology and Histopathology 2011;26(4):505-517.
- 3. Ozturk S,** Demir R. Particular functions of estrogen and progesterone in establishment of uterine receptivity and embryo implantation. Histology and Histopathology 2010;25(9):1215-1228.

**Sağlık Bilimleri Enstitüsü M¼d¼rl¼đ¼ne;**

Bu alışma, j¼rimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir. 25/06/2013

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Necdet DEMİR  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fak¼ltesi  
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

¼ye : Prof. Dr. Sait POLAT  
ukurova Üniversitesi Tıp Fak¼ltesi  
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

¼ye : Prof. Dr. Emin T¼rkay KORGUN  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fak¼ltesi  
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

¼ye : Doç. Dr. iler ÇELİK ÖZENCİ  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fak¼ltesi  
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

¼ye : Doç. Dr. G¼khan AKKOYUNLU  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fak¼ltesi  
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

**ONAY:**

Bu tez, Enstit¼ Y¼netim Kurulunca belirlenen yukarıdaki j¼ri ¼yeleri tarafından uygun g¼r¼lm¼ř ve Enstit¼ Y¼netim Kurulu'nun ...../...../2013 tarih ve ...../.....sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

**Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL**  
**Enstit¼ M¼d¼r¼**



## ÖZET

ePABP [embriyonik poli(A) bağlanma proteini], oosit gelişim döneminde depolanan maternal mRNA'ların translasyonel düzenlenmesinde görev alır. Embriyonik genom aktivasyonundan sonraki erken dönem embriyolarda ve somatik hücrelerde, mRNA'ların translasyonel kontrolleri ise PABPC1 [poli(A) bağlanma proteini, sitoplazmik 1] tarafından gerçekleştirilir. Memelilerde, spermatogenezin spermiyogenez aşamasının ortasında transkripsiyon durmaktadır. Bu çalışmada, depo mRNA'ların translasyonel kontrollerinde görev alan ePABP ve PABPC1 mRNA'larının postnatal fare testislerinde ve izole edilen spermatogenik hücrelerdeki ekspresyon düzeyleri ile hücreyel yerleşimlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçla, postnatal hayatın farklı yaşlarında olan (6., 8., 16., 20., 29., 32. ve 88. gün) C57BL/6 ırkı erkek farelerden testisler alındı. Alınan testisler ve bu testislerden izole edilen spermatogenik hücrelerde ePABP ve PABPC1 gen ekspresyonları qRT-PCR ile belirlendi. Ayrıca, postnatal fare testislerinde RNA *in situ* hibridizasyon yöntemi ile ePABP mRNA'sının hücreyel yerleşimi de ortaya konuldu.

Çalışma sonucunda, ePABP gen ekspresyonu 6., 8., 16. ve 20. gün fare testislerinde çok düşük düzeyde olduğu gözlenirken; 29. günde yükselmeye başlamış ve 32. günde en yüksek düzeye ulaşmıştır. PABPC1 ekspresyonu ise 6. ve 8. gün testislerde düşük miktarda bulunurken; 16. günden itibaren yükselmeye başladığı ve 32. günde en yüksek düzeye ulaştığı gözlemlendi. ePABP gen ekspresyonu, 32. gün testisten elde edilen spermatogonya, spermatosit ve yuvarlak spermatidlerde diğer günlere göre daha yüksek olduğu belirlendi. ePABP sonuçlarına benzer olarak, PABPC1 ekspresyonu da 32. gün testisten elde edilen spermatogonya, spermatosit ve yuvarlak spermatidlerde diğer günlere göre daha yüksek düzeyde olduğu görüldü. Postnatal fare testislerine uygulanan RNA *in situ* hibridizasyon (RNA ISH) sonucunda ise ePABP mRNA'sının sadece seminifer tübüllerdeki spermatogenik hücrelerde sitoplazmik yerleşimli olarak belirlendi. Ayrıca, ePABP mRNA'sının 29., 32. ve 88. gün testislerin spermatogonyalarda diğer spermatogenik hücrelere göre daha yüksek düzeyde olduğu ortaya konuldu.

Bu bulgular, ePABP ve PABPC1 genlerinin fare spermatogenez sürecinde üretilen mRNA'ların translasyonel kontrollerinde görev alabileceğini göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** ePABP; PABPC1; Poliadenilasyon; Testis; Spermatogenez

## ABSTRACT

ePABP (embryonic poly(A) binding protein), functions in translational regulation of the maternal mRNAs stored during oocyte development. In the early embryos after embryonic genome activation and in the somatic cells, translational control of the mRNAs is carried out by PABPC1 (poly(A) binding protein, cytoplasmic 1). In mammals, transcription ceases at mid-spermiogenesis stage of spermatogenesis. In this study, we aimed to characterize expressional levels and cellular localizations of the ePABP and PABPC1 mRNAs in the postnatal mouse testes and isolated spermatogenic cells.

For this purpose, testes were obtained from C57BL/6 male mice at different ages of postnatal development (D6, D8, D16, D20, D29, D32 and D88). ePABP and PABPC1 gene expression in the dissected testes and isolated spermatogenic cells were detected by qRT-PCR. Also, cellular localization of the ePABP mRNA by using RNA *in situ* hybridization was revealed in the postnatal mouse testes.

As a result of this study, ePABP gene expression was found to be very low levels at D6, D8, D16 and D20 testes; it began to increase at D29 and reached the highest level at D32. While PABPC1 expression at D6 and D8 testes was observed at low levels, it started to increase at D16 and reached the highest level at D32. ePABP gene expression in the spermatogonia, spermatocytes and round spermatids derived from D32 testis was determined higher than other days. Similar to ePABP findings, PABPC1 expression in the spermatogonia, spermatocytes and round spermatids was higher than other days. It was found that ePABP mRNA was localized to only in the seminiferous tubules and exhibited cytoplasmic localizations in the spermatogenic cells of the seminiferous tubules. Also, ePABP mRNA was demonstrated to be higher particularly in the spermatogonia at D29, D32 and D88 testes.

These results show that ePABP and PABPC1 genes may function in translational control of the mRNAs transcribed during mouse spermatogenesis.

**Keywords:** ePABP; PABPC1; Polyadenylation; Testis; Spermatogenesis

## TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmam süresinde, her zaman destek olan danışman hocalarım Prof. Dr. Necdet DEMİR ve Doç. Dr. Emre SELİ'ye,

Doktora tez çalışmalarımı, Yale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'nda yapabilmem için gerekli desteği sağlayan TÜBİTAK- Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı'na (BİDEB),

Doktora tez deneylerimle ilgili değerli önerileri ve katkıları için Doç. Dr. Özlem KAYIŞLI GÜZELOĞLU, Yrd. Doç. Dr. Maria D. LALİOTI, Doç. Dr. Ümit Ali KAYIŞLI'ya, Arş. Gör. Berna SÖZEN'e ve Orkan İLBAY'a,

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalındaki tüm hocalarıma ve çalışma arkadaşlarıma,

Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına,

Yale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı çalışanlarına,

Ayrıca, sevgili eşim Zeynep BOLAT ÖZTÜRK'e, kızlarım Nehir ve Ela'ya her zaman bana destek oldukları için en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

## İÇİNDEKİLER DİZİNİ

<b>ÖZET</b>	<b>v</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>vi</b>
<b>TEŞEKKÜR</b>	<b>vii</b>
<b>İÇİNDEKİLER DİZİNİ</b>	<b>viii</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b>	<b>xi</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	<b>xiv</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b>	<b>xvi</b>
<b>GİRİŞ VE AMAÇ</b>	<b>1</b>
<b>GENEL BİLGİLER</b>	<b>3</b>
2.1. Memelilerde Erkek Üreme Sistemi	<b>3</b>
2.2. Memelilerde Testisin Gelişimi	<b>6</b>
2.3. Memelilerde Testisin Histolojik Yapısı	<b>8</b>
2.3.1. Spermatogenik Hücrelerin Yapısı ve Görevleri	<b>10</b>
2.3.2. Sertoli Hücrelerinin Yapısı ve Görevleri	<b>16</b>
2.3.3. Spermatogenezin Hormonal Kontrolü	<b>17</b>
2.4. Ökaryotik Hücrelerde Transkripsiyon	<b>19</b>
2.4.1. Spermatogenik Hücrelerde Transkripsiyon ve Translasyon	<b>21</b>
2.4.2. Spermatogenik Hücrelerde Posttranskripsiyonel Kontrol	<b>22</b>
2.5. Poly(A) Bağlanma Proteinlerinin (PABP'lar) Genel Özellikleri	<b>25</b>
2.5.1. PABP Proteinlerinin Görevleri	<b>29</b>

2.5.1.1. Memeli Testisinde PABPC1 ve PABPC2 Ekspresyonu	32
2.5.1.2. Germ Hücre ve Erken Dönem Embriyolarda ePABP Gen Ekspresyonu	36
2.6. Hipotez	37
<b>GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>39</b>
3.1. Postnatal Farelerden Testis Örneklerinin Toplanması	39
3.1.1. Postnatal Testislerden Total RNA İzolasyonu	39
3.1.2. İzole Edilen Total RNA'ya DNaz Uygulaması	40
3.1.3. cDNA (Komplementer DNA) Eldesi	41
3.1.3.1. RT-PCR Reaksiyonunun Kurulması	42
3.1.3.2. Postnatal Testisler için Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR Uygulaması	44
3.2. Postnatal Testis Dokularına RNA <i>In Situ</i> Hibridizasyon Tekniğinin Uygulanması	47
3.2.1. DIG İşaretli ePABP ve PABPC1 DNA Problarının Üretimi	50
3.2.2. Agaroz Jelden PCR Ürünlerinin Eldesi	52
3.2.3. DIG İşaretli Prob Miktarının Belirlenmesi	53
3.2.4. RNA <i>In situ</i> Hibridizasyon Uygulama Basamakları	55
3.3. Postnatal Testis Dokularında Hematoksilen-Eozin Boyaması	56
3.4. Postnatal Testislerden Spermatogenik Hücre İzolasyonu	57
3.4.1. Spermatogenik Hücrelerden Total RNA İzolasyonu	61
3.4.2. Spermatogenik Hücrelerden Elde Edilen Total RNA'ya DNaz Uygulaması	62
3.4.3. Spermatogenik Hücrelerden cDNA Eldesi	62
3.4.4. Spermatozoid ve Yuvarlak Spermatozoid Fraksiyonlarında Scp3 ve Prm2 Ekspresyonu	63
3.4.5. Spermatogenik Hücrelere Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR Uygulaması	64

<b>BULGULAR</b>	<b>66</b>
4.1. Postnatal Testislerde ePABP ve PABPC1 Ekspresyonu	67
4.2. Postnatal Testislerde Germinal Epitel Hücrelerinin Oranı	69
4.3. Postnatal Testislerde Spermatogenik Hücre İzolasyonu	71
4.3.1. Spermatozoid ve Yuvarlak Spermatozoid Fraksiyonlarında Scp3 ve Prm2 Ekspresyonu	73
4.3.2. İzole Edilen Spermatogenik Hücrelerin Canlılık Oranı	74
4.3.3. İzole Edilen Spermatogenik Hücrelerde ePABP Gen Ekspresyonu	75
4.3.4. İzole Edilen Spermatogenik Hücrelerde PABPC1 Gen Ekspresyonu	78
4.4. Postnatal Testislerde ePABP mRNA'sının Dağılımı	79
4.4.1. Ergin Fare Testisinde ePABP ve PABPC1 mRNA'larının Dağılımı	83
4.4.2. Spermatogenik Hücrelerde ePABP ve PABPC1 Ekspresyonu	83
<b>TARTIŞMA</b>	<b>85</b>
<b>SONUÇLAR</b>	<b>93</b>
<b>KAYNAKLAR</b>	<b>96</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>109</b>

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>ABP</b>	: Androjen-bağlayıcı protein
<b>AMH</b>	: Müllarian inhibe edici hormon
<b>BCIP</b>	: 5-bromo-4-klor-3-indol fosfat
<b>BSA</b>	: Bovin serum albumin
<b>cDNA</b>	: Komplementer deoksiribonükleik asit
<b>CPSF</b>	: Kesim ve poliadenilasyon özgü faktör
<b>DEPC</b>	: Dietilpirokarbonat
<b>DIG</b>	: Digoksinin
<b>DIG-UTP</b>	: Digoksinin urasil trifosfat
<b>DMEM</b>	: Dulbeco'nun modifiye Eagle'ın medyası
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik asit
<b>dNTP</b>	: Deoksinükleotid trifosfat
<b>EGA</b>	: Embriyonik genom aktivasyonu
<b>eIF3</b>	: Ökaryotik başlatıcı faktör 3
<b>eIF4A</b>	: Ökaryotik başlatıcı faktör 4A
<b>eIF4E</b>	: Ökaryotik başlatıcı faktör 4E
<b>eIF4G</b>	: Ökaryotik başlatıcı faktör 4G
<b>ePABP</b>	: Embriyonik poli(A) bağlanma proteini
<b>ePABP2</b>	: Embriyonik poli(A) bağlanma proteini 2
<b>FSH</b>	: Folikül uyarıcı hormon
<b>GNRH</b>	: Gonadotropin salgılatıcı hormon
<b>GV</b>	: Germinal vezikül

<b>Hk1</b>	: Tip 1 hegzokinaz
<b>iPABP</b>	: İndüklenebilir poly(A) bağlanma proteini
<b>kDa</b>	: Kilodalton
<b>LH</b>	: Lüteinleştirici hormon
<b>m7G</b>	: 7-metil guanozin
<b>MAB</b>	: Maleik asit tampon
<b>MACS</b>	: Manyetik hücre seçici
<b>MII</b>	: Metafaz II
<b>MSY4</b>	: Y kromozomu erkek-spesifik bölge
<b>NBT</b>	: Nitro mavisi tetrazolyum klorid
<b>PABPC1</b>	: Poli(A) bağlanma proteini, sitoplazmik 1
<b>PABPC2</b>	: Poli(A) bağlanma proteini, sitoplazmik 2
<b>PABPN1</b>	: Poli(A) bağlanma proteini nükleer 1
<b>Paip2a</b>	: PABP-ilişkili protein 2a
<b>Paip2b</b>	: PABP-ilişkili protein 2b
<b>PAM</b>	: PABP-bağlanma motifi
<b>PAPOLA</b>	: Poli(A) polimeraz alfa
<b>PARN</b>	: Poli(A) özgü ribonükleaz
<b>PBS</b>	: Fosfat tamponlu tuz solüsyonu
<b>PCR</b>	: Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>PGH</b>	: Primordiyal germ hücre
<b>Prm2</b>	: Protamin 2
<b>qRT-PCR</b>	: Kuantitatif gerçek zamanlı-polimeraz zincir reaksiyonu
<b>RNA ISH</b>	: RNA <i>in situ</i> hibridizasyon
<b>RNA</b>	: Ribonükleik asit
<b>RNP</b>	: Ribonükleoprotein partikül
<b>RRM</b>	: RNA tanıma domaini



<b>RT-PCR</b>	: Ters transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu
<b>Scp3</b>	: Sinaptonemal kompleks 3
<b>SG</b>	: Spermatogonya
<b>SRY</b>	: Y-kromozomu eşey belirleyici bölge
<b>SS</b>	: Spermatozoid
<b>SSC</b>	: Sodyum klorid-sodyum sitrat
<b>TBE</b>	: Tris borat EDTA
<b>TBF</b>	: Testis belirleyici faktör
<b>Tm</b>	: Erime sıcaklığı
<b>Tp</b>	: Geçiş proteini
<b>US</b>	: Uzamış spermatid
<b>YS</b>	: Yuvarlak spermatid

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b><u>Şekil</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
2.1. Memelilerde testis, epididimis ve vaz deferens yapısı	4
2.2. Testis ve ovaryumların gelişimi	6
2.3. Skrotum ve testisin şematize edilmiş histolojik yapısı	8
2.4. Seminifer tübül ve intertübüler alanın şematik görüntüsü	9
2.5. Spermatogenezin aşamaları	11
2.6. Hematoksilen-eozin ile boyanmış sıçan testisi	12
2.7. Spermatogenez sürecinde kromozomal düzenlenim	13
2.8. Spermiyogenezin aşamaları ve olgun spermin yapısı	15
2.9. Erkek gonadal aksın şematik gösterimi	18
2.10. Memeli dişi germ hücrelerinde translasyonel aktivasyon	20
2.11. Memeli spermatogenik hücrelerin transkripsiyonel aktiviteleri	22
2.12. Memeli spermatogenik hücrelerde translasyonel aktivasyon	24
2.13. Translasyona hazır mRNA yapısı	26
2.14. Poli(A) bağlanma protein (PABP) ailesi üyelerinin yapısı	29
2.15. Oogenez ve embriyonik gelişimde translasyonel düzenlenim	31
3.1. ePABP ve PABPC1 genlerinin birinci PCR sonuçları	50
3.2. ePABP ve PABPC1 genlerinin ikinci PCR sonuçları	52
3.3. ePABP ve PABPC1 problemlerinin miktar analizi	54
4.1. Aktin için oluşturulan standard ve qRT-PCR eğrileri	66
4.2. ePABP için oluşturulan standard ve qRT-PCR eğrileri	67

4.3.	PABPC1 için oluşturulan standard ve qRT-PCR eğrileri	68
4.4.	ePABP ve PABPC1 genlerinin RT-PCR ve qRT-PCR sonuçları	69
4.5.	Postnatal testislerde germinal epitel hücre yüzdeleri	70
4.6.	Ergin fare testisinden izole edilen spermatogenik hücreler	71
4.7.	İzole edilen spermatogenik hücrelerin HE boyanmış resimleri	72
4.8.	İzole edilen spermatogenik hücrelerin saflık oranları	73
4.9.	Scp3 ve Prm2'nin SS ve YS fraksiyonlarındaki ekspresyonları	74
4.10.	İzole edilen spermatogenik hücrelerin % canlılık oranları	75
4.11.	Aktin geni için oluşturulan standard ve qRT-PCR eğrileri	76
4.12.	ePABP geni için oluşturulan standard ve qRT-PCR eğrileri	77
4.13.	PABPC1 geni için oluşturulan standard ve qRT-PCR eğrileri	78
4.14.	İzole edilen spermatogenik hücrelerde ePABP ekspresyonu	79
4.15.	İzole edilen spermatogenik hücrelerde PABPC1 ekspresyonu	80
4.16.	Altı ve sekiz günlük testis dokusunda RNA ISH ve HE sonuçları	81
4.17.	Postnatal testis dokusunda RNA ISH ve HE sonuçları	82
4.18.	ePABP ve PABPC1'in RNA <i>in situ</i> ve qRT-PCR sonuçları	84

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b><u>Çizelge</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
3.1. DNaz uygulmasında kullanılan içerikler	40
3.2. cDNA eldesinde kullanılan içerikler	41
3.3. RT-PCR ve qRT-PCR tekniklerinde kullanılan primerler	42
3.4. RT-PCR reaksiyonu için kullanılan içerikler	43
3.5. RT-PCR için kullanılan PCR protokolü	44
3.6. qRT-PCR uygulamasında kullanılan içerikler	45
3.7. qRT-PCR ve melting curve analizinde kullanılan PCR programı	46
3.8. RNA <i>in situ</i> hibridizasyon tekniğinde kullanılan primerler	50
3.9. Prob sentezinde kullanılan içerikler ve miktarları	51
5.1. Postnatal fare testisinde germ hücre oranları	86

## GİRİŞ VE AMAÇ

Memeli germ hücreleri, erken dönem embriyolar ve somatik hücrelerde mRNA'ların translasyonel kontrollerinde, poli(A) bağlanma proteinleri görev almaktadır. Poli(A) bağlanma proteinleri, mRNA'ların 3'-ucunda bulunan poli(A) kuyruğuna bağlanarak translasyonel aktivitelerini düzenlemektedirler. Omurgalılarda, sitoplazmik PABP1 ve nükleer PABPN1 olmak üzere yapısal olarak iki farklı poli(A) bağlanma proteini bulunmaktadır. ePABP, PABPC1 ve PABPC2 proteinleri PABP1 grubunda yer alırken; ePABP2 ise PABPN1 grubunda bulunmaktadır.

ePABP [embriyonik poli(A) bağlanma proteini] ve PABPC1 [poli(A) bağlanma proteini, sitoplazmik 1] genlerinin fare ve insan oosit ile preimplantif dönem embriyolarının belli dönemlerinde, farklı düzeylerde eksprese edildikleri belirlenmiştir. Farede, ePABP geni germinal vezikül (GV) ve metafaz II (MII) aşamasındaki oositler ile zigot ve 2-hücreli embriyolarda transkribe edilirken; 4-hücre, 8-hücre ve blastosist dönemlerinde ise transkribe edilmemektedir. PABPC1 ise 8-hücreli embriyo aşamasına kadar zayıf bir ekspresyon gösterirken, 8-hücre ve blastosist dönemlerinde oldukça yüksek düzeye ulaşmaktadır. İnsanda ise GV ve MII aşamasındaki oositlerdeki ePABP mRNA düzeyi, 8-hücre ve blastosist aşamalarına göre anlamlı düzeyde daha yüksek bulunmuştur. PABPC1 ise tam tersi olarak 8-hücre ve blastosist dönemi embriyolarda GV ve MII oositlere göre anlamlı düzeyde daha fazla olduğu belirlenmiştir. Bilindiği gibi oositin mayotik olgunlaşma döneminden farede 2-hücreli; insanda ise 4-8-hücreli embriyo aşamasına kadar transkripsiyon durmaktadır. Sonuç olarak, ePABP ile PABPC1 proteinleri benzer görevleri yapmakta ve transkripsiyonel aktivitenin durmasından önce ePABP; sonrasında ise PABPC1 fazla miktarda transkribe edilmektedir. Bu durum, bu genlerinin birbirlerinin görevlerini kompanse edebildiklerini düşündürmektedir.

Memelilerde spermatogenez spermatogonya, mayoz ve spermiyogenez olmak üzere üç ana aşamadan oluşmaktadır. Spermiyogenez aşamasının ortasında, transkripsiyonel aktivite durmaktadır. Bilindiği gibi, spermiyogenez sürecinde gerçekleştirilen nükleer kondensasyon, sperm kuyruk oluşumu, akrozom gelişimi ve organellerin düzenlenimi gibi morfolojik değişimler olmaktadır. Bu morfolojik değişimler için gerekli proteinler, erken spermatogenez sürecinde transkribe edilip, depolanan mRNA'lardan sentezlenmektedir. Bu nedenle, erken spermatogenez döneminde üretilen mRNA'ların translasyonel kontrollerinde poli(A) bağlanma proteinlerine gereksinim duyulduğu düşünülmektedir. PABPC1 ve testis özgü poli(A)

bağlanma proteinlerinin (PABPC2) memeli testis dokusu ve spermatogenik hücrelerindeki ekspresyon durumu daha önceki çalışmalarda değerlendirilmiş ve translasyonel düzenlemede önemli görevleri olduğu ortaya konulmuştur.

Oosit gelişimi, fertilizasyon ve erken dönem embriyo gelişimi için gerekli olan maternal mRNA'ların translasyonel kontrolünde görev aldığı belirlenen ePABP'in, fare testis dokusundaki ve spermatogenik hücrelerdeki ekspresyon durumu ve PABPC1 ile olan ilişkisi bilinmemektedir. Hipotezimiz; ePABP ve PABPC1 genleri postnatal fare testis dokuları ve spermatogenik hücrelerde yaşa bağlı olarak farklı düzeylerde eksprese edilirler. Bu çalışmadaki amacımız; postnatal fare testis dokularında (6., 8., 16., 20., 29., 32. ve 88. günler) ve izole edilen spermatogenik hücrelerde ePABP ve PABPC1 gen ekspresyon düzeylerinin belirlenmesidir. Ayrıca, bu çalışmayla postnatal fare testis dokusunda ePABP mRNA'sının hücresel yerleşiminin belirlenmesi de hedeflenmiştir.

## GENEL BİLGİLER

### 2.1. Memelilerde Erkek Üreme Sistemi

Memeli erkek üreme sistemi testisler, yardımcı genital bezler, genital kanallar ve penisten oluşmaktadır. Yardımcı bezler Cowper'in bulboüretal, prostat ve seminal bezlerdir. Erkek genital kanalları ise düz tübüller (tubuli rekti), rete testis, efferent kanalcıkları (duktuli efferentes), epididimis (duktus epididimis), vaz deferens ve uretradan oluşmaktadır (Şekil 2.1).

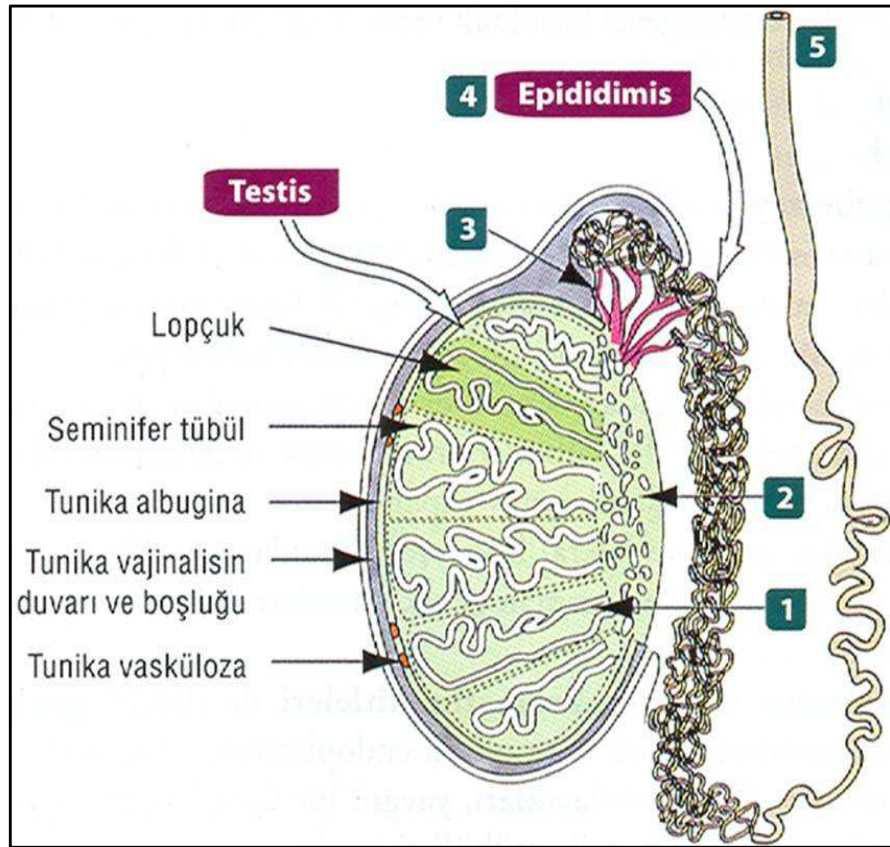
Erkek genital sistem yardımcı bezlerden olan seminal bez çifti, mesanenin arkasında yer almaktadır. En dış bölgesini bağ dokusu, ortasında düz kas tabakası ve en iç yüzeyinde ise tek katlı kübikten yalancı çok katlı prizmatikçe kadar değişen bir epitel katmanında oluşmaktadır. Früktoz, prostaglandinler ve bu beze özgü farklı proteinleri üreten seminal bezler, salgılarını seminal sıvı içine vermektedir. Bu salgılanan maddeler, sperm için enerji kaynağı olduğu gibi sperm hareketliliğini arttırıcı alkali (bazik) bir ortamda hazırlamaktadır. Seminal bezlerin salgılama fonksiyonu, testosteron ve dihidrotestosteron gibi androjenler tarafından kontrol edilmektedir [1, 2].

Tübuloalveolar bir bez tipinde olan prostat bezi ise en büyük yardımcı üreme bezi olup, içeriklerini prostatik uretraya boşaltmaktadır. Tek katlı ya da yalancı çok katlı prizmatik epitle döşeli olan bu bez, prostat-özgün asit fosfataz, prostat-özgün antijen, amilaz ve fibrinolizin salgılamaktadır. Prostat bezinin en belirgin özelliği, kalsiyum birikimine bağlı olarak oluşan ve lümenlerinde gözlenen prostatik taşlardır [1]. Cowper'in bulboüretal bezi, prostat bezinin arka-alt kısmında uretranın iki tarafında yerleşiktir. Jelatinimsi salgısı, uretranın içini kayganlaştırarak sperm hücrelerinin kolaylıkla geçmesini sağlamaktadır. Ayrıca, uretranın içinin temizlenmesine de katkı sağladığı düşünülmektedir. Semen %1'den daha az kısmını oluşturmaktadır [2].

Erkek genital kanallarının en önemli görevi üretilen erkek eşey hücresi olan spermlerin ve yardımcı bezlerin salgılarının taşınmasıdır. Seminifer tübül lümenine verilen spermler, ilk olarak düz tübüllere girmektedir. Düz tübüller, kıvrımlı seminifer tübüllerin uca doğru lümenlerinin daralması ile oluşmaktadır. Kısa segmentler şeklinde olan düz tübüller, tek katlı kübik epitel ile döşelidirler. Seminifer tübüllerdeki, Sertoli hücrelerinin bazal bölümünde bulunan tıkaçıcı bağlantılar, bu tübüllerde Sertoli hücrelerinin apikal bölgelerinde yer almaktadır. Düz tübüller, seminifer tübülleri rete testise bağlamaktadır. Rete testis, testisin mediastinum bölgesinde bulunmakta ve anastomozlaşmış kanallardan oluşmaktadır. Rete

testis, tek katlı kübik epitel ile döşenmiştir. Bu epitelde hücreler, mikrovillus ve sil yapılarını içermektedir. Epitel tabakasının etrafında ise miyoid hücreler, fibroblastlar ile kan ve lenf damarları bulunmaktadır. Sertoli hücreleri ve spermatogenik hücreler, bu kanallarda bulunmamaktadır [3, 4].

Rete testis ile epididimis arasında yer alan efferent kanalcıklar ise tek katlı prizmatik epitel ile döşenmiştir. Bu epitel silli hücreler, stereosilyalı esas hücreler ve bazal hücreleri içermektedir. Silli hücreler, hareketsiz olan spermlerin epididimise iletiminde görev alırken; stereosilyalı esas hücreler ise kanalcıkların lümenindeki sıvının emilmesinde rol oynamaktadırlar. Bazal hücrelerin bu iki hücre tipi için kaynaklık yaptığı düşünülmektedir. Epitel tabakasının hemen altında yer alan bazal laminayı ince bir iç dairesel düz kas tabakası çevrelemektedir. Efferent kanalcıkların, epididimis ve diğer erkek üreme kanallarından en belirgin yapısal farkı ise epitelin taraklı bir görüntüye sahip olmasıdır [3, 4].



**Şekil 2.1.** Memelilerde testis, epididimis ve vaz deferens yapısı. 1: düz tübüller (tubuli rekti), 2: rete testis, 3: efferent kanalcıklar, 4: epididimis, 5: vaz deferens bölgelerini göstermektedir. Bu şekil, [1] nolu kaynaktan alındı.

Epididimis, spermlerin hareket özelliği kazandıkları ve olgunlaştıkları en önemli erkek genital kanalıdır. Bu kanal, farede 1 m insanda ise yaklaşık 3-6 metre uzunluğunda oldukça kıvrımlı bir yapıdadır. Epididimis, baş (kaput), gövde (korpus) ve kuyruk (kavda) olmak üzere üç anatomik

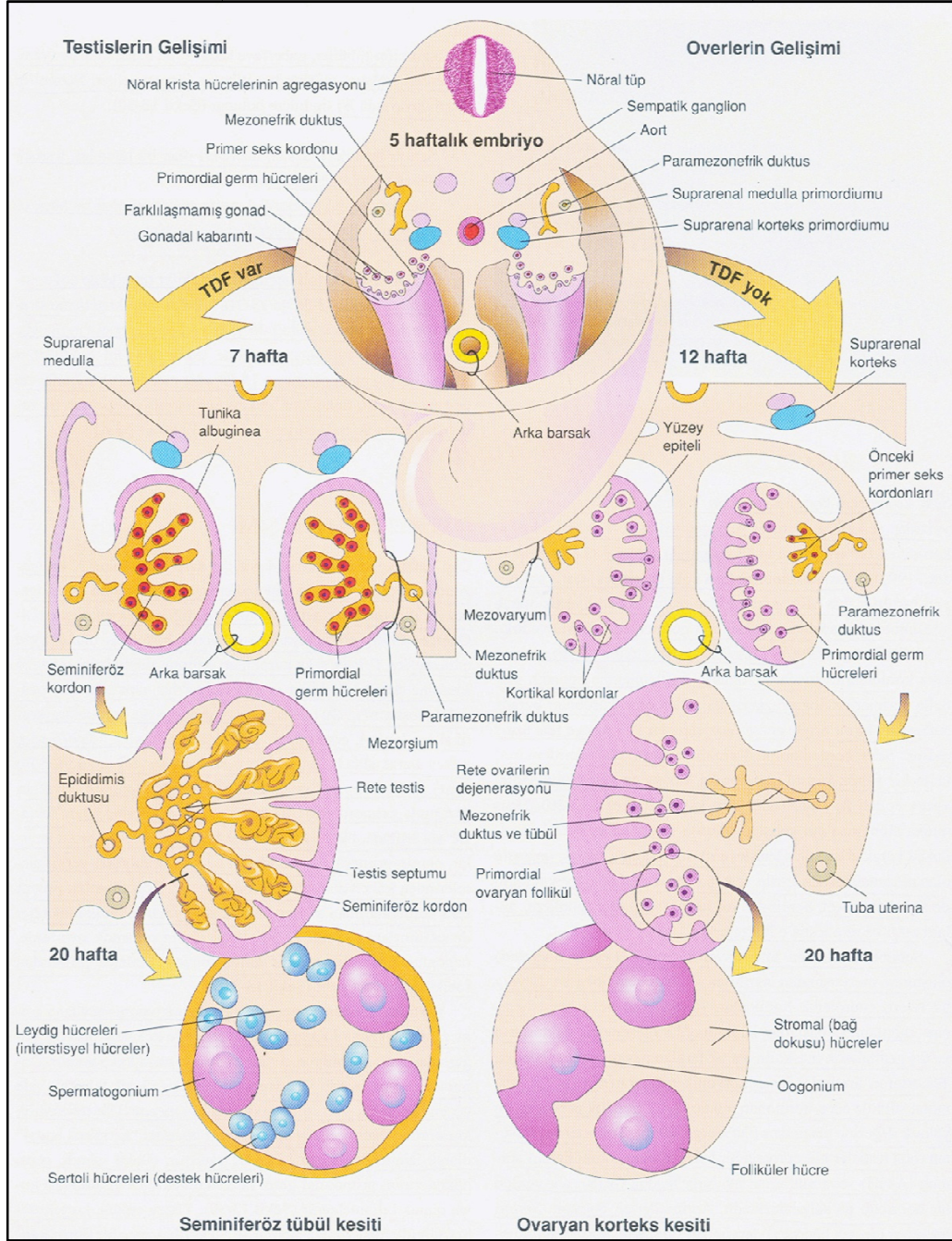


bölümden oluşmaktadır. Epididimis lümenini sterosilyalı yalancı çok katlı prizmatik epitel hücreleri döşemektedir. Epitelini sterosilyalı esas hücreler, bazal hücreler ve diğer hücre tipleri (apikal ve holo hücreler gibi) oluşturur. Esas hücreler, bazal laminadan lümeneye kadar uzanmakta ve dallanmış sterosilya ile iyi gelişmiş Golgi aparatı, lizozomlar ve veziküller içermektedir. Bu özellikler, bu hücrelerin salgılama ve emilim işlemlerinde görevli olduğunu göstermektedir. Bazal lamina üzerine oturan, fakat lümeneye ulaşmayan bazal hücrelerin ise esas ve diğer hücrelere kaynaklık ettiği kabul edilmektedir. Epididimiste bulunan diğer hücre tipleri ise apikal ve berrak hücrelerdir. Apikal hücreler mitokondriyonlardan zengin olup, epididimisin baş bölgesinde bulunmaktadır. Berrak hücreler ise daha çok epididimisin kuyruk bölgesinde yerleşim gösterirler. Ayrıca, epididimis kanalı boyunca immünolojik reaksiyonlarda görev alan intraepiteliyal lenfositlerde bulunmaktadır. Epitel ve altındaki bazal lamina, düz kas hücreleri tarafından çevrelenmektedir [2, 4].

Vaz deferens, epididimis ile penil üretrayı birbirine bağlamaktadır. Bu kanal tunika mukoza, tunika müskülaris ve tunika adventisya tabakalarından oluşmaktadır. Tunika mukoza, sterosilyalı yalancı çok katlı kübik ya da prizmatik epitel ve altındaki gevşek bağ dokudan oluşmaktadır. Epitelin hemen altında içte uzunlamasına, ortada dairesel ve dışta uzunlamasına düzenlenmiş düz kas tabakası bulunur. En dışta ise gevşek bağ dokusundan oluşan tunika adventisya yer alır. Vaz deferensin açıldığı erkek üretrası 20 cm uzunluğunda olup; prostatik, membranöz ve penil üretra olmak üzere üç ana bölgeden oluşmaktadır. Prostatik üretranın epiteli, değişici epitel (üroepitelyum); penil üretra ve membranöz üretra epiteli ise yalancı çok katlı veya çok katlı prizmatik epitelidir. Her üç bölgenin epitel katmanı altındaki bağ dokudan sonra, düz kas tabakası ve en dışta ise tunika adventisya bulunmaktadır. Membranöz üretra, düz kas tabakası dışında çizgili kastan oluşan bir sifinkterde içerir [3, 4].

Erkek genital organlarından olan penis ise iki adet korpus kavernozum ve bir adet korpus spongiyozum olarak tanımlanan erektil doku kitlelerine sahiptir. Bu doku kitleleri, sıkı bağ dokusu yapısında olan tunika albuginaya ile çevrilidir. Bu erektil dokularda, arter ve venöz damarlara boşalan çok sayıda kan boşlukları ya da sinüzoidler bulunmaktadır. Penis, en dıştan epidermis ile dermis tabakalarından oluşan deri ve onun altındaki elastik bağ dokusu özelliğindeki fasya ile çevrelenmiştir [4].

Erkek sperm hücresinin üretim işlemlerinin bütünü anlamına gelen spermatogenezin gerçekleştiği ve testosteron gibi önemli hormonlar ile moleküllerin sentezlendiği erkek genital organı ise testislerdir. Testisler, karın boşluğunun dışında skrotum olarak adlandırılan bir kese içinde iki adet olarak yer almaktadır. Testislerin bu yerleşimleri, spermatogenez için uygun sıcaklık olan 34-35 °C'yi sağlamaktadır. Testisin arka yüzü epididimis ile ilişki içinde olup, spermatik kordonla asılı olarak bulunmaktadır. Spermatik kordon içinde testis ve epididimis dışında vaz deferens, spermatik arter ve ven ile lenfatik pleksuslar da bulunmaktadır [3, 4].



**Şekil 2.2.** Testis ve ovaryumların gelişimi. İnsan gelişiminin 5-20. haftalar arasındaki süreçte, seminifer kordonların ve genital kanalların gelişim dönemleri görülmektedir. Ayrıca, seminifer tübüllerde germinal epitelyumun (spermatogonyum ve Sertoli hücreleri) ve tübüller arası bölgede bulunan Leydig hücreleri oluşumu gözlenmektedir. Bu şekil [5] nolu kaynaktan alınmıştır.

## 2.2. Memelilerde Testisin Gelişimi

Testisler, embriyolojik olarak arka karın duvarını döşeyen mezotel (mezodermal epitel), bu mezotelin altındaki mezenşim (embriyonik bağ dokusu) ve primordiyal germ hücreleri tarafından oluşturulmaktadır.

Genel olarak testislerin gelişimi farkanmamış ve farklılaşmış gonadların gelişimini içeren iki ayrı aşamada değerlendirilmektedir. Farklaşmamış gonadların gelişimi (insanda 5. haftada başlamaktadır): mezonefrozun orta hattındaki mezotelin ve altındaki mezenşimin çoğalması ile mezonefrozun orta hattında gonadal bir kabartı oluşur. Gonadal kabartıda beliren epitelyal kordonlar, alttaki mezenşim içine parmaklı uzantılar verirler. Böylece, farklılaşmamış gonada dışta korteks içte medulla olmak üzere iki bölge ayırt edilebilmektedir. Eğer embriyo XY genotipine sahip ise medulla bölgesi testise farkanırken, korteks ise gerilemektedir. Embriyo genotipinin XX olması durumunda farkanmamış gonadın korteksi ovaryumları oluştururken; medulla bölgesi gerilemektedir (Şekil 2.2) [5, 6].

Erkek germ hücresi olan spermin kökeni olan primordiyal germ hücreler (PGH'ler), insanda 4. haftada vitellus kesesi duvarındaki endoderm hücreleri arasında yuvarlak hücreler olarak ortaya çıkarlar. Embriyonun katlanması sırasında, vitellus kesesinin dorsal parçası embriyo içerisine dahil olur. Bu süreçte, PGH'ler arka bağırsağın dorsal mezenteriy boyunca gonadal kabartıya göç etmektedirler. İnsanda 6. haftada, PGH'ler mezenşim içine girerek gonadal kordonlara katılırlar. İnsanda yedinci haftaya kadar dişi ve erkek gonadların genel görüntüleri birbirlerine benzerler, bu nedenle bu haftaya kadarki gonadlara farklılaşmamış gonadlar adı verilmektedir. Bu haftadan sonra, erkek fenotipinin gelişmesi için Y-kromozomunun kısa kolunda yerleşik olan SRY geni tarafından testis belirleyici faktör (TBF) üretilir. TBF'nin etkisi ile gonadal kordonlar seminifer kordonlara farkanırlar. Seminifer kordonlar, seminifer tübüllerin ilkel şeklini oluştururken [5]; TBF, gonadal kordonların medullanın derinlerine doğru uzanmasını da uyarır. Medullanın derinlerine uzanan kordonlar, dallanıp birbiriyle anastomozlar yaparak rete testis yapısını oluştururlar. Fibröz bir kapsül özelliğinde olan tunika albugineanın gelişimi ile seminifer kordonların yüzey epiteli ile olan ilişkisi ortadan kalkmaktadır. Seminifer kordonların bir bölümü, gelişimin ilerleyen dönemlerinde seminifer tübüllere, tubuli rekti ve rete testis yapılarına farkanmaktadır (Şekil 2.2) [5, 6].

Seminifer tübüller arasında bulunan mezenşim, Leydig hücreleri olarak bilinen interstisyel hücreleri oluşturur. İnsanda 8. haftadan itibaren Leydig hücreleri testosteron ve androstenedion hormonlarını salgılamaya başlamaktadır. Bu androjenik hormonlar mezonefrik kanalların ve dış genital kanalların erkek yönünde farklılaşmasını sağlamaktadır. Ayrıca, Sertoli hücreleri tarafından üretilen antimüllerian hormon da, paramezonefrik kanalların uterus ve tuba uterinaya farklılaşmasını baskılamaktadır [5].

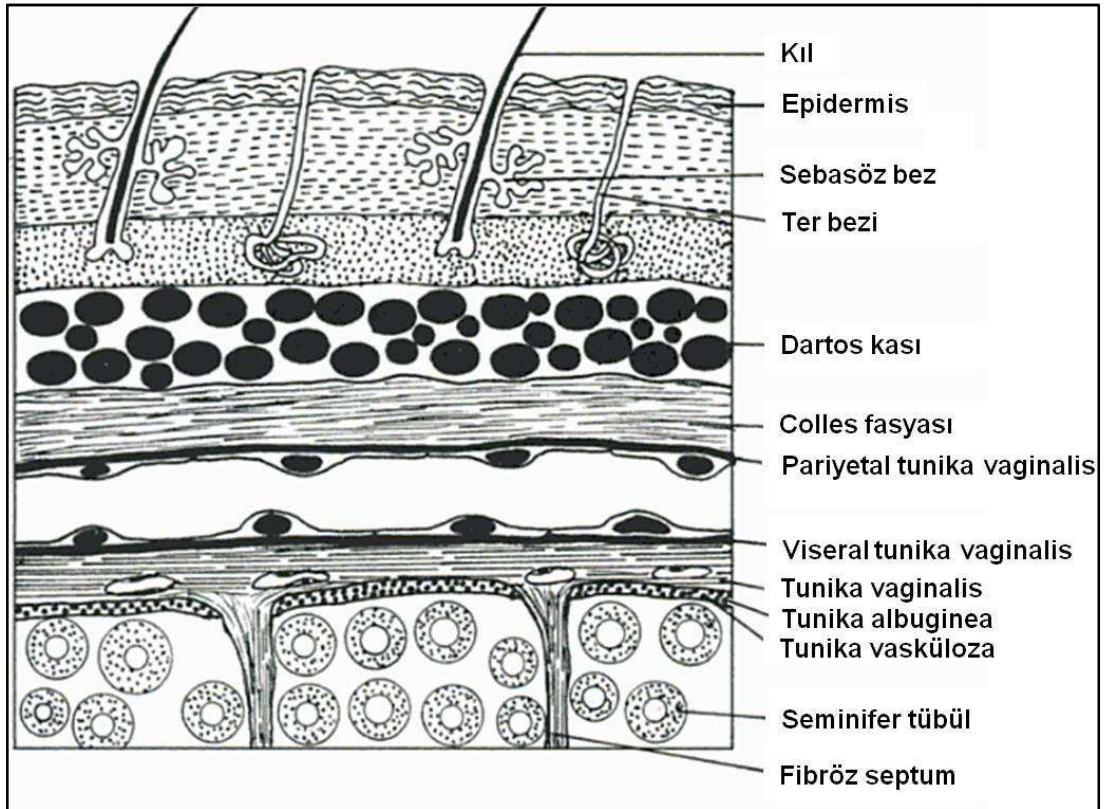
Embriyolojik gelişim sürecinde karın boşluğunun arka duvarında retroperitoneal olarak gelişen testisler, insanda 26. haftada inguinal kanala doğru ilerler. Testislerin inguinal kanal boyunca inişinde testosteron hormonu rol oynamakta ve bu işlem 2-3 gün sürmektedir. Spermatik kordonların ucunda asılı olarak skrotuma inen testisler, periton ve tunika vaginalisin viseral tabakasını içeren seröz bir örtü ile çevrilidir [6]. Ergenlik dönemine



girilmesiyle seminifer tübüllerde, ergenlik dönemine girilmesi birlikte lümen oluşumu gözlenir. Bu dönemde tübüllerin duvarında, yüzey epitelinden gelişen Sertoli hücreleri ve PGH'lerden köken alan spermatogonya bulunmaktadır. Fetal ve erken postnatal gelişim dönemlerinde Sertoli hücre sayısı, spermatogonyaya göre oldukça fazladır [6].

### 2.3. Memelilerde Testisin Histolojik Yapısı

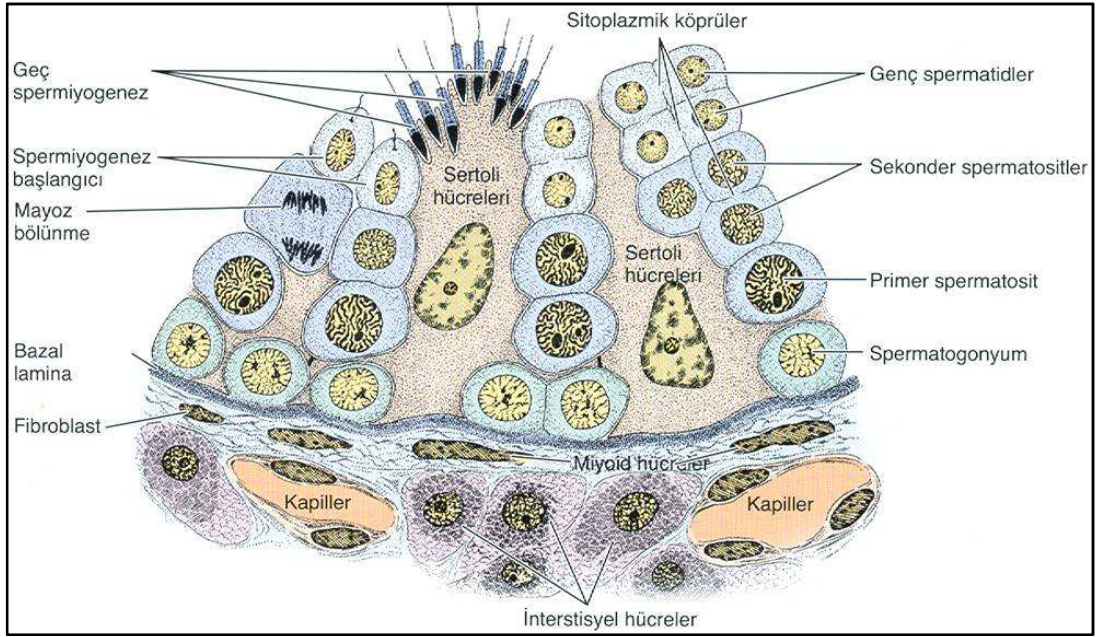
Testisler, skrotum adı verilen bir kese içinde yer almaktadır. Skrotum, deri yapısında olup; memelilere göre değişebilen kalınlığa sahip epidermis ve dermis kısımlarından oluşmaktadır [7].



**Şekil 2.3.** Skrotum ve testisin şematize edilmiş histolojik yapısı. Skrotum epidermis, dermis, dartos kası, Colles fasyası ve tunika vaginalisin pariyetal tabakalarını içermektedir. Tunika vaginalisin viseral tabakası testisi en dıştan çevrelemektedir. Bu şekil [7] nolu kaynaktan alınmıştır.

Dermis tabakasında yağ bezleri, kıl folikülleri ve ter bezleri yer almaktadır. Subdermal alanda ise dartos kası olarak tanımlanan rastgele dağılmış düz kaslar bulunmaktadır. Dartos kas tabakasından sonra gelen yapı ise fibrokollajen yapısındaki Colles fasyası yer almaktadır. Colles fasyasının iç kısmı sıkı bir şekilde paketlenerek tunika vaginalisin pariyetal tabakasını oluşturmaktadır. Tunika vaginalisin pariyetal ve viseral tabakalarının aradaki boşluğa bakan yüzeyleri mezotelle döşenmiştir (Şekil 2.3) [7].

Hem endokrin hem de ekzokrin salgılayan bir bez olan testisler, en dıştan tunika albuginea adı verilen düzenli sıkı bağ dokusu yapısında fibroelastik bir kapsül ile çevrilidir. Bu kapsülün hemen altında, içinde çok sayıda kan damarı bulunan gevşek (areolar) bağ dokusu olan tunika vasküloza tabakası yer almaktadır. Bu tabaka testisin iç bölgelerine girerek, seminifer tübüller arasında bulunan interstisyel bağ dokusunu oluşturmaktadır. Tunika albuginea, testisin arka yüzünde kalınlaşarak mediastinum testis adı verilen bölgeyi oluşturmaktadır. Mediastinum testis içinde düzensiz boşluklar şeklinde rete testis yapısı yer almaktadır [8].



**Şekil 2.4.** Seminifer tübül ve intertübüler alanın şematik görünümü. Seminifer tübül, spermatogenezin farklı aşamadaki spermatogenez hücreleri (spermatogonyumlar, spermatozidler, yuvarlak spermatozidler ve uzayan/uzamış spermatozidler) içermektedir. İntertübüler alanda Leydig hücreleri, fibroblastlar ile diğer bağ dokusu hücre ve bileşenleri görülmektedir. Bu şekil [8] nolu kaynaktan alınmıştır.

Mediastinum testisten, testis içine doğru giren uzantılar testisi testiküler lopçuklara/bölmelere ayırmaktadır. Her bir testiste yaklaşık 250 adet bulunan bu lopçuklar, birbirleriyle bağlantılıdır. Her bir lopçukta, gevşek bağ dokusu ile çevrelenmiş 1-4 adet seminifer tübül bulunur. Seminifer tübüller, her bir testiste yaklaşık 250-1000 kadar olup; her birinin çapı 150-250  $\mu\text{m}$ , uzunluğu ise 30-70 cm olan tüp şeklindeki kıvrıntılı yapılardır. Her bir testisteki tübüllerin toplam uzunluğu yaklaşık 250 metredir.

Çok katlı germinal (seminifer) epitelden oluşan seminifer tübüller, bazal lamina ve fibröz bir bağ dokusu ile sarılmıştır. Tunika propria olarak bilinen bu fibröz bağ doku kılıfı, birkaç sıra halindeki fibroblast tabakası, kollajen lifler ve bazal laminaya yapışık olan miyoid hücrelerinden oluşmaktadır (Şekil 2.4). Kasılma özelliğine sahip olan miyoid hücrelerin

ritmik kasılma aktiviteleri, hareketsiz olan spermilerin rete testise geçişlerini sağlamaktadır [2, 4].

Tübüller arası alanda bulunan gevşek bağ dokusunda ise çok sayıda kan ile lenf damarı, bağ dokusu hücreleri, sinirler, sinüzoidler, Leydig hücreleri (interstisyel hücreler) ve diğer bağ dokusu elamanları yer almaktadır (Şekil 2.4). Burada kan damarlarından olan kılcal damarlar, pencere tiptedirler. Gevşek bağ dokusu hücrelerinden fibroblastları, makrofajları, mast hücreleri ve diğer bağ dokusu hücrelerini içerir [8].

Leydig hücreleri, ergenlik döneminde daha fonksiyonel bir hale gelmekle birlikte; prenatal gelişim sürecinde de testosteron sentezini gerçekleştirir. Bu hücreleri, eksentrik duruşlu yuvarlak nükleusları ve eozinofilik boyanan sitoplazmik yapıları ile histolojik boyamalarda kolaylıkla ayırt edilebilmektedir. Leydig hücreleri, düz endoklazmik retikulum ve mitokondrilerinde bulunan enzimlerle testosteron gibi steroid hormonları sentezleyebilmektedir. Bilindiği gibi, testosteron hormonu normal spermatogenezin devamlılığı, gonadotropin salgılanmasının kontrolü ve cinsiyet farklılaşmasında rol oynamaktadır [8].

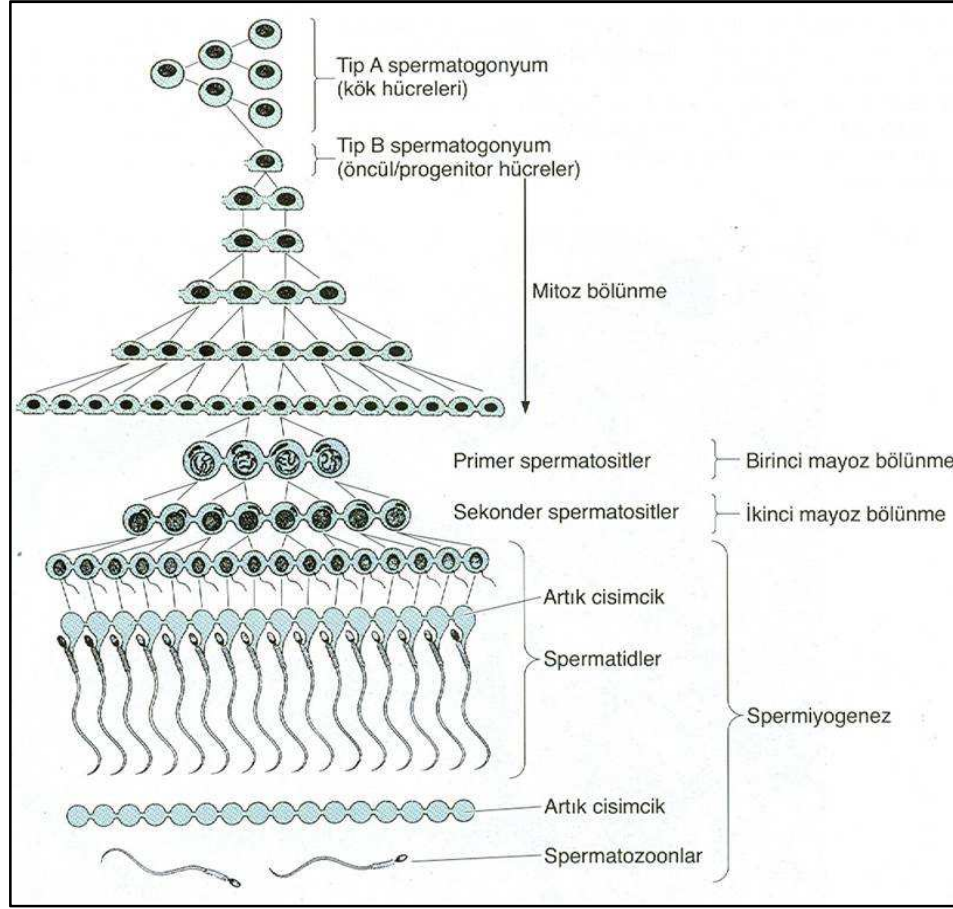
Seminifer tübülleri oluşturan germinal epitel ya da seminifer epitel, Sertoli hücreleri (sustentaküler hücreler) ve spermatogonik hücreler (spermatogonyum, spermatosit, yuvarlak spermatid ve uzamış spermatid) olmak üzere iki hücre grubu içermektedir. Sperm hücrelerinin üretiminden sorumlu olan germinal epitel, 4-8 hücre tabakasından oluşmaktadır (Şekil 2.4).

### **2.3.1. Spermatogonik Hücrelerin Yapısı ve Görevleri**

Spermatogonik hücreler tarafından belli zaman dilimlerinde çeşitli hormonların kontrolü altında spermilerin üretim sürecine spermatogenez adı verilmektedir. Ergin bir memelide, bu sürecin sonucunda günde yaklaşık  $2 \times 10^8$  adet sperm hücresi üretildiği tahmin edilmektedir.

Spermatogenez mitoz bölünme, mayoz bölünme ve spermiyogenez olmak üzere üç farklı evreden oluşur. Spermatogonyalarda meydana gelen mitotik bölünmeler bazal kompartmanda olurken, mayoz ve spermiyogenez evreleri ise adluminal kompartmanda meydana gelmektedir (Şekil 2.5). Bu üç evre insanda yaklaşık 74 günde tamamlanmaktadır [9].

Farede, insana göre daha kısa süren spermatogenez, toplamda 35 günde gerçekleşmektedir. Farelerde mitotik evre yaklaşık 11 gün, mayotik evre yaklaşık 10 gün, spermiyogenez ya da postmayotik evre ise yaklaşık 14 günde tamamlanmaktadır [10]. Farelerde spermatogenez süreci ortalama 8-9 günde bir başlamaktadır. Spermatogenez evrelerinin sürelerinde fare türlerine göre küçük farklılıklar olabilmektedir [8, 11].

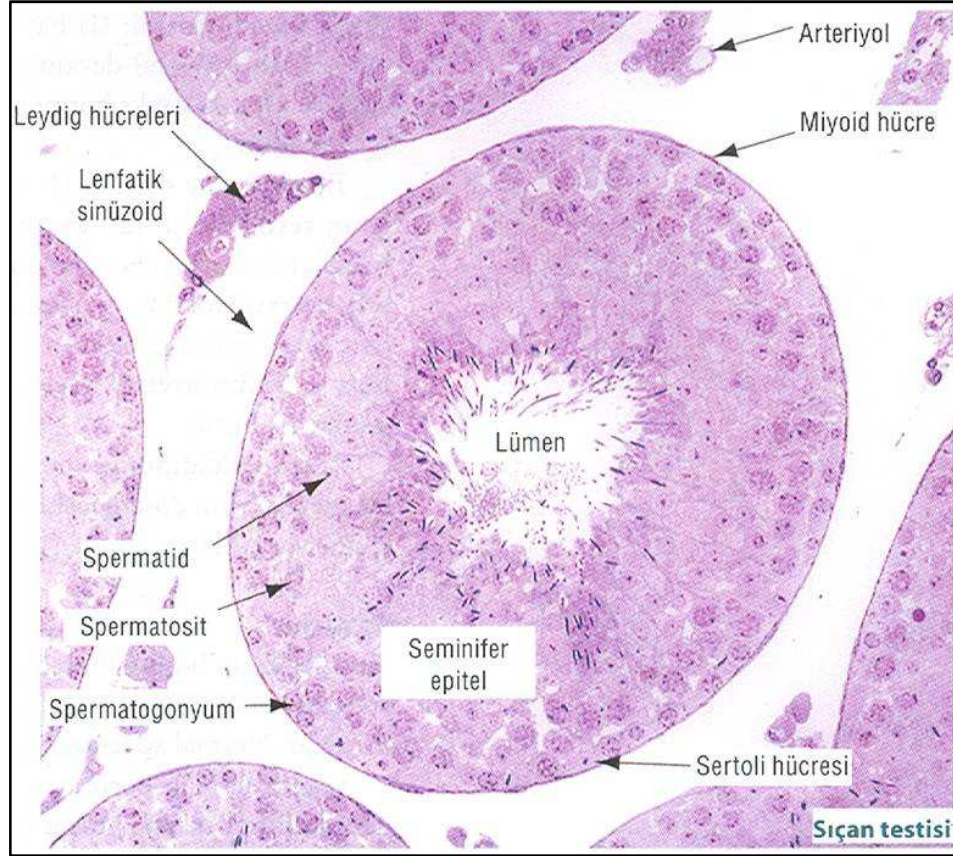


**Şekil 2.5.** Spermatogenezin aşamaları. Spermatogonyal hücreler, çok sayıda mitotik bölünme geçirmektedir. Primer ve sekonder spermatositler ise sırasıyla birinci ve ikinci mayoz bölünmelerini geçirmektedir. Spermiyogenez giren yuvarlak spermatidler, olgun spermleri oluşturmaktadır. Bu şekil [8] nolu kaynaktan alınmıştır.

Spermatogenez evrelerinden ilki olan mitotik evrede, spermatogonyal kök hücreler yoğun bir şekilde prolifer olmaktadır. En az farklılaşmış germ hücre tipi olan spermatogonyalar, yaklaşık 12  $\mu\text{m}$  çapındadır. Bazal kompartmanda bazal laminanın hemen üzerinde yer alan bu hücreler, Sertoli hücreleri tarafından çevrelenmektedir. Hematoksilen-Eozin ile boyandıklarında koyu boyanmış çekirdeklerinin etrafında daha açık boyanmış bir alana sahiptirler (Şekil 2.6). İnce sitoplazmik köprülerle birbirlerine bağlı tip A spermatogonyalar, soluk ve koyu olarak iki gruba ayrılmaktadır. Koyu tip A spermatogonyaların, kök hücre özelliğinde oldukları kabul edilmektedir. Çünkü bu hücreler, erişkin hayat boyunca çoğalabilme, kendilerini yenileyebilme, farklılaşan spermatogenik hücreleri oluşturabilme ve yaralanma durumunda hızla çoğalma potansiyeline sahiptirler. Kanser tedavilerinde kullanılan gonadotoksik etkenler (kemoterapi ve radyo terapi gibi) ve genetik faktörler bu hücreleri etkileyerek infertiliteye neden olabilmektedir. Tip A spermatogonyaların farklılaşması ile oluşan tip B spermatogonyalar, tip A'lara göre daha fazla farklılaşmış ve mayozla girmeye yönelmiş progenitör hücrelerdir [12]. Spermatogonyalar arasında kurulan



sitoplazmik köprüler, sperm oluşumuna kadar tüm spermatogenez hücrelerinin arasında da gözlenmektedir. Bu köprülerin spermatogenez sürecinin senkronize bir şekilde gerçekleşmesini sağladığı düşünülmektedir. Tip B spermatogonyalar, son mitotik bölünmelerinin ardından primer spermatozidlere farklılaşmaktadır [8].

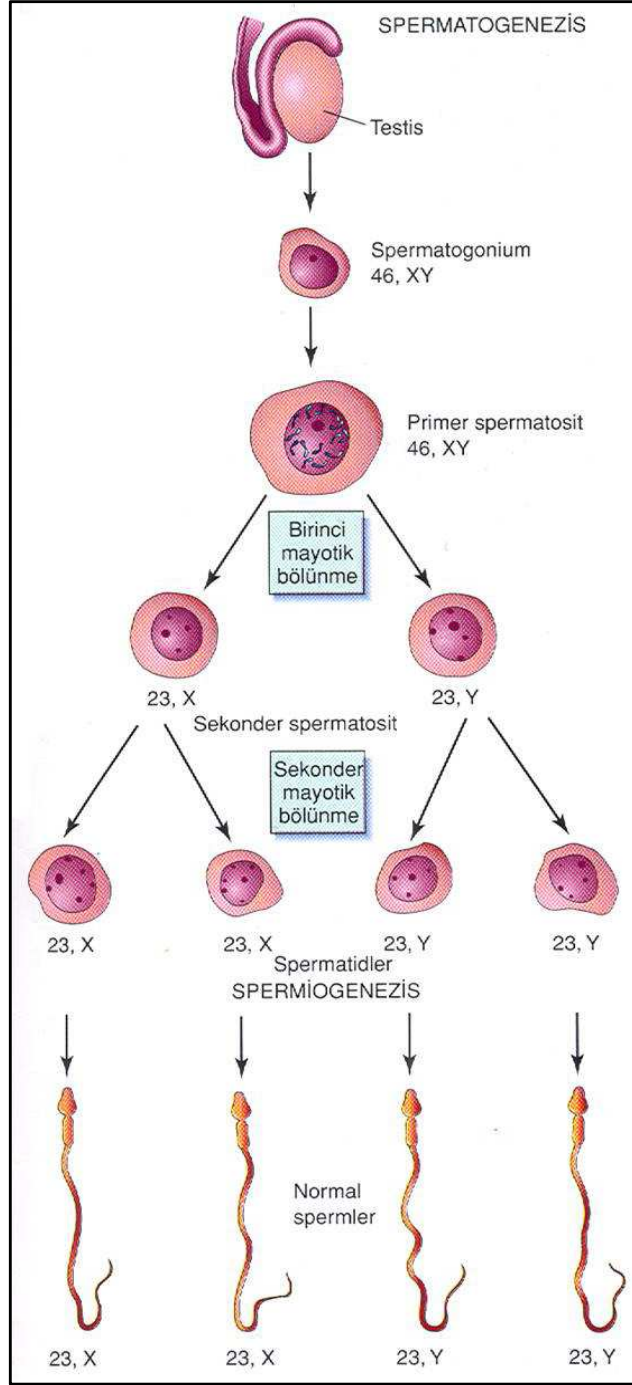


**Şekil 2.6.** Hematoksilen-Eozin ile boyanmış sıçan testisi. Seminifer tübül epiteli, başlıca spermatogenez hücreleri ve destek hücreleri olan Sertoli hücrelerinden oluşmaktadır. İntertübüler alanda ise Leydig hücreleri, bağ dokusu hücreleri ile lenfatik ve kan damarları bulunmaktadır. Bu şekil, [1] nolu kaynaktan alınmıştır.

Primer spermatozidler, interfazın S-fazında DNA sentezi gerçekleştirerek, DNA miktarını  $4n$ 'e çıkarmaktadırlar. G2 fazının ardından bu hücreler fareden yaklaşık 10 gün süren birinci mayoz bölünmeye girerler. Birinci mayozun profaz safhası leptoten, zigoten, pakiten, diploten ve diakinez evrelerinden oluşmaktadır [8].

Profaz, spermatogenezin en uzun süren aşaması olup, insan da yaklaşık 22 günde tamamlanmaktadır. Profazın alt evrelerinde, homolog kromozomlar eşleşmektedir. Homolog kromozomların eşleşmesi sürecinde kardeş olmayan kromatidler arasında genetik madde değişimi gerçekleştirilmektedir. Bu genetik madde değişimi crossing-over olarak adlandırılmaktadır. Crossing-over ile spermatogenez sürecinde üretilen spermilerin farklı genetik kombinasyonlara sahip olması sağlanmaktadır [8].





**Şekil 2.7.** Spermatogenez sürecinde kromozomal düzenlenim. Testiste, seminifer tübüllerin bazal bölgesinde bulunan spermatogonyalar primer spermatozitlere farklılaşmaktadır. Primer spermatozoidlerden mayoz bölünme sonucunda sekonder spermatozoid ve spermatozoidler oluşmaktadır. Morfolojik değişimler geçiren spermatozoidler de, haploid sayıda kromozoma sahip olan sperm hücrelerini oluşturmaktadır. Bu şekil, [5] nolu kaynaktan alınmıştır.

Primer spermatozoidlerde profaz aşaması uzun sürdüğü için histolojik kesitlerde görülen spermatozoidlerin çoğunluğu bu tiptedir. Spermatogonik hücrelerin en büyüğü olan primer spermatozoidler, belirgin kromozomal yapıları

ile diğ er hücrelerden kolaylıkla ayırt edilebilmektedirler. Bu hücreler, profaz aşamasında crossing-over ile genetik bilgi değışimi gerçekleştirmektedirler. Birinci mayozun profaz aşamasından sonra metafaz, anafaz ve telofaz evrelerini geçiren primer spermatozidler, sekonder spermatozidler oluşturmaktadır [8].

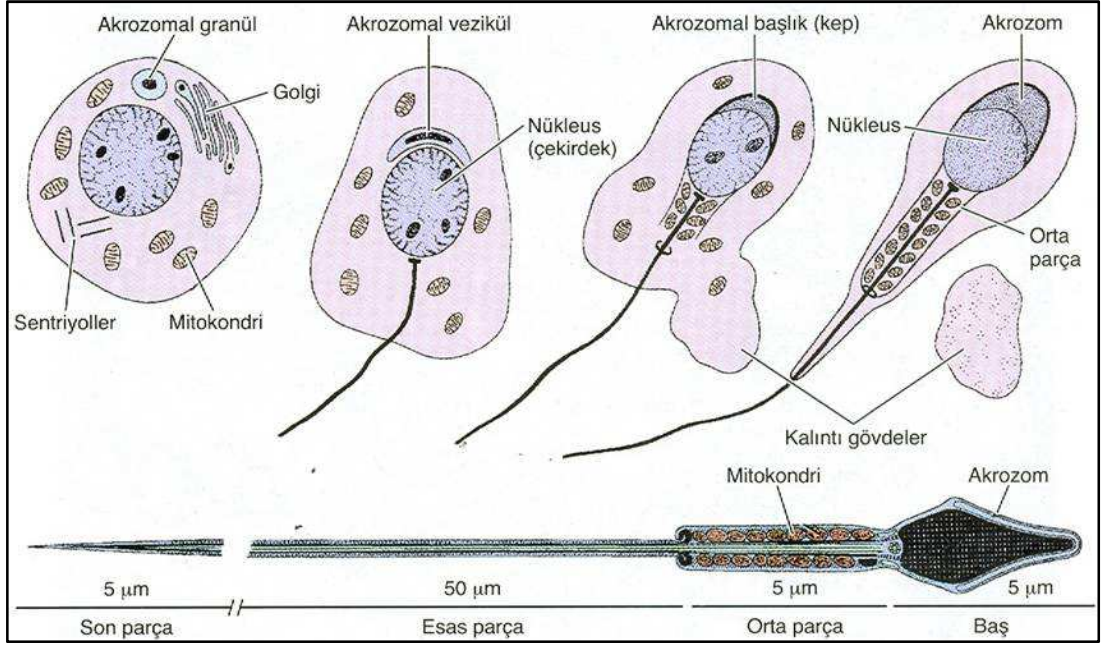
Birinci mayoz bölünme ile kromozom sayısı yarıya düştüğü için, sekonder spermatozidler 22+X veya 22+Y içerikte haploid sayıda kromozom (23 kromozom) içeren küçük hücrelerdir. Bu hücrelerin DNA miktarı ise 4C'den 2C'ye düşmektedir. Sekonder spermatozidler, interfaz aşamasında çok kısa kalmakta ve DNA sentezi (S-fazı) gerçekleştirmemektedirler. Hızlı bir şekilde ikinci mayoz bölünmeye giren sekonder spermatozidler, testis kesitlerinde görülmeleri oldukça zordur (şekil 2.7) [8].

İkinci mayoz bölünme aşamasına giren sekonder spermatozidler profaz, metafaz, anafaz ve telofaz bölünmeleri geçirerek; 4 adet yuvarlak spermatid oluşturmaktadır (şekil 2.7). Yuvarlak spermatidler, 7-8 µm çapında olmaları ve çekirdeklerindeki yoğunlaşmış kromatin bölgeleri ile ayırt edilebilmektedir. Bu hücreler, seminifer tübül lümenine yakın yerleşmektedirler. Yuvarlak spermatidler, hem kromozom (1 N) hem de DNA miktarı (1 C) açısında haploiddirler. Spermatozidler ve yuvarlak spermatidler adluminal kompartmanda yer alırken; uzayan spermatidler Sertoli hücrelerinin lümenine bakan yüzlerindeki kriptalarda bulunmaktadır. Yuvarlak spermatidler, spermatogenezin önemli bir farklılaşma aşaması olan spermiyogenez sürecine girmektedirler [8, 12].

Spermiyogenez sürecinde kamçı gelişimi, akrozom gelişimi, fazla sitoplazmanın atılması ve nüklear yoğunlaşma gibi morfolojik değışimler meydana gelmektedir. Spermiyogenez, üç evrede incelenmektedir (şekil 2.8):

**Golgi evresi:** Yuvarlak spermatidin sitoplâzmasında belirgin bir Golgi kompleksi, mitokondri, bir çift sentriyol, serbest ribozomlar ve düz endoklazmik retikulum bulunmaktadır. PAS (periyodik asit çift) pozitif boyanan küçük proakrozomal granüller, çekirdeğe yakın yerleşmiş Golgi komplekslerinde birikir. Bu Golgi kompleksleri daha sonra birleşerek, zarla çevrili tek bir akrozom granülünü oluşturur [8].

Bu arada, akrozomun tam karşı tarafına göç eden distal sentriyol, kamçı aksonemini oluşturmaya başlar. Genel olarak kamçı, keratin içeren dış yoğun lifler ve fibröz bir kılıf ile çevrili bir aksoneme (9 + 2 mikrotübül diziliminde) sahiptirler. Bu arada, aksonem etrafında mitokondriyonlar sarmal bir yapı oluşturmaya başlamaktadır [8].



**Şekil 2.8.** Spermiyogenezin aşamaları ve olgun sperm yapıları. Spermiyogenez golgi fazı, akrozomal ve olgunlaşma evrelerinden oluşmaktadır. Olgun bir sperm baş, boyun ve kuyruk bölümlerinden oluşmaktadır. Bu şekil, [8] nolu kaynaktan alınmıştır.

**Akrozomal evre:** Akrozom granülü, sıkıca paketlenen çekirdeğin ön yarısını kaplayacak şekilde genişler. Bu aşamadan sonra bu yapı, akrozom olarak tanımlanmaktadır. Akrozom içinde nöraminidaz, hiyaluronidaz, akrozin, asit fosfataz ve diğer hidrolitik enzimler bulunmaktadır. Akrozom, çok sayıda sindirici enzim içermesi nedeniyle lizozom organeline benzerlik göstermektedir. Akrozomal enzimlerin, oositi çevreleyen kumulus hücrelerinin birbirlerinden ayrılmasında ve zona pellusidanın yıkımında etkin oldukları düşünülmektedir. Sperm oosit ile karşılaşması durumunda akrozom zarı ile sperm hücre membranı kaynaşmakta ve akrozom içeriği hücre dışına verilmektedir. Bu olay, akrozomal reaksiyon olarak tanımlanır. Spermiyogenezin bu evresinde spermatid yön değiştirmektedir. Böylece, aksonem seminifer tübül lümenine doğru uzanır. Bu dönemde spermatid çekirdeği uzar ve daha sıkı paketlenmiş bir hal alır. Kamçı oluşumu ile birlikte mitokondriler, kamçı etrafından sarmal bir şekilde düzenlenerek kuyruk orta parçasını oluşturmaktadır. Bu bölgeden, sperm hareketi için gerekli olan enerji üretilerek; sperm oosite ulaşması sağlanır [8, 12].

**Olgunlaşma evresi:** Bu aşamada çekirdek geniş ölçüde yeniden düzenlenmekte ve sıkı bir şekilde paketlenmektedir. Çekirdek yoğunlaşması, somatik histonların (H1, H2A, H2B ve H4) arjinin ve lizince zengin protaminlerle yer değiştirmesiyle meydana gelmektedir. Sperm nüklear genomunun sıkı bir şekilde kondense edilmesi, transkripsiyonel aktivitenin büyük ölçüde durmasına neden olmaktadır. Olgunlaşma evresinde, uzayan/uzamış spermatid hücreleri arasındaki sitoplazmik köprüler yıkılmaya

başlamaktadır. Fazla sitoplazmanın atılması ile olgun spermier oluşturulmaktadır. Atılan sitoplazmik artıklar ise Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilerek ortamdaki uzaklaştırılmaktadır. Olgun spermier, epididimise testis sıvısı olarak adlandırılan bir sıvı içinde aktarılmaktadır. Steroidler, proteinler, iyonlar ve testosteronla ilişkili androjen bağlayan proteini içeren testis sıvısı, Sertoli hücreleri ve rete testisteki hücreler tarafından salgılanmaktadır [8].

Spermiyogenez aşamasından sonra, olgun sperm hücreleri "spermiyasyon" olarak tanımlanan bir işlemle seminifer tübül lümenine verilmektedir. Olgun bir sperm baş, boyun (bağlantı parçası) ve kuyruk olmak üzere üç bölgeden oluşmaktadır (Şekil 2.8). Bu üç bölgede, plazma membranı tarafından sarılmaktadır. Baş bölgesi büyük oranda akrozom ile çevrelenmiş kondense bir çekirdeği içermektedir. Spermin boyun bölgesinde bir çift sentriyol vardır. Distal sentriyol, sperm kuyruğunun aksonemini oluştururken; proksimal sentriyol ise erken embriyonik bölünmeler için gerekli olan mikrotübül oluşumuna kaynaklık etmektedir [12].

Kuyruk bölgesi ise orta parça, esas parça ve son parça bölümlerinden meydana gelmektedir. Orta parça bölgesinin merkezinde 9+2 mikrotübüllerden oluşan aksonem ve dış yoğun liflerden oluşmaktadır. Dış yoğun lifler, dokuz uzamına kolondan oluşur. Dış yoğun liften sonra mitokondriyon sarmal gelmektedir. Mitokondriyolar, orta parçanın sonunda yer alan anulusa kadar uzanmaktadır. Esas parça ise kuyruğun en uzun parçasıdır. Orta parçadan farklı olarak dış yedi yoğun lif yapısı içeren esas parça, benzer yapıda aksonem ve fibröz (keratin yapısında) bir kılıftan oluşmaktadır. Kuyruk son parçasında, dış yoğun lifler ve fibröz kılıf bulunmamakta; sadece aksonemden oluşmaktadır [12].

### **2.3.2. Sertoli Hücrelerinin Yapısı ve Görevleri**

Sertoli hücreleri, ilk kez 1865 yılında Enrico Sertoli tarafından tanımlanmıştır [13]. Sertoli hücreleri, pubertaya kadar germinal epitelin %90'nunu oluştururken; puberta sonrası %10 düzeyine kadar düşmektedir. İlginç olarak bu hücreler, puberta öncesi mitotik bölünmeler gerçekleştirirken; puberta sonrası mitotik bölünmeler gerçekleştirilememektedir. Sertoli hücreleri, seminifer tübülü çevreleyen bazal lamina üzerine oturan ve lümene kadar uzanan prizmatik hücrelerdir. Bu morfolojik yerleşimleri ile intertübüler alan ile seminifer tübüller arasındaki bağlantıyı sağladıkları düşünülmektedir. Bu hücrelerin yan yüzleri, spermatogenik hücreler için kriptalar (çukurcuklar) bulunması nedeniyle düzensiz bir yapı göstermektedir. Sertoli hücrelerinin en önemli özelliklerinden birisi de, büyük bir çekirdekleri ve çekirdeğin heterokromatin kitlesi ile ilişkili belirgin bir çekirdekçiğe sahip olmalarıdır. Çekirdekleri uzamış bir şekilde olup; çekirdek kılıfının çok sayıda invaginasyonu göze çarpmaktadır [4, 12]. Ayrıca, bu hücreler çok sayıda lipid damlacıklarına, güçlü bir hücre iskeleti yapısına (vimentin, aktin ve mikrotübüllerden oluşan), çok sayıda düz ve az sayıda granüllü endoplazmik retikulum, çok sayıda mitokondri, lizozom, iyi gelişmiş Golgi aygıtı

organellerine ve zengin hücre iskeletine sahiptirler. Bu hücreler, FSH ve testosteron reseptörlerini de eksprese etmektedirler [12].

Sertoli hücrelerinin bazolateral yüzeylerinde bulunan sıkı bağlantılar (zonula okludens), bu hücrelerin arasındaki geçişi büyük ölçüde engellemektedir. Bu bağlantılar germinal epiteli, bazal ve adluminal olmak üzere iki kompartmana bölmektedir. Bazal kompartmanda spermatogonyumlar yer alırken; adluminal kompartmanda ise primer spermatozoid, sekonder spermatozoid, yuvarlak spermatozoid ve uzayan/uzamış spermatozoidler bulunmaktadır. Kompartmanlaşmayı oluşturan sıkı bağlantıların oluşturduğu kan-testis bariyeri, spermatozoid ve spermatozoidleri otoimmün reaksiyonlardan korumaktadır. Bu bariyer, kandan antikolar dahil olmak üzere çok sayıda immünolojik proteinin geçişini önlerken; aynı zamanda gelişmekte olan spermatogenik hücrelerden köken alan immün reaksiyonu indükleyebilecek proteinlerin kan damarlarına ulaşmasını engellemektedir [1, 4]. Sertoli hücreleri arasında aralık bağlantılarda (gap junctions) bulunmaktadır. Bu bağlantılar, hücreler arasında çeşitli küçük moleküllerinin geçişini sağlamaktadır [8].

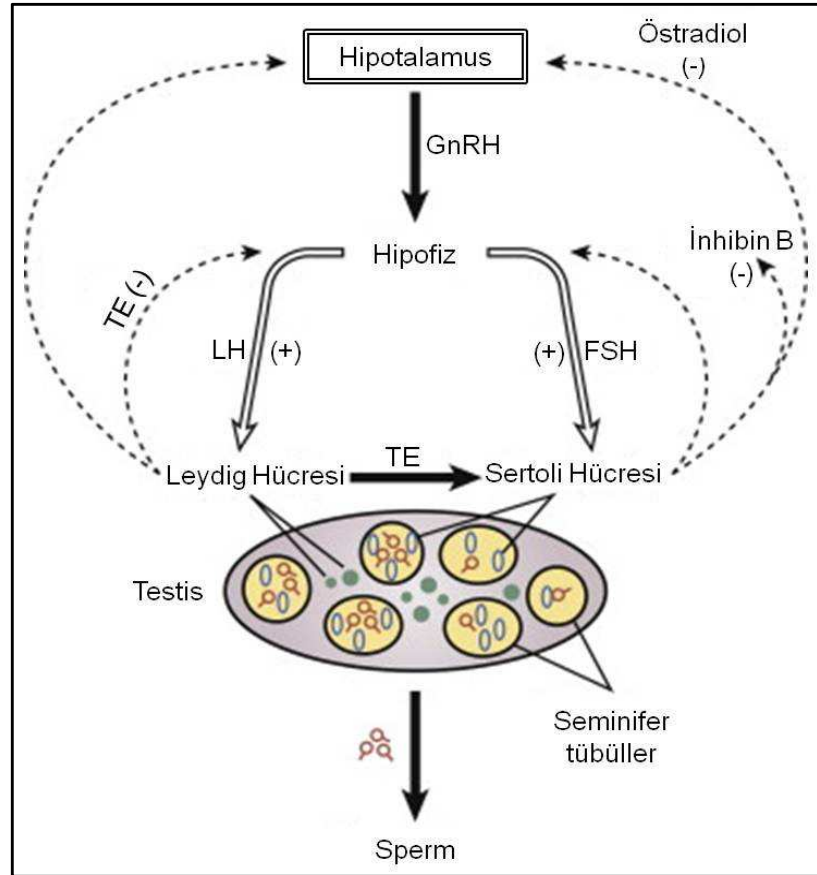
Sertoli hücrelerinin görevleri özet olarak: a) Spermatogenik hücrelerin beslenmesi, desteklenmesi ve korunması: Spermatogenik hücrelerine besin maddelerini iletimi ve kullanılan metabolitlerin uzaklaştırılmasında Sertoli hücreleri kritik bir öneme sahiptir. b) Belirli faktörlerin salgılanması (fetal dönemde antimüllerian hormon, ergin dönemde aktivin, inhibin, androjen bağlayıcı protein ve transferin gibi): Testosteron ve FSH kontrolünde salgılanan androjen bağlayıcı protein, seminifer tübüldeki testosteronun yoğunlaştırılmasında görev almaktadır. Bu hücrelerin testosteronu östradiole çevirebilme yeteneği olduğu da belirtilmektedir. c) Spermiyogenez sürecinde atılan sitoplazmik atıkların fagosite edilmesi: Fagosite edilen artık cisimler, lizozomlar tarafından sindirilmektedir. d) Kan-testis bariyerinin kurulması: Bu bariyer, büyük moleküllerin kan damarından spermatogenik hücrelerin arasına girişini engellenmektedir. e) Spermatogenik hücrelerin lümene doğru hareketlerine yardımcı olunmasıdır. Spermiyasyon olarak bilinen bu işlem, aktin aracılı kontraksiyon ile gerçekleştirilmektedir [1, 4, 12].

### **2.3.3. Spermatogenezin Hormonal Kontrolü**

Spermatogenez, hipofizin ön lobundan (adenohipofiz) salgılanan FSH ve LH hormonları ile kontrol edilmektedir. FSH ve LH salınımı, hipotalamustan salgılanan GnRH (Gonadotropin salgılatıcı hormon) tarafından uyarılmaktadır (Şekil 2.9).

FSH, Sertoli hücrelerini uyararak androjen-bağlayıcı protein, inhibin ve aktivin üretmelerine neden olur. Androjen-bağlayıcı protein (ABP), testosteron ile dihidrotestosterona bağlanmaktadır. Bu kompleksler (ABP/testosteron ve ABP/dihidrotestosteron), androjenlerin gelişen spermatogenik hücrelerin etrafında oldukça yoğun düzeyde bulunmasını sağlamaktadır. Sertoli hücreleri tarafından salgılanan inhibin ise

hipotalamustan salınan gonadotropin salgılatıcı faktörün salınımını azaltarak; ön hipofizden FSH üretimini düşürmektedir. Ayrıca, östradiolün de GnRH salınımını azaltıcı etki yaptığı bilinmektedir (Şekil 2.9). Aktivin molekülü ise inhibine zıt etki göstererek, ön hipofizden FSH üretimini arttırmaktadır. Bu moleküllere ek olarak, fetal dönemde Sertoli hücreleri tarafından salgılanan Müllerian inhibe edici hormon (AMH) dişi genital organ gelişimini baskılayarak; erkek genital organ gelişimini uyarmaktadır [12].



**Şekil 2.9.** Erkek gonadal aksın şematik gösterimi. Hipotalamus ve hipofiz aksında salgılanan faktör ve hormonlar testisin fizyolojik aktivitelerini kontrol etmektedir. TE: Testosteron.

LH hormonu ise Leydig hücreleri tarafından testosteron ve dihidrotestosteron hormonlarının üretilmesini uyarmaktadır. Testosteron, spermatogenezin devamlılığında kritik bir öneme sahip olup, sperm üretimini sağlamaktadır. Ayrıca, bu hormon geri bildirim yoluyla hipofizi etkileyerek LH salınımını düzenlemektedir (Şekil 2.9). Leydig hücreleri, intertübüler alanda topluluklar halinde kan ile lenf damarlarına yakın yerleşmiştir. Bu hücreler, steroid hormon üretimine uygun olarak lipid damlacıkları, tübüler kristal mitokondriyonlar ve iyi gelişmiş düz endoplazmik retikulum organellerine sahiptirler. LH uyarımına bağlı olarak, Leydig hücreleri sahip oldukları 5 $\alpha$ -redüktaz enzimi etkinliğinde testosteron ve dihidrotestosteron hormonlarını sentezler. Testosteronun yaklaşık %95'i Leydig hücreleri tarafından

üretirken, kalan %5'lik kısım ise böbreküstü bezi tarafından üretilmektedir. Testosteron, Sertoli hücrelerini ve seminal bezi kontrol ederken; dihidrotestosteron ise prostat bezini etkileyerek, bu bezin salgılama özelliklerini düzenlemektedir. Testosteron düzeyinin normal seviyenin üstüne çıkması durumunda, negatif geri bildirim ile adenohipofizden LH salınımı azaltılmaktadır [2, 12].

#### 2.4. Ökaryotik Hücrelerde Transkripsiyon

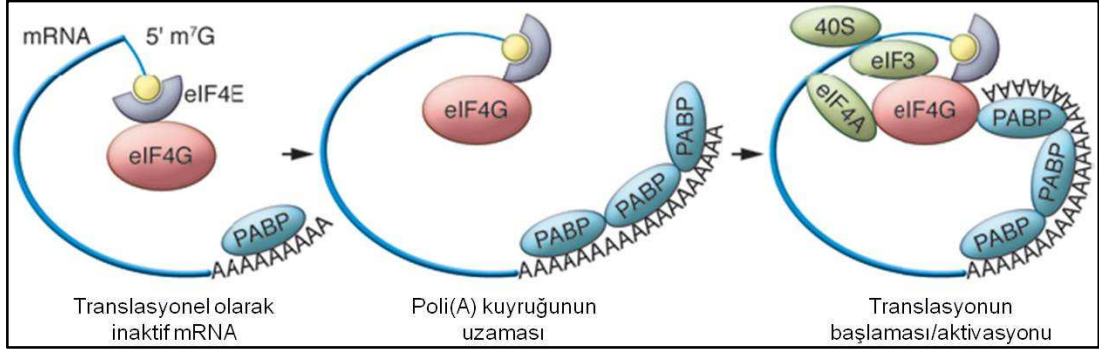
Ökaryotik hücrelerde 20.000-25.000 kadar gen olduğu bilinmektedir. Bu genlerin bazıları, tüm hücrelerde sürekli eksprese edilirken; bazıları ise hücrenin farklılaşma sürecine girmesi ya da mikroçevredeki değişimlere tepki olarak transkribe edilmektedir. Transkripsiyon sürecinde, üç farklı RNA polimeraz enzimi görev yapmaktadır. Nükleoplazmada yerleşik olan RNA polimeraz II mRNA'lar, küçük nükleolar RNA'lar, küçük nüklear RNA'lar ve mikro RNA'ları sentezlemektedir. Nükleolusta bulunan RNA polimeraz I enzimi ise büyük ribozomal RNA öncüllerinin sentezini gerçekleştirmektedir. Sentezlenen ribozomal RNA öncülleri, küçük parçalara ayrılarak ribozomal alt ünitelerin oluşumuna katılmaktadır. Nükleoplazmada yerleşik olan RNA polimeraz III enzimi, tRNA'ların, 5S ribozomal RNA'larını ve küçük nüklear RNA'ların transkripsiyonlarını yapmaktadırlar. Transkripsiyon sürecinde, bu üç tip RNA polimeraz enzimi dışında sekans-özgü DNA'ya bağlanan transkripsiyon faktörleri (trans-akting faktörler), yardımcı düzenleyiciler (DNA'ya bağlanan faktörleri transkripsiyonel komplekse bağlayan moleküllerdir.) ve kromatini yeniden düzenleyen faktörler de aktif rol oynamaktadır. RNA polimeraz enzimi ve transkripsiyon-ilişkili faktörlerin, genin promotor bölgesine bağlanması ile transkripsiyon gerçekleşmektedir.

Bir genden transkribe edilen mRNA'ların çoğunluğu, 3'-ucuna poli(A) kuyruğunun takılması, intronların çıkarılması ve transkripsiyon sonrasında 5'-başlık takılması gibi önemli değişimlere uğramaktadır. mRNA'lara 5'-ucuna başlık takılma işlemi, guanin nükleotidinin 7. karbon atomuna metil grubunun takılmasıyla ( $m^7G$ ) gerçekleştirilir. Poliadenilasyon olarak bilinen, 3'-ucuna 200-250 adenin nükleotidinden oluşan poli(A) kuyruğunun takılması işlemi nükleusta bulunan poli(A) polimeraz enzimi tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu değişimler mRNA'ların nükleazlardan korunmaları, sitoplazmaya taşınmaları ve metabolizmaları (translasyonları ve degradasyonları) gibi işlemlerin normal bir şekilde gerçekleşebilmesi için gereklidir. mRNA'ların transkripsiyon sonrası, kesim (splayzing) ile intronlar çıkarılarak ekzonlar birleştirilmektedir. Böylece, protein sentezi için kullanılacak gendeki kodlama bölgeleri mRNA'da bir araya gelmektedir [14-16].

Bazı mRNA'ların ekspresyon kontrolü ise translasyonel aşamada yapılmaktadır. Translasyonel kontrol, translasyon başlatıcı faktörlerin fosforile edilmesi ve ribozom alt ünite kompleksinin oluşumunun düzenlenmesi ile yapılmaktadır. Bazı mRNA'ların 3' ve 5' uçlarında bulunan transle olmayan bölgelere (UTRs) bağlanan belirli faktörler translasyonun başlaması, devamı ve sonlanmasında rol oynamaktadır. Posttranslasyonel kontrol ise



sentezlenen proteinlerin modifikasyonu ve degradasyon işlemleri ile gerçekleştirilmektedir. Böylece, hücrenin ihtiyacına bağlı olarak proteinler yıkılabilmekte ya da fosforilasyon işlemi ile proteinlerin aktivitesi baskılanmakta ya da arttırılabilmektedir [17].



**Şekil 2.10.** Memeli dişi germ hücrelerinde translasyonel aktivasyon. Translasyonel olarak inaktif olan mRNA'lar, kısa bir poli(A) kuyruğuna sahiptir. Bu mRNA'lardan protein sentezleneceği zaman poli(A) kuyrukları uzatılmaktadır. Uzamış poli(A) kuyruğuna bağlanan PABP proteinleri, 5'-başlık kısmına bağlanan diğer faktörlerde etkileşerek translasyonu başlatmaktadır. Bu şekil, [18] nolu kaynaktan alınmıştır.

Erkek ve dişi germ hücreleri, somatik hücreler ile karşılaştırıldığında posttranskripsiyonel kontrol aşamasında farklılıklar göstermektedirler. Germ hücrelerinde, sitoplazmaya taşınan bazı mRNA'lar, daha sonraki dönemde kullanılmak üzere translasyonel olarak baskılanmış ribonükleoprotein partiküller (RNP) olarak depolanır. RNP olarak mRNA'ların depolanma işleminin en iyi örnekleri, erken spermatogenez ve oositin mayotik uyarımdan önceki dönemlerinde görülmektedir. Bu mRNA'ların translasyonlarının başlaması için çok sayıda faktörün görev yaptığı bir kompleks oluşmaktadır. mRNA'ların 5'-başlık yapısını oluşturan m<sup>7</sup>G (7-metil guanozin), eIF4E (ökaryotik başlatma faktörü 4E) ile etkileşmektedir. Poli(A) kuyruğuna ise poli(A) bağlanma proteinleri (PABP'lar) bağlanmaktadır. Translasyonun başlatılabilmesi için PABP'nin 80 ile 250 poli(A) rezidüsüne bağlanmasının gerekli olduğu belirtilmektedir [18-20].

İskelet proteini olarak görev yapan eIF4G proteini de, eIF4E ve PABP proteinleri ile ilişki kurmaktadır. Bu üç protein, mRNA yapısını stabilize etmekte ve oluşan kapalı sirküler yapının devamlılığını sağlamaktadır (Şekil 2.10). Komplekse bağlanan eIF3 molekülünün eIF4G ile etkileşmesi sonucunda ribozom alt üniteleri (40S ve 60S) bu bölgeye toplanarak, translasyon gerçekleştirilir. Hücrenin gereksinim duyduğu miktarda protein sentezlendikten sonra, PARN enzimi tarafından transle edilen mRNA'nın poli(A) kuyruğu parçalanarak; mRNA'nın degradasyonu gerçekleştirilir. Bu mekanizma, belirli proteinlerin ihtiyaç duyulan gelişim döneminde ve istenilen miktarda sentezlenmesine imkân vermektedir [21-23].



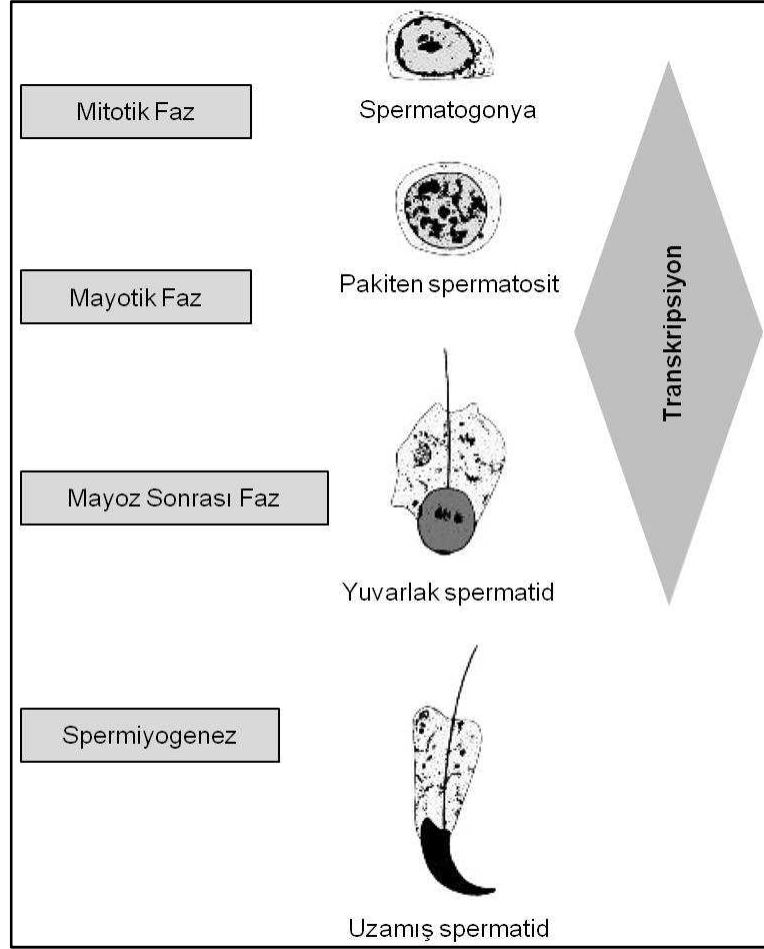
#### 2.4.1. Spermatojenik Hücrelerde Transkripsiyon ve Translasyon

Spermatogenez, oldukça kompleks bir işlem olması nedeniyle bu süreçte çok sayıda protein ve transkript ihtiyacı duyulmaktadır. Bu proteinler ve transkriptleri eksprese eden genler, üç ana grupta toplanabilmektedir. İlk grubu sadece spermatojenik hücreler tarafından eksprese edilenler oluşturur. Bu genlerin homologları da, somatik hücrelerde de bulunmaktadır. Bu grupta gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz, fosfogliserat kinaz-1, ısı şok protein 70 gibi genler yer almaktadır. İkinci grupta yer alan genler ise somatik hücrelerde transkribe edilmeyip, sadece germ hücrelerinde eksprese edilmektedir. Bu grup genlere örnek olarak protamin ve geçiş proteinleri verilebilir. Üçüncü grup genler ise alternatif kesim, alternatif promotörler ve farklı transkripsiyon başlama bölgelerinin bulunmasına bağlı olarak farklı uzunluk ve farklı amino asit içeriğinde proteinler ve transkriptler üretilmektedir. Bu genlerin ürünleri germ hücrelerinde olduğu gibi somatik hücrelerde de bulunmaktadır. Bu tip transkriptlere örnek olarak tip 1 hekzokinaz (Hk1) verilebilir. Bu genin germ hücre özgül olan Hk1-sa, Hk1-sb, Hk1-sc gibi farklı transkriptlerinin olduğu ortaya konulmuştur [11].

Erkek germ hücrelerinde, somatik hücrelerde olduğu gibi yukarıda tanımlanan üç gen tipinin ekspresyonel kontrolleri transkripsiyonel, translasyonel (posttranskripsiyonel) ve posttranslasyonel aşamalarda gerçekleşmektedir. Transkripsiyonel kontrol, genin promotör bölgesine transkripsiyon faktörlerinin bağlanması, poli(A) kuyruğunun 3' ucuna takılması, 5'-ucuna başlık takılması (7-metil guanozin) ve alternatif kesilme ile intronların aradan çıkarılması gibi işlem basamaklarında olabilmektedir [11].

Translasyonel kontrol ise mRNA'ların 3'- ve 5'- uçlarına eIF4E, eIF4G, PABP proteinleri ile diğer moleküllerin bağlanmasıyla oluşan translasyon kompleksinin oluşumu ve ribozomal alt ünitelerin bağlanması gibi aşamalarda gerçekleştirilmektedir. Protein sentezi sonrasında endoplazmik retikulum ve golgi organellerinde proteinlerin bazı aminoasitlerine belirli grupların takılması, fazladan sentezlenen ya da yanlış sentezlenen proteinlerin proteazomlarda yıkılması gibi işlemler ise translasyonel kontrol amaçlı yapılmaktadır [11].

Transkripsiyonel aktivite, spermatogenezin alt aşamalarından olan spermiyogenezin ortasında durmaktadır. Bu nedenle postmayotik hücreler olan yuvarlak spermatidler, uzamış spermatidler ve sperm hücrelerinde transkripsiyon gerçekleşmemektedir (Şekil 2.11). Bu nedenle, spermatojenik germ hücreleri posttranskripsiyonel kontrole gereksinim duymaktadır. Bilindiği gibi, erken spermatogenez sürecinde spermatogonyalar ve spermatositler tarafından transkribe edilen mRNA'ların bir kısmı gerekli proteinlerin sentezinde kullanılırken; bir kısmı ise depolanmaktadır. Depolanan mRNA'lar, ribonükleoprotein partiküller halinde hücre sitoplazmasında translasyonel olarak baskılanmış durumda kalmaktadır [24-26].



**Şekil 2.11.** Memeli spermatogenez hücrelerinin transkripsiyonel aktiviteleri. Spermatogenez, mitotik bölünmeler, mayoz bölünme ve spermiyogenez fazlarından oluşmaktadır. Spermatogonya, pakiten spermatosit ve yuvarlak spermatidlerde transkripsiyon gerçekleştirilirken; spermiyogenez sürecinde ise transkripsiyonel aktivite durmaktadır. Transkripsiyonel aktivitenin pakiten spermatositlerde en yüksek düzeye ulaştığı görülmektedir. Bu şekil, [27] nolu kaynaktan alınmıştır.

Geç spermiyogenez sürecinde görülen morfolojik ve fizyolojik değişimler için gerekli proteinler, depo mRNA'ların translasyonu ile sağlanmaktadır. Uzayan ve uzamış spermatidler sahip oldukları ribozomlar ile bu sessiz mRNA'ların translasyonlarını gerçekleştirebilmektedirler. Bu hücreler tarafından depo mRNA'lardan üretilen proteinler arasında akrosomal protein SP-10 [28], geçiş proteinleri [29], protaminler [30] ve diğer sürekli üretilen proteinler yer almaktadır.

#### 2.4.2. Spermatogenez Hücrelerinde Posttranskripsiyonel Kontrol

Memeli dişi germ hücreleri ve erken embriyonik gelişim dönemlerinde transkripsiyonel aktivite ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda, oogenez sürecinde mayotik matürasyonla birlikte transkripsiyonun durduğu ve embriyonik genom aktivasyonuna kadar depo mRNA'lardan gerekli proteinlerin üretildiği belirlenmiştir. Embriyonik genom

aktivasyonu, farede 2-hücreli aşamada olurken [31]; insanda ise 4-8 hücreli embriyo aşamasında meydana gelmektedir [32]. Transkripsiyonun durduğu mayotik matürasyon dönemine kadar transkribe edilip, depolan mRNA'ların poli(A) kuyrukları kısaltılmaktadır. Oogenez ve erken embriyo gelişim döneminde, bu mRNA'lardan belirli proteinlerin sentezi için poli(A) kuyrukları uzatılmaktadır. Böylece, RNA-bağlanma proteinleri poli(A) kuyruğuna bağlanarak translasyonel aktiviteyi indüklemektedirler [33, 34].

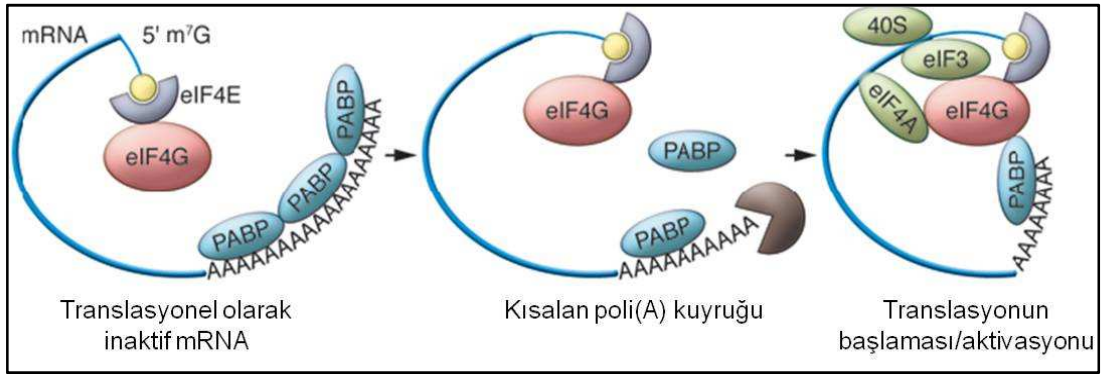
Memeli spermatogenez aşamalarında spermatogonya, mayoz ve erken spermiyogenez süreçlerinde transkripsiyon devam etmektedir. Fakat, oogeneze benzer olarak, spermiyogenez sürecinin ortasında transkripsiyon durmaktadır. Transkripsiyonun uzayan spermatidlerde (9-10. aşamalarda) durmasının, transkripsiyonel işlemlerde meydana gelen değişimlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Uzayan spermatid aşamaları 12-13'de transkripsiyonel baskılanmanın devamlılığı ise kromatin yapısındaki düzenlenmelere ve kromozomal kondensasyondan kaynaklandığı tahmin edilmektedir [24, 35].

Mid-spermiyogenezde transkripsiyon durduktan sonra, geç spermiyogenez fazında nüklear kondensasyon, sperm kuyruk oluşumu, organellerin yeniden düzenlenmesi gibi morfolojik değişimler gerçekleştirilmektedir. Bu morfolojik ve fizyolojik değişimler için belirli proteinlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla, erken spermatogenez sürecinde sentezlenen mRNA'lar translasyonel olarak baskılanmış olarak, ribonükleoprotein partikülleri (RNP) şeklinde depolanır. Bu depolanmış mRNA'ların, uzayan ve uzamış spermatidlerde translasyonları yapılarak gerekli proteinler sentezlenmektedir [26]. Gerekli proteinlerin, belirli dönemlerde depolanan mRNA'lardan sentezlenmesi işlemi oldukça kompleks ve sıkı düzenlenme gerektirmektedir. Bu düzenlenmede, translasyonel ya da postranskripsiyonel kontrol mekanizmaları görev almaktadır [36].

Postranskripsiyonel kontrol mekanizmalarından en önemlisi, mRNA'ların 3' ucunda bulunan poli(A) kuyruğunun uzatılıp kısaltılmasıdır. Bu mekanizma ile kontrol edilen genlerden olan protamin 1 ve 2 (Prm1, 2) ve geçiş proteinleri (Tp) yuvarlak spermatid (aşama 7) tarafından transkribe edilmekte ve RNP olarak depolanmaktadır. Bu mRNA'lar uzamış spermatid (US) döneminde (aşama 13) translasyonel olarak aktive edilerek protamin ve geçiş proteinleri sentezlenir. Yuvarlak spermatidlerde transkripsiyon sonrası translasyonel olarak inaktif durumda bulunan Prm ve Tp mRNA'ları yaklaşık 180 nükleotidlik poli(A) kuyruğuna sahiptir. Bu uzun poli(A) kuyruğuna sahip olan mRNA'ların translasyonel baskılanmasında, MSY2 ve MSY4 RNA-bağlanan proteinlerin rol oynadığı ortaya konulmuştur [37, 38]. MSY2 (Y kromozomu erkek-spesifik bölgesi 2) ve MSY4 (Y kromozomu erkek-spesifik bölgesi 4) dışında diğer RNA-bağlanan proteinlerin de katılmasıyla, haberci ribonükleoprotein partiküller (mRNP'ler) oluşmaktadır. mRNP'ler translasyonel olarak sessiz olması yanı sıra, mRNA yıkımına karşı da dirençlidirler. Protamin ve geçiş proteinlerini kodlayan mRNA'lar ilk

sentezlediklerinde yaklaşık 160 nükleotidlik poli(A) kuyruğuna sahip olarak mRNP'de depolanmaktadır [39, 40].

Spermiyogenez ortasına doğru transkribe edilip, depolan mRNA'lar olduğu gibi spermatogenezin mayoz ve erken spermiyogenez dönemlerinde de transkribe edilip mRNP'lerde depolanan mRNA'larda bulunmaktadır. Bu tip bir posttranskripsiyonel kontrole örnek olabilecek mRNA'lar arasında PGK-2 [41], TENR [42] ve SPNR [43] yer almaktadır. SPNR proteini, mikrotübül-bağlanan bir protein olup; uzayan ve uzamış spermatidlerdeki manşet ile ilişki içindedir. Bu protein, depo mRNA'ların translasyon işlemlerinde görev alabilmektedir [43]. PGK-2, TENR ve SPNR genlerinden üretilen mRNA'lar, pakiten spermatositler tarafından transkribe edilmekte ve spermiyogenez sürecine kadar translasyonel olarak baskılanmış halde depolanmaktadır [44].



**Şekil 2.12.** Memeli spermatogenez hücrelerinde translasyonel aktivasyon. Spermatogenezin erken dönemlerinde transkribe edilen uzun poli(A) kuyruğuna sahip olan mRNA'lar depolanmaktadır. Depolanan bu inaktif mRNA'lar, spermatogenezin geç dönemlerinde poli(A) kuyrukları kısaltılarak translasyonel olarak aktive edilmektedirler. Bu şekil, [18] nolu kaynaktan alınmıştır.

mRNA'ların 3' ve 5' uçlarında bulunan UTR (transle olmayan bölge) olarak bilinen ve proteine dönüşmeyen sekanslar, depo mRNA'ların translasyonel kontrollerinde rol oynamaktadır. 5'-UTR'de bulunan kontrol elementleri, translasyon kompleksinin oluşumunun baskılanması ve 43S ribozomal ünitenin yer değiştirmesinin engellenmesi ile translasyonu baskılamaktadır. 3'-UTR bölgesinde yerleşik olan kontrol elementleri ise translasyonun baskılanmasını mRNP bileşenlerin toplanmasına olanak sağlayarak gerçekleştirmektedir. Böylece, mRNP hücre içinde p-cisimcikler olarak tanımlanan bölgelerde beklemektedir. Bu 3' ve 5' uçlarda bulunan UTR bölgeleri, posttranskripsiyonel kontrolde etkin bir rol oynadıkları gibi translasyonel süreçte de görev yapmaktadırlar. Ayrıca, bu bölgeler dışında mRNA'ların posttranskripsiyonel kontrolünde görev alan diğer sekansların olabileceği de belirtilmektedir [45, 46].

Depo mRNA'lar, protein sentezi için kullanılacakları zaman translasyonel olarak aktif polizomal bölgeye yönlendirilmektedir.

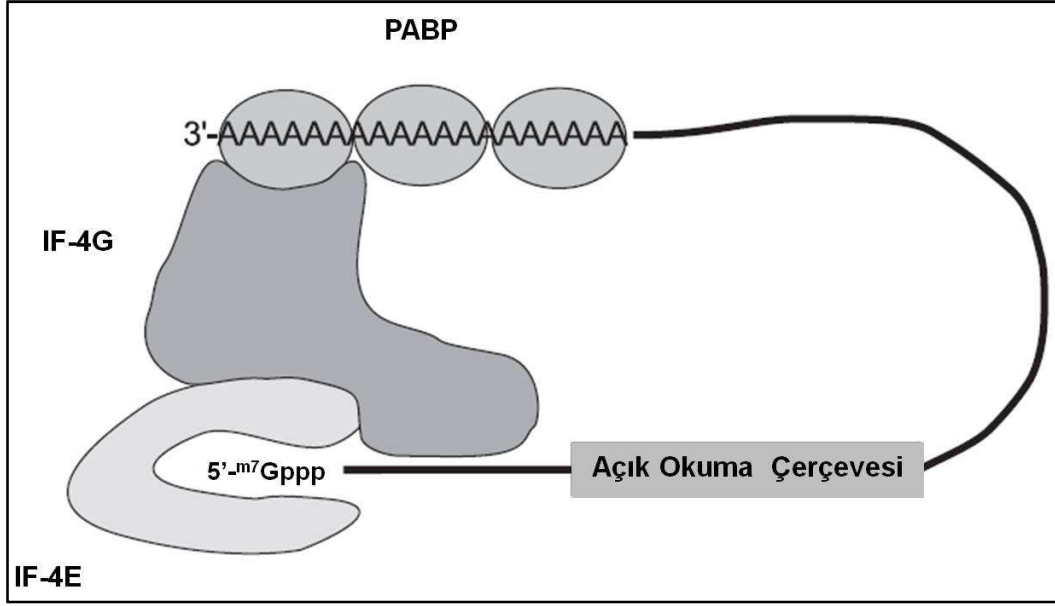
Uzayan/uzamış spermatidlerde, bu mRNA'lar aktive olduklarında poli(A) kuyrukları 30 nükleotide düşmektedir (Şekil 2.12) [47]. Bu mRNA'ların translasyonel aktivasyon süreci ve poli(A) kuyruğunun kısaltılması mekanizmasını kontrol eden faktörler tam olarak bilinmemektedir. Poli(A) kuyruğunun kısaltılmasının translasyonel aktivite için önemli bir gereksinim mi? yoksa translasyon sonucu ortaya çıkan bir durum mu olduğu henüz net olarak açıklanamamıştır. Bu işlemler için mRNP partikülünde yer alan bazı proteinleri modifiye eden protein kinaz ve fosfataz enzimlerinin de bu süreçte önemli olduğu belirtilmektedir [44]. Geç spermiyogenez sürecinde depo mRNA'larının translasyonları kritik bir öneme sahiptir. Herhangi bir hataya bağlı olarak posttranskripsiyonel kontrol mekanizmalarında meydana gelebilecek olası bozukluklar, spermatid farklılaşmasında duraklama ve erkek infertilitesine neden olabilmektedir [44].

Ökaryotik hücre için yukarıda anlatılan mekanizmaya benzer olarak spermatogonik hücrelerdeki translasyonel aktivite için oluşan komplekste eIF4A, eIF4G, eIF3, 40S ve PABP proteinleri yer almaktadır (Şekil 2.13). Depo mRNA'ların translasyonel aktivitelerinin başlaması, devamlılığı ve azaltılması aşamalarında en önemli görevi bir RNA-bağlanma proteini olan PABP [poli(A) bağlanma proteini] proteinleri üstlenmektedir.

## 2.5. Poly(A) Bağlanma Proteinlerinin (PABP'lar) Genel Özellikleri

Poli(A) bağlanma proteinleri (PABP'lar), ökaryotik hücrelerde bulunurken; prokaryotik hücrelerde bulunmamaktadır. PABP'ların fonksiyonel özellikleri ilk olarak mayalarda belirlenmiştir. Bu proteinlerin mayaların yaşamlarının devamlılığı için önemli olduğu gözlenmiştir [48]. *Drosophila*'da ise sadece bir tip PABP geni olduğu ortaya konulmuştur. pAbp olarak sembolize edilen bu PABP geninin delesyonu embriyonik lethalliteye neden olmaktadır [49]. Yuvarlak solucanlarda (*Caenorhabditis elegans*), iki adet PABP proteini tanımlanmıştır. PABP proteinlerinden birisi olan Pab-1'in interferans RNA ile baskılanması %50-80 oranında embriyonik lethallite, steril yavru oluşumu ve büyüme geriliği gibi bozukluklara neden olmaktadır [50].

Çok sayıda PABP proteini içeren omurgalılarda, hücre içi yerleşimleri ve evrimsel ilişkilerine göre PABP proteinleri iki gruba ayrılmaktadır. İlk grubun prototipi PABP1 (PABP, PAB1, PAB gibi isimlerle kullanılmaktadır.) olup, insan ve farelerde PABPC1 olarak isimlendirilirken; kurbağada ise PABC olarak bilinir [51]. İnsan PABPC1 geninin klonlanması ve proteinin yapısal özellikleri ilk defa Grange ve arkadaşları tarafından 1987 yılında gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, PABPC1 geninin cDNA dizisi belirlenmiş ve bu dizinin transle ettiği proteinin moleküler ağırlığının 70.244 kDa olduğu rapor edilmiştir. İnsan PABPC1 proteini, maya poli(A) bağlanma proteini ile yüksek homoloji göstermekte ve poli(A) kuyruğuna bağlanabilme özelliğine sahiptir. PABPC1 mRNA'sı (2.9 kb'lık büyüklükte), sıçan karaciğer kanser hücreleri (hepatoma), insan melanoma hücre hattı ve ördek eritroblastlarında Northern blot yöntemi ilk kez ortaya konulmuştur [52].



**Şekil 2.13.** Translasyona hazır mRNA yapısı. mRNA'nın 3' poli(A) kuyruğuna PABP proteinleri bağlanmaktadır. 5' ucunda ise 7-metil guanozin yer almaktadır. 7-metil guanozin, başlatıcı faktör 4E (IF-4E) başlatıcı faktör 4G (IF-4G) ile ilişki içindedir. IF-4G ise PABP proteini ile etkileşmektedir. Bu kapalı ilmik yapısı, translasyon için hazır olan mRNA'nın stabilitesini korumaktadır. Bu şekil, [53] nolu kaynaktan alınmıştır.

PABPC1 proteini, N-terminal bölgesinde 4 adet RNA tanıma domaini (RRM) ve C-terminal bölgesinde ise bir adet PABP (PABC) domaini içermektedir (Şekil 2.14) [54]. RRM domaini, 12 adenozone bağlanarak; 25-27 adet adenozin rezidusunu koruyabilmektedir. Böylece, yaklaşık 250 adet adenozinden oluşan poli(A) kuyruk bölgesine ardışık olarak çok sayıda PABP proteininin bağlanması gerekmektedir. İlk iki RRM domaini (RRM1 ve RRM2), poli(A) kuyruğuna yüksek istekle bağlanmakta ve bağlandıktan sonra globüler bir yapı halini almaktadır. Bu globüler yapı birbirine paralel olmayan 4 adet beta tabakalı yapı ve 2 adet alfa heliks alt ünitesinden oluşmaktadır. RRM domaininin bir yüzü, poli(A) kuyruğuna bağlanırken; diğer yüzü ise protein-protein ilişkilerinde görev aldığı belirtilmektedir. RRM3 ve RRM4 motifleri ise daha düşük istekle poli(A) kuyruğuna bağlanmaktadır. Ayrıca RRM3 ve RRM4, RNA'ların AU zengin bölgeleri gibi farklı mRNA sekansları ile de ilişki kurabilmektedir [55, 56]. PABPC1 proteinin, C-terminal bölgesinde prolin aminoasiti açısından zengin olan bağlayıcı bir domain ve karboksi terminalde ise PABC domaini bulunmaktadır. Prolin-zengin domainin, PABPC1 proteinlerinin homodimerizasyonunda rol oynadığı düşünülmektedir. Böylece, PABP proteinleri birbirlerine bağlanarak dimerler oluşturabilmektedir. PABC domaini, 5 adet alfa heliks alt ünitesinden oluşmaktadır. Bu domainin, PABP proteinlerinin kendileri ve diğer proteinlerle etkileşim kurmasında görev yaptığı belirtilmektedir [57, 58].

Birinci grup PABP'ların arasında PABPC1 dışında iPABP, PABPC2, PABP5 ve ePABP gibi poli(A) bağlanma proteinleri de yer almaktadır (Şekil

2.14). iPABP (indüklenebilir poly(A) bağlanma proteini, APP-1 ve PABC4 olarak bilinir.), ilk olarak T-hücrelerinde tanımlanmıştır. T-hücrelerinin aktive edilmesi durumunda iPABP mRNA düzeyinin belirgin miktarda arttığı belirlenmiştir. Ayrıca, iPABP timus, dalak, prostat, testis, ovaryum, ince bağırsak gibi somatik dokular tarafından da eksprese edilmektedir [59]. iPABP protein yapısı, PABPC1 proteini ile büyük ölçüde benzerlik göstermekle birlikte, RRM motifinde bazı farklı amino asitler bulunmaktadır. İki proteinde prolin-zengin ara domaini aminoasit içeriği açısından büyük farklılıklar göze çarpmaktadır. PABPC1'e benzer olarak, iPABP sitoplazmada yerleşik olup; mRNA'ların poli(A) kuyruğuna bağlanmaktadır. Ayrıca, iPABP ökaryotik salgılatıcı faktör 3 (eRF3) ile ilişki kurabilmektedir [60]. iPABP'in bu özellikleri belirlenmesine rağmen mRNA'ların translasyonel kontrolleri ve stabiliteyi üzerinde bir etkisi olup olmadığı ile ilgili bir bilgi ortaya konulamamıştır.

Kurbağa ve memelilerde tanımlanan PABP genleri intron içermesine rağmen sadece PABPC2 (PABP2 olarak da bilinmektedir.) geni intron içermemektedir. PABPC2 geni, muhtemelen PABPC1 mRNA'sının geri transkriptaz enzimi tarafından DNA'ya çevrildikten sonra, genoma giren bir retrotranspozan olarak kabul edilmektedir. Maya ve memelilerde, bu gen tarafından üretilen PABPC2 proteini, RNA bağlanma özellikleri ve boyutu PABPC1 ile çok büyük benzerlik göstermektedir. PABPC2 genin ekspresyonel kontrolünde görev yapan farklı bir promotör bölgesi olması nedeniyle, PABPC1'den farklı transkripsiyonel kontrol mekanizmasına sahiptir [61].

Testis özgü PABP (tPABP) (farede PABPC2, insanda PABPC3 olarak bilinmektedir.) ekspresyonu, insan ve fare dokularının sadece testis örneklerinde gösterilmiştir. tPABP ile PABPC1 proteinleri arasında yüksek benzerlik vardır. Fakat, tPABP'in RRM domainindeki amino asit sekanslarındaki değişime bağlı olarak poli(A) kuyruğuna bağlanma afinitesi PABPC1'e göre daha düşüktür. Bu genin en ilgi çekici özelliği ise memelilerde sadece testis dokusunda yoğun olarak eksprese edilmesidir [61, 62].

PABPC5 olarak da bilinen PABP5, insan ve farelerde X-kromozomunda yerleşik bir gen tarafından transkribe edilmektedir. Bu genin mRNA düzeyinde ekspresyonel varlığı, RT-PCR ile amigdala, kaudat nükleus, beyincik, korpus kallozum, hipokampus, fetal beyin, kalp, böbrek, testis ve ovaryum gibi dokularda gösterilmiştir. İlginç olarak, bu genin ovaryumdaki ekspresyon düzeyi diğer dokulara göre daha yüksek bulunmuştur [63]. PABP5 genel yapısına bakıldığında PABPC1, PABPC2 ve iPABP proteinlerinden farklı olarak prolin-zengin bölge ve PABC domaini içermemektedir. Günümüze kadar, PABP5 ile ilgili çok az araştırma yapılmıştır. Bu nedenle, PABP5'in poli(A) kuyruğuna bağlanma durumu, hücre içi yerleşimi ve mRNA'ların translasyon ve stabilizasyon süreçlerindeki görevleri henüz belirlenmemiştir.

İlk grupta yer alan PABP proteinlerinden olan ePABP, ilk olarak kurbağada AU-zengin bölgelere bağlanan bir RNA-bağlanan protein olarak tanımlanmıştır [64]. Ayrıca, ePABP proteini eRF3 faktörüne de bağlanma özelliğine sahiptir. PABPC1 proteinine benzer olarak ePABP proteini de poli(A) kuyruğuna bağlanarak, mRNA'ların translasyonel aktivitelerinin düzenlenmesi ve deadenilasyondan korunmasında görev almaktadır [60, 64]. ePABP ve PABPC1 proteinleri amino asit sekansları bakımından büyük ölçüde benzemelerine rağmen RRM3 ve prolin-zengin domainlerin de aminoasit sekansı açısından farklılıklar göze çarpmaktadır. İnsan, fare ve kurbağalarda, ePABP gen ekspresyonunun oogenez ve erken embriyonik gelişim dönemlerinde yoğun olduğu belirlenmiştir. Oosit gelişimi ve embriyonik genom aktivasyonuna kadar yüksek düzeyde ePABP ekspresyonu izlenirken; genom aktivasyonu sonrasında ise PABPC1 düzeyi artmaktadır [64-66]. Bu durum, ePABP ve PABPC1'in farklı gelişim dönemlerinde benzer görevleri yaptıklarını düşündürmektedir.

İkinci grup PABP'nin en iyi bilinen prototipi PABPN1 (OPMD, PABP2, PAB2, PABP11 olarak da bilinmektedir.) olup, 1 adet RRM domaini içermekte ve 49 kDa molekül ağırlığındadır (Şekil 2.14) [67]. PABPN1 proteini, prolin zengin bir ara domain ve C-terminal bölgesinde PABC domainine sahip değildir. Bu protein N-terminalinde asidik aminoasitler açısından zengin bir bölge bulundurmaktadır. C-terminalinde ise arjinin aminoasiti açısından zengin bir zincir içermektedir. PABPN1, oosit ve embriyolarda dâhil olmak üzere bütün ökaryotik hücreler tarafından eksprese edilmektedir [68, 69].

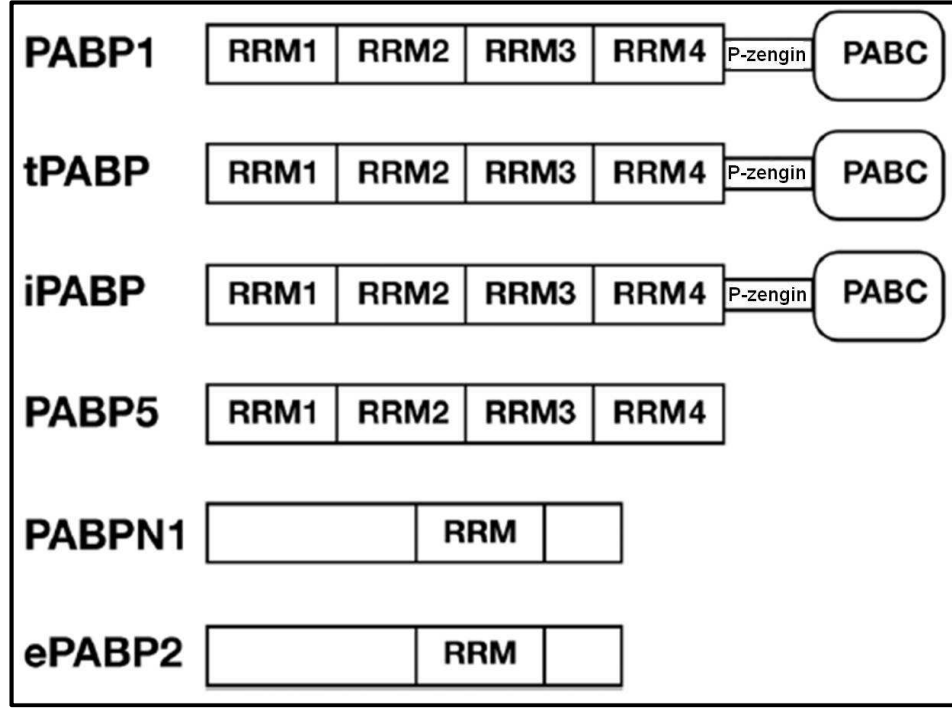
PABPN1 proteini, çekirdeğe yerleşik olup; yeni transkribe edilen mRNA'ların poli(A) kuyruk uzamasının kontrolünde görev yapmaktadır. Bu görevini CPSF (kesim ve poliadenilasyon özgü faktör) ve PAPOLA (poli(A) polimeraz) proteinleri ile ilişkiye girerek gerçekleştirmektedir [53, 70, 71].

İkinci grup PABP'nin embriyonik formu olan ePABP2'in, kurbağa ve farede erken dönem embriyolarda varlığı belirlenmiştir. ePABP2'in yapısal özellikleri PABPN1 ile büyük ölçüde benzemektedir. Sitoplazmada yerleşik olan ePABP2, mRNA'ların poli(A) kuyruklarına bağlanabilmektedir. Fakat ePABP2'in bu görevini, EGA'dan bağımsız olarak yaptığı görülmüştür [68, 72]. ePABP2'nin mRNA'ların translasyonel aktiviteleri ve poli(A) kuyruk uzunluğunun düzenlenmesindeki muhtemel rollerinin belirlenmesi için yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Genel olarak bakıldığında farklı poli(A) bağlanma proteinleri farklı dokularda farklı düzeylerde eksprese edilmektedir. Bu durumun olası nedenleri: a) PABP proteinlerinin görevleri arasında farklılıklar olabilir. Belirli görevleri yerine getirmesi için, evrimsel olarak farklı PABP proteinlerinin oluşmasına ihtiyaç duyulmuş olabilir. b) Her bir PABP proteini belirli mRNA'ların translasyonel aktivitesini kontrol ediyor olabilirler. Bu farklı tipte PABP proteinlerinin oluşmasına neden olmuş olabilir. c) Bilindiği gibi bazı PABP proteinleri bazı somatik ya da gonadal dokularda belirli hücre tiplerinde



daha yüksek düzeyde üretilmektedir. Bu yüksek ekspresyonun, dokudaki hücre tipine göre farklı hücrel aktivite gereksinimden kaynaklandığı düşünülmektedir [69].



**Şekil 2.14.** Poli(A) bağlanma protein (PABP) ailesi üyelerinin yapısı. PABPC1 olarak bilinen PABP1, dört farklı RNA tanıma motifine (RRM) sahiptir. RRM motifleri, C-terminal bölgede bulunan PABC domainine prolince zengin bir ara bölge ile bağlanmaktadır. Testis özgül PABP proteini olan tPABP ve iPABP, PABP1 (PABPC1) ile benzer yapısal özelliklere sahiptir. PABP5 (PABPC5) proteini, prolince zengin bağlayıcı bölge ve PABC domainine sahip değildir. PABPN1 ve ePABP2 ise sadece bir adet RRM motifi, uzun asidik N-terminal ve kısa bir arjinin zengin C-terminal domainlerine sahiptir. Bu şekil, [69] nolu kaynaktan alınmıştır.

### 2.5.1. PABP Proteinlerinin Görevleri

Çekirdekte transkribe edilen mRNA'lar sitoplazmaya geçtiklerinde, 3' ve 5' uçları birbirlerine yaklaştırılarak kapalı bir ilmik oluşması sağlanmaktadır. Kapalı ilmik oluşumu, 3' uçta bulunan poli(A) kuyruğuna bağlanan PABP proteinleri ile 5' ucuna bağlanan faktörlerin etkileşimi ile meydana gelmektedir. Poli(A) kuyruğuna bağlanan PABP proteininin RRM 1-2 domaini ile eIF4G (ökaryotik başlatıcı faktör 4G) arasında ilişki kurulmaktadır. eIF4F kompleksinin bir bileşeni olan eIF4G ise eIF4E aracılığıyla 5' uçtaki başlıkla (7 metil guanozin) etkileşmektedir. eIF4G, eIF4E ve PABP proteinleri arasındaki ilişki mRNA uçlarının birleşip, kapalı bir ilmik oluşumunu ve kararlılığını sağlamaktadır. eIF4G ile PABP etkileşimi, hem PABP proteinlerinin poli(A) kuyruğuna bağlanma isteğini hem de eIF4E'nin başlık kısmına bağlanma afinitesini arttırmaktadır. Böylece, mRNA'nın translasyonel aktivitesi ribozomal alt ünitelerin bağlanması ile birlikte

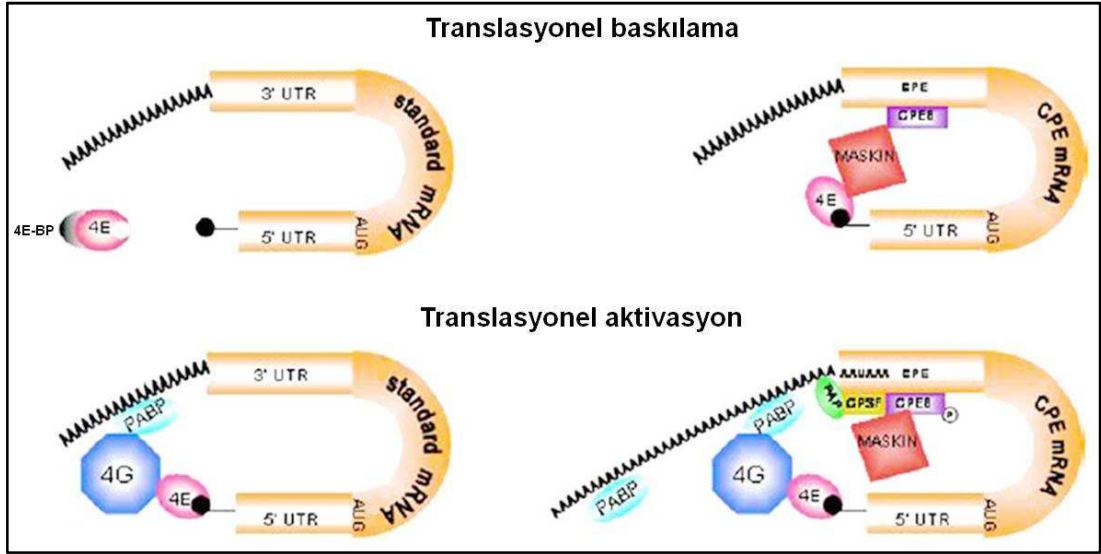
başlatılmaktadır. Bu mekanizmada PABP proteinleri oldukça kritik bir rol oynamaktadır [23, 73, 74].

Genel translasyonel mekanizmaların kontrolünde görev yapan PABP proteinlerinin, özgün olarak belirli mRNA'ların düzenlenmesinde de işlevsel oldukları belirlenmiştir. Bu genlerden birisi siklin B1 olup, matürasyon indükleyici faktörün (MPF) bir bileşenidir. MPF'ye kurbaçalarda oosit matürasyonu için gereksinim duyulmaktadır. Siklin B1, translasyonel olarak baskılanmış durumdayken kısa bir poli(A) kuyruğuna sahiptir. Bu baskılama, mRNA'nın 3'-UTR bölgesindeki CPE elementine CPEB proteinin bağlanması ile gerçekleştirilmektedir. İlginç olarak, bu element ve CPEB proteini bu mRNA'nın poliadenilasyonu içinde gereklidir [75, 76]. mRNA'nın 3'-ucundaki CPE elementine bağlanan CPEB, eIF4E ve maskin proteinler bir kompleks oluşturmaktadır. Bu kompleks, eIF4E ile eIF4G arasında ilişki kurulmasını engelleyerek, translasyonel aktiviteyi baskılamaktadır (Şekil 2.15) [77]. Kurbağada progesteron ile uyarımına bağlı olarak, CPEB fosforile edilmekte ve siklin B1 mRNA'sı poliadenilasyona uğramaktadır. CPEB'in fosforilasyonu, maskinin baskılayıcı etkisini ortadan kaldırmakta ve eIF4G ile PABP proteinleri etkileşim içine girebilmektedirler. Böylece, siklin B1 mRNA'sından protein sentezi gerçekleştirilmektedir (Şekil 2.15). PABP proteinleri, siklin gibi hücre siklus proteinleri ve erken embriyo gelişiminin belirli dönemlerinde ihtiyaç duyulan diğer proteinleri kodlayan mRNA'ları kontrol etmektedirler [78, 79]

PABP proteini ile eIF4G etkileşimi mRNA'nın ilmi oluşturmasına katkı sağlamasına rağmen; bu etkileşimin translasyon için önemli bir kriter olmadığı belirlenmiştir. eIF4G geni mutasyona uğratılmış mayaların büyüme ve canlılık özelliklerinde değişim gözlenmemiştir. Oluşturulan mutasyon, Pab1p proteini ile eIF4G arasındaki ilişkiyi engellemektedir. Bu durum, eIF4G dışında translasyon faktörlerinin de translasyonel aktivitede rol oynadığını düşündürmektedir [80]. Translasyonun sonlandırılması ve mRNA'ların yıkımı, sırasıyla eRF1 ve eRF3 faktörlerinin etkinliğinde olmaktadır. Memeli ve mayalarda yapılan çalışmalarda PABPC1 proteini PABC domaini ile eRF3 faktörüyle ilişki kurduğu gözlenmiştir. eRF3 proteini, GTPaz aktivitesine sahip olup; eRF1'in aktivitesini artırmaktadır. Bilindiği gibi eRF1, translasyonu sonlandırmaktadır. eRF3 ise PABP proteinlerinin poli(A) kuyruğuna bağlanmasını engelleyerek, deadenilasyona neden olabilmektedir. Deadenilasyon ise mRNA'ların yıkımı ile sonuçlanmaktadır [81, 82].

PABP proteinlerinin mRNA'ların translasyonel aktivitelerinin kontrolü dışında, mRNA'ların stabilitesinin devamlılığında da görev yaptığı belirtilmektedir. Bu proteinlerin mRNA kararlılığının devamlılığını nasıl gerçekleştirdiklerinin mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Fakat, bu görevlerini mRNA'ların deadenilasyonu takiben başlık kısmının uzaklaştırılması ve 3'-5' eksozom aracılı degradasyondan koruyarak yaptıkları öne sürülmektedir. Ayrıca, PABP proteinleri mRNA'ların korunması sürecinde poli(A) kuyruğunu kısaltan poli(A) ribonükleaz (PARN) gibi

deadenilaz enzimlerinin aktivitesini de baskılamasıdır [84, 85]. eIF4E-eIF4G-PABPC1 proteinlerinin oluşturduğu kompleks, mRNA'nın iki ucunu iyi bir şekilde kapatmaktadır. Böylece, hem deadenilazların hem de başlık kısmını parçalayan enzimlerin bu kapalı ilmik bölgesine girişini engellenmektedir. *In vitro* çalışmalarda, translasyon durdurduktan sonra PABP1'in eIF4E'den bağımsız olarak direkt 5' başlık kısmına bağlanarak degradasyonun başlamasını engelleme potansiyeline sahip oldukları da ortaya konulmuştur. Fakat bu bulgular *in vivo* uygulamalarla henüz değerlendirilmemiştir [86, 87].



**Şekil 2.15.** Oogenez ve embriyonik gelişimde translasyonel düzenlenim. Oosit gelişimi ve erken dönem preimplantif embriyolarda depo mRNA'ların ihtiyaca göre translasyonel baskımla ve aktivasyonları gerçekleştirilmektedir. Bu şekil [83] nolu kaynaklan alınmıştır.

PABP proteinlerinin aktivitesini ve görevlerini etkileyen diğer proteinlerde bulunmaktadır. Bu proteinlerden birisi olan rotavirüs yapısal olmayan protein (NSP3) PABP aktivitesini, eIF4G'ye bağlanarak düzenlemektedir. Ayrıca, mRNA'nın stabilitesini bozan faktörlerde PABP'ların mRNA üzerindeki ARE bölgesine bağlanmasını engellemektedir. NSP3, eIF4G'e bağlanarak; PABPC1'in eIF4G'ye bağlanmasını baskılamaktadır. Bu durumda mRNA'nın translasyonunun durdurulmasına neden olmaktadır [88]. mRNA'lardan yeterli protein sentezi yapıldıktan sonra yıkılmak istendiğinde ise mRNA'nın kararlılığını bozan faktörler AU-zengin bölgeye bağlanmaktadır [89]. Bilindiği gibi ARE olarak bilinen AU-zengin bölgeye PABP proteinleri bağlandığında mRNA'nın kararlılığının devamlılığı sağlanmaktadır. mRNA'nın kararlılığını bozan faktörlerin konsantrasyonunun artması ile ARE bölgesine PABP'lar artık bağlanamamakta, böylece yıkım süreci başlamaktadır. mRNA'ların yıkımı, eksozom kompleks ve PARN enzimlerinin etkinliğinde olmaktadır [90]. PABP proteinleri, diğer proteinler gibi apoptoz ve viral enfeksiyona bağlı olarak proteolitik yıkıma uğramaktadır. Proteolitik yıkımda, PABC domaini RRM domainlerinden ayrılmaktadır. Böylece, poli(A) bağımlı translasyonda baskılanmaktadır [91].

PABP proteinler, metilasyon ve fosforilasyon gibi modifikasyonlara da uğramaktadır. Maya, bitkiler, deniz kestanesi gibi canlılarda yapılan araştırmalar PABP proteinlerinin çoklu fosforilasyona uğradıklarını göstermiştir [92]. Kurbağa böbrek hücreleri ile *in vitro* ortamda yapılan bir çalışmada, serum ile uyarımı kinazları aktive ettiği belirlenmiştir. Bu aktivasyon, PABP protein fosforilasyonuna bağlı olarak PABPC1-eIF4G ilişkisini arttırmaktadır [93]. İnsan PABPC1'in, p38-mitojen-aktive edilmiş protein kinaz yolu *in vitro* ortamda fosforile edildiği de ortaya konulmuştur [94]. Ayrıca, PABPC1 proteinin prolin zengin bölgesindeki arjinin aminoasitleri, arjinin metiltransferaz enzimi tarafından metile edilmektedir. Bu bulgu, *in vitro* ortamda HeLa hücreleri ile yapılan çalışmada da belirlenmiştir [95].

PABPC1 proteinin en önemli görevi mRNA'ların yapısal bütünlüğünün korunması ve translasyonel aktivitelerinin düzenlenmesi olduğu bilinmesine rağmen [96], bu protein çekirdeğe de geçmektedir. Bu durum, PABPC1'in nükleusta farklı görevlerinin olabileceğini de düşündürmektedir [97]. PABPC1 geni, germ hücreleri ve erken dönem embriyolarda dâhil bütün ökaryotik hücrelerde farklı düzeylerde transkribe edilmektedir [53]. PABPC1 mRNA'ları da farklı dokular tarafından, farklı düzeylerde transkribe edilmektedir. Bunu sağlamak için de sıkı bir kontrol mekanizmasına gereksinim duyulmaktadır. Örneğin PABPC1 mRNA'sının translasyonel kontrolü iki farklı mekanizma tarafından kontrol edilmektedir. 5' terminal oligoprimidin (5'-TOP), büyümeye bağlı olarak PABPC1 protein sentezini düzenlemektedir [98]. Ayrıca, PABPC1 proteinleri kendi mRNA'larının 5'-UTR bölgesindeki A-zengin bölgeye bağlanarak otoregülasyon yapmaktadır. Bu bağlanma ile PABPC1 düzeyi yükseldiğinde, PABPC1'in protein sentezi azaltılmaktadır [99, 100]. iPABP'te otoregülasyon ile kontrol sağlanırken; PABPC2'de ise böyle bir düzenleme mekanizması olmadığı belirlenmiştir [62].

#### **2.5.1.1. Memeli Testisinde PABPC1 ve PABPC2 Ekspresyonu**

PABPC1 ve PABPC2 genlerinin memeli testis dokusu ve somatik dokularında zamansal ekspresyon durumları belirlenmiştir. Ayrıca, bu genlerin, mRNA'ların translasyonel kontrol sürecindeki olası rolleri de tartışılmıştır [61, 62, 101].

Erken dönem (puberta öncesi) ve ergin fare testis dokularında, PABPC1 cDNA probu kullanılarak bu genin mRNA düzeyi Gu ve arkadaşları tarafından 1995 yılında belirlenmiştir. Altı günlük fare testisinde, oldukça düşük düzeyde PABPC1 mRNA'sı olduğu ortaya konulmuştur. Bu dönemde testiste çok sayıda mitotik bölünmeler geçiren germ hücreleri ve somatik hücreler bulunmaktadır. On iki günlük testiste ise 3.9 kb büyüklükte, düşük yoğunlukta fakat altı günlük testisten daha yüksek PABPC1 mRNA varlığı gözlenmiştir. Oniki günlük testiste spermatogenez ilerlemiş ve germ hücreler mayoza girmeye yaklaşmıştır. PABPC1 mRNA düzeyinin 17 günlük fare testis ekstraktında ise oldukça arttığı belirlenmiştir. Bu dönemde artık çok

sayıda germ hücre mayoz sürecindedir. PABPC1 mRNA'sın en yüksek düzeyi ise seksüel olarak olgun ergin fare testis dokusunda gözlenmiştir. Ayrıca, 17. gün ve ergin fare testis dokularında 3.9 kb'lik mRNA'nın dışında 3.7 kb'lik PABPC1 izoformunda bulunmuştur. Ayrıca, ergin fareden elde edilen karaciğer ve beyin doku örneklerinde de 3.9 kb'lik PABPC1 transkripti de belirlenmiştir. Fakat, ergin fare testis dokusundaki PABPC1 mRNA düzeyi, karaciğer ve beyin gibi somatik dokularda belirlenenden daha yüksek düzeydedir [102].

Aynı çalışmada, izole edilen pakiten spermatosit, yuvarlak spermatid ve uzayan spermatidlerdeki PABPC1 mRNA düzeyi Northern blot yöntemi ile değerlendirilmiştir. Pakiten spermatosit (mayotik) ve yuvarlak spermatidlerin (erken postmayotik) oldukça yoğun PABPC1 mRNA düzeyine sahip oldukları belirlenmiştir. Geç postmayotik yuvarlak spermatid olarak da bilinen uzayan spermatidlerde ise PABPC1 mRNA düzeyinde belirgin miktarda azalma görülmüştür. Testis ekstraktlarında olduğu gibi pakiten spermatosit ve yuvarlak spermatidlerde de iki PABPC1 transkript izoformu da görülmüştür. Ayrıca, çalışma kapsamında fare testis PABPC1 mRNA'larının transkripsiyonel durumları da analiz edilmiştir. Ergin fare testis hücreleri parçalandıktan sonra, sükröz gradiyent santrifügasyonu ile mitokondriyal özüt fraksiyonu elde edilmiştir. Fraksiye edilmiş RNA örnekleri fare PABPC1 cDNA probu ile hibridize edildiğinde, PABPC1 mRNA'larının çoğunun polizom içermeyen fraksiyonda olduğu ortaya konulmuştur. Polizomlarda ise oldukça düşük düzeyde olduğu gözlenmiştir. Bu durum, PABPC1 mRNA'larının transkripsiyonel aktivitesinin düşük düzeyde olduğunu düşündürmektedir [102]. Çalışma kapsamında gerçekleştirilen, Western blot ve immünohistokimya uygulamaları ile PABPC1'in memeli testisinde yoğun düzeyde ekspresyon edildiği gözlenmiştir. Özellikle yuvarlak spermatidlerde yoğun ekspresyon dikkat çekmiştir. Uzayan spermatidlerde mRNA'sı neredeyse hiç olmamasına rağmen, PABPC1 proteinin bulunması bu proteinin spermatogenezin geç dönemlerinde stabilitesini koruduğunu göstermektedir [102]. İzole edilen spermatogonik hücrelerde gerçekleştirilen Western blot uygulaması sonucunda ise PABPC1 protein düzeyi mayotik pakiten spermatositler ve geç postmayotik uzayan spermatidlerde benzer düzeyde bulunmuştur. Fakat, erken postmayotik germ hücreler olan yuvarlak spermatidler ve ergin testiste oldukça yüksek miktarda PABPC1 protein bulunduğunu görülmüştür. Beyin ve karaciğer örneklerindeki PABPC1 protein düzeyinin, ergin testise göre oldukça düşük olduğu da belirlenmiştir [102].

Sıçan testis kesitleri üzerinde gerçekleştirilen PABPC1 immünohistokimyasal uygulama sonucunda, genel olarak yuvarlak spermatid (aşama 7-8'den 14-15'e kadar) ve erken dönem uzamış spermatidlerin sitoplazmalarında yüksek PABPC1 ekspresyonu belirlenmiştir. Spermatositlerde düşük düzeyde, spermatogonyalar da ise eser düzeyde sitoplazmik PABPC1 ekspresyonu gözlenmiştir. Seminifer tübül aşamasına bağlı olarak spermatogonik hücre tiplerindeki PABPC1 ekspresyon şiddetlerinde farklılıklarda tespit edilmiştir [102].

Kleene ve arkadaşları, fareler üzerinde PABPC1 ve PABPC2 gen ekspresyonları ile ilgili 1994 yılında yaptıkları çalışmada, PABPC1 mRNA'sının karaciğer, kas, böbrek, dalak ve testis dokularındaki varlığı Northern blot tekniği ile göstermişlerdir. PABPC2'nin sadece testis dokusunda olduğu, RT-PCR ile ortaya konulmuştur. Ayrıca, izole edilmiş spermatogenik hücre fraksiyonlarında (pakiten spermatozoid, yuvarlak spermatozoid ve uzamış spermatozoid) PABPC1 ve PABPC2 mRNA'larının ekspresyon düzeyleri Northern blot yöntemiyle değerlendirilmiştir. Pakiten spermatozoid ve yuvarlak spermatozoidlerde yoğun düzeyde eksprese edildikleri gözlenen bu genlerin, uzamış spermatozoidlerdeki ekspresyonlarının ise oldukça zayıf düzeyde olduğu gözlenmiştir. PABPC1 ve PABPC2'nin, spermatogenik hücrelerde görülmesi; bu izoformların spermatogenez sürecinde mRNA'ların translasyonel kontrolünde birlikte görev aldıkları şeklinde yorumlanmıştır [61].

Kimura ve arkadaşları tarafından, 2009 yılında yapılan çalışmada da PABP genlerinin fare testis dokusundaki ekspresyon durumları değerlendirilmiştir. Bu çalışmada, araştırmacılar farede karaciğer, akciğer, ovaryum ve testis gibi dokularda PABPC1 ve PABPC2 genlerinin ekspresyonlarını araştırmışlardır. İmmüblotlama yöntemiyle, Kleene ve arkadaşlarının çalışmasıyla uyumlu olarak PABPC2'nin sadece testiste, PABPC1'in ise testis, beyin, akciğer, kalp, karaciğer, dalak, ovaryum, böbrek ve uterus dokularında üretildikleri belirlenmiştir. Ayrıca, PABPC2 proteini spermatozoid ve yuvarlak spermatozoidlerde eksprese edilirken; PABPC1 ise spermatozoid, yuvarlak spermatozoid ve uzayan spermatozoidlerde eksprese edilmektedir. Bu çalışmada, PABPC2'in yoğun olarak germ hücrelerinde RNP'lerde bulunurken; PABPC1'in ise aktif olarak translasyon gerçekleştiren poliribozomlarda yer aldığı da ortaya konulmuştur. Ayrıca, PABPC2 PABPC1'den farklı olarak yuvarlak spermatozoidlerin kromatoid cisimciklerinde yerleşiktir. Bu sonuçlar, PABPC2'nin PABPC1 ile birlikte haploid germ hücrelerinde translasyonel kontrolde görev aldığı şeklinde yorumlanmıştır [101].

Ferál ve arkadaşları tarafından 2001 yılında gerçekleştirilen araştırmada, insan testis özgül poli(A) bağlanma proteini olan PABP3 (PABPC3, farede PABPC2 olarak bilinmektedir.) ilk kez tanımlanmıştır. PABPC3, 70.1 kDa moleküler ağırlıkta, 631 aminoasitten oluşmakta ve PABPC1 ile %92.5 oranında yapısal benzerlik göstermektedir. Oligonükleotid probalar kullanılarak gerçekleştirilen Northern blot uygulamasında, insan testisinde iki PABPC3 izoformu (2.1 ve 2.5 kb) olduğu gösterilmiştir. İnsandan alınan dalak, timus, prostat, testis, ovaryum, incebağırsak ve kolon gibi somatik dokuların hepsinde PABPC1 ekspresyonu görülürken; PABPC3'ün ise sadece testis dokusunda olduğu Western blot yöntemi ile belirlenmiştir. RNA *in situ* uygulaması ile insan testis doku kesitlerinde PABPC3 ve PABPC1 mRNA'larının hücresel yerleşimleri de ortaya konulmuştur. PABPC1 mRNA'sı yuvarlak spermatozoidlerde yoğun düzeyde eksprese olurken; pakiten spermatozoidlerde ise çok düşük düzeyde olduğu belirlenmiştir. PABPC3 mRNA'sı ise sadece yuvarlak spermatozoidlerde görülmüş olup, PABPC1'e göre daha düşük düzeyde bulunmuştur. PABPC3

proteini, PABPC1'e göre poli(A) kuyruğuna daha zayıf istekle bağlanmaktadır. Ayrıca, insan PABPC3 geni de PABPC1'den farklı olarak intron içermemekte ve transkripsiyon başlangıç bölgesinin nükleotid dizisi de farklılıklar göstermektedir [62].

Ferál ve arkadaşları aynı çalışmada, insan testis doku ekstraktında PABPC3 dışında PABP4 olarak adlandırılan farklı bir poli(A) bağlanma protein izoformu daha tanımlamışlardır. PABPC1 ile yüksek oranda benzerlik gösteren PABP4, sekans analizi yapıldığında açık okuma bölgesinin sadece 56 amino asitten oluşan güdük bir protein sentezlediği görülmüştür. Bu proteinin RNA tanıma domaininin, ancak yarısını içermektedir. Bu yapıdaki RNA tanıma domaini normal RRM domainin yaptığı gibi RNA'nın poli(A) kuyruğuna bağlanamamaktadır. Sonuç olarak: PABP4 geni, fonksiyonel olmayan bir protein kodlaması nedeniyle, psödogen olarak kabul edilmektedir [62].

PABPC1 genin insan ve fare oositleri ile erken dönem embriyolarındaki ekspresyonları, Seli ve arkadaşları tarafından mRNA düzeyinde gösterilmiştir [65, 66]. Bu çalışmalarda, bu genin ePABP geni ile olan ekspresyonel ilişkisi de incelenmiştir. PABPC1, fare oositleri (profaz I ve metafaz II) ile erken dönem embriyolarda (1-hücre, 2-hücre ve 4-hücre) zayıf düzeyde transkribe edilirken; 8-hücre ve blastosist dönemi embriyolarda ise yüksek düzeyde eksprese edilmektedir. Farelerde embriyonik genom aktivasyonunun (EGA) 2-hücreli embriyo döneminde olması nedeniyle, PABPC1 ekspresyonunun fare erken dönem embriyolarında EGA bağımlı olduğu şeklinde değerlendirilmiştir [65]. Faredeki ekspresyona benzer bir durum insan oosit [germinal vezikül (GV) ve metafaz II (MII) oositleri] ve erken dönem embriyolarındaki (8-hücre ve blastosist) analizlerde gözlenmiştir [66]. PABPC1, GV ve MII oositlerinde düşük düzeyde eksprese edilirken; 8-hücreli embriyo ve blastosist dönemindeki erken dönem embriyolarda ise yüksek düzeyde eksprese edildiği belirlenmiştir. İnsanda EGA'nın 4-8 hücreli embriyo aşamasında olması nedeniyle; erken dönem embriyolardaki PABPC1 gen ekspresyonu, embriyonik genom aktivasyonuna bağımlı olarak değişmektedir [66].

Çeşitli dokular tarafından üretilen PABPC1 ve diğer PABP proteinlerinin aktivitesi, PABP ile ilişkili genler (Paip1 ve Paip2) tarafından düzenlenmektedir. Memelilerde Paip2'nin (PABP-ilişkili protein 2), Paip2a ve Paip2b olmak üzere iki izoformu bulunmaktadır. Paip1, PABP etkinliğinde gerçekleştirilen translasyonel aktiviteyi eIF3 (ökaryotik başlatıcı faktör 3) ile ilişki kurarak arttırmaktadır [103]. Paip2 ise translasyonel baskılayıcı olup, eIF4G ile PABP'a bağlanmak için yarışmaya girer. Böylece, PABP proteininin poli(A)'ya bağlanma isteği düşürülmektedir [104, 105]. Paip2, oldukça asidik bir protein olup; iki farklı PABP-bağlanma motifi (PAM) içerir [106]. Paip2'nin iki izoformunda (Paip2a ve 2b) PABP'a bağlanabilmesine rağmen pankreas, beyin ve testiste dokularında farklı düzeyde eksprese edilirler. Paip2a, Paip2b'ye göre pankreas, beyin ve testis dokularına göre daha

yüksek miktarda üretilmektedir. Bu durum iki izoformun doku özgü özellik gösterdiğini ve farklı uyaranlara cevap verdiğini düşündürmektedir [107].

### **2.5.1.2. Germ Hücre ve Erken Dönem Embriyolarda ePABP Gen Ekspresyonu**

Birinci grup PABP ailesinin embriyonik formu olan ePABP, ilk olarak Voeltz ve arkadaşları tarafından 2001 yılında kurbağa (*Xenopus laevis*) oosit ve erken dönem embriyo özütlelerinde belirlenmiştir [64]. Kurbağa ePABP proteini, 629 amino asitten oluşmakta ve kurbağa PABC proteini ile %72 oranında benzerlik göstermektedir. Sitoplazmada yerleşik olan ePABP proteini, kurbağada embriyonik genom aktivasyonun görüldüğü mid-blastula dönemine kadar yüksek düzeyde eksprese edilirken; bu dönemde sonra görülmemektedir. Kurbağa oosit ve erken embriyonik gelişim döneminde belirlenen ePABP'in temel görevi, depolanmış mRNA'ları deadenilasyondan korumak ve translasyonlarını kontrol etmektedir [64].

Kurbağalarda (*Xenopus laevis*) yakın zamanda yapılan diğer bir çalışmada, ePABP proteininin dört rezidüsünden fosforile edilmesinin oosit matürasyonu için gerekli olduğu ortaya konulmuştur [108]. Bu fosforilasyon, depo mRNA'ların sitoplazmik poliadenilasyonu için kritik bir öneme sahiptir. Fakat, ePABP fosforilasyon işleminin mRNA'ların translasyonel aktivitelerinin indüklenmesi için gerekli olmadığı da belirlenmiştir. Bu çalışma ile ePABP protein aktivitesi için, posttranslasyonel modifikasyonun gerekli olduğu ilk kez ortaya konulmuştur [108].

Kurbağada tanımlanan ePABP, farede 2005 yılında Seli ve arkadaşları tarafından karakterize edilmiştir [65]. Bu çalışmada karaciğer, dalak, kalp, akciğer, ovaryum ve testis gibi birçok dokuda RT-PCR ile yaptıkları analizler sonucunda ePABP'in sadece ovaryum ve testiste eksprese olduğunu göstermişlerdir [65].

ePABP mRNA'sının ovaryum dokusundaki hücresel yerleşimi ise RNA *in situ* hibridizasyon tekniği ile ortaya konulmuştur. Bu uygulama ile ePABP mRNA'sının ovaryumda sadece gelişim aşamasındaki foliküllerin oositlerinde görülmüştür. Gelişen folikül oositlerinde, ePABP mRNA'sı sitoplazmik yerleşim göstermektedir. Ayrıca, çalışma kapsamında, profaz I ve metafaz II oositlerinde, 1-, 2-, 4-, 8-hücreli ve blastosist dönemi erken dönem embriyolarda RT-PCR ile ePABP ve PABPC1 gen ekspresyon durumları da araştırılmıştır. Bu uygulama ile ePABP mRNA'sının PI ve MII oositleri ile 1-hücreli ve 2-hücreli embriyolarda olduğu ve daha sonraki embriyonik gelişim aşamalarında (4-hücre, 8-hücre ve blastosist) ise olmadığı görülmüştür. PABPC1 mRNA düzeyi ise 4-hücreli aşamaya kadar düşük düzeydeyken, 8-hücreli ve blastosist dönemlerinde ise yüksek düzeyde bulunmuştur. ePABP ve PABPC1 genlerinin oosit gelişimi ve erken dönem embriyolarındaki ekspresyon durumu, bu genlerin embriyonik genom aktivasyonuna bağımlı olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Bilindiği gibi, farelerde embriyonik genom aktivasyonu 2-hücreli embriyo aşamasında olmaktadır. ePABP, embriyonik



genom aktivasyon öncesi dönemde mRNA'ların translasyonel kontrollerini gerçekleştirirken; embriyonik genom aktivasyon sonrasında ise bu görevi PABPC1'in yaptığı düşünülmektedir [65].

Seli ve arkadaşları, insan oosit ve erken dönem embriyolarında da ePABP ve PABPC1 genlerinin ekspresyon durumlarını değerlendirmişlerdir [66]. Bu çalışmada, fareden farklı olarak insan somatik dokularında (kalp, beyin, plasenta, akciğer, karaciğer, böbrek, pankreas, dalak, timus, prostat, incebağırsak, kolon, testis, ovaryum ve dalak) ePABP ekspresyonu olduğu RT-PCR ile belirlenmiştir. Ayrıca, insan oosit (GV ve MII oosit) ve erken dönem embriyolarında (8-hücre ve blastosist) ePABP ve PABPC1 mRNA'larının görece miktarları da gerçek zamanlı PCR ile araştırılmıştır. Bu uygulama sonucunda GV ve MII oositlerinde, 8-hücre ve blastosistlere göre anlamlı düzeyde daha fazla ePABP mRNA'sı olduğu belirlenmiştir. PABPC1 ise tam tersi olarak, 8-hücreli ve blastosist dönemi embriyolarda GV ve MII oositlerden oldukça fazla bulunmuştur [66].

ePABP geni ekzon 2 bölgesi çıkarılmış (ePABP<sup>-/-</sup>) fare modeli ile ilgili yeni bir çalışma yayınlanmıştır [109]. Güzeloğlu-Kayisli ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bu çalışmada dişi fareler infertil olarak bulunurken; erkek farelerin ise fertil oldukları görülmüştür. ePABP geni çıkarılmış olan dişi farelerden elde edilen oositler, Siklin B1 ve Dazl gibi depo mRNA'ların stimülasyona bağlı olarak translasyonel aktivitelerini gerçekleştirememişlerdir. Germinal vezikül aşamasındaki ePABP<sup>-/-</sup> oositlere, ePABP mRNA'sı mikroenjekte edildiğinde oosit matürasyonu geriye döndürülemediği görülmüştür. Bu durum, ePABP'e oogenezin erken döneminde gereksinim duyulduğu şeklinde yorumlanmıştır. Ayrıca, ePABP<sup>-/-</sup> fare ovaryumundaki geç dönem antral foliküllerde kumulus genişlemesinde bozulma ve ovulasyonda 8-katlık azalma belirlenmiştir. Bu bozuklukların, EGF-benzeri büyüme faktörü, Areg, Ereg ve Btc ile bu genlerin kontrollerinde görevli olan Ptgs2, Has2 ve Tnfrsf25 mRNA'larının belirgin düzeyde azalmasıyla ilişkili olabileceği düşünülmüştür [109].

Sonuç olarak; ePABP ve PABPC1 genleri kurbağa, fare ve insan oosit ve erken dönem embriyolarında EGA öncesinde ePABP; EGA sonrasında ise PABPC1 mRNA'ların translasyonel kontrollerini gerçekleştirmektedir.

## 2.6. Hipotez

Postnatal fare testislerinde ve spermatogenik hücrelerdeki ePABP gen ekspresyonu ve bu genin PABPC1 ile ekspresyonel ilişkisini değerlendiren herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Ayrıca, postnatal fare testislerinde ePABP mRNA'sının hücresel yerleşimi de henüz belirlenmemiştir. Bu projedeki hipotezimiz: Postnatal fare testisinde ve izole edilen spermatogenik hücrelerde ePABP özgül bir ekspresyon gösterir ve spermatogenez sürecinde PABPC1 ile ekspresyonel bir ilişki içindedir. Bu çalışmada amacımız, fare postnatal testisinde ve izole edilen spermatogenik

hücrelerde ePABP ve PABPC1 genlerinin ekspresyonel durumlarını ve hücreyel yerleşimlerini belirlemektir.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### 3.1. Postnatal Farelerden Testis Örneklerinin Toplanması

Postnatal farklı yaşlardaki C57BL/6 erkek fareler (immatür: 6., 8., 16., 20., 29., 32. ve matür: 88. gün), CO<sub>2</sub> inhalasyonu ve servikal dislokasyon ile eks edildi. Farelerin karın ön duvarı, steril koşullarda açılarak testisleri alındı. Alınan testisler, total RNA izolasyonu (n=2), spermatogenik hücre izolasyonu (n=3) ve RNA *in situ* hibridizasyon uygulamalarında (n=2) kullanıldı.

#### 3.1.1. Postnatal Testislerden Total RNA İzolasyonu

Postnatal farelerden alınan (iki adet fareden alınan toplam 4 adet testis alındı) testislerden total RNA izolasyonu aşağıda belirtilen basamaklarda gerçekleştirildi.

1. Testisler (her fareden alınan iki testisin RNA izolasyonu aynı anda yapıldı.), steril 1.5 ml'lik tüplere alındı ve üzerine 1 ml Trizol reagentı (Invitrogen, katalog no: 15596-018) konulup, RNA izolasyon işlemine kadar -80 °C'de saklandı. RNA izolasyonu için testis dokuları ile Trizol reagentı, içinde 1 mm çapında boncuklar (Biospec products, katalog no: 11079110z) bulunan polipropilen bir tüpe (Biospec products, katalog no: 10831) alındı. Bu tüp, Mini-Beadbeater (Biospec products, Bartlesville, OK, ABD) aleti ile iki defa 2 dakika, hızı 3 olacak şekilde tutulup; dokunun iyice parçalanması sağlandı.
2. Parçalanmış testis doku homojenatı, 1.5 ml steril bir tüpe mikropipet yardımıyla alındı. Boncukların alınmamasına dikkat edildi.
3. Tüp, oda ısısında beş dakika inkübe edildikten sonra üzerine 200 µl kloroform eklenip, iyice karıştırıldı ve 3 dakika oda ısısında bekletildi.
4. Süre sonunda tüpler, 15 dakika, +4 °C'de, 13200 rpm'de santrifüj edildi.
5. Santrifüj işleminden sonra tüpün üstünde RNA'nın bulunduğu şeffaf kısım, mikropipetle ile steril 1.5 ml'lik yeni bir tüpe alındı.
6. Tüpe 500 µl izopropanol eklenip yavaşça çalkalandı ve oda ısısında 10 dakika inkübe edildi.
7. Süre sonunda, tüp 10 dakika, +4 °C'de, 13200 rpm'de santrifüj edildi.

8. Santrifüj sonrası süpernatant atılıp, geriye kalan pelet üzerine %70'lik etanolden 1 ml konuldu.
9. Tüp, 10 dakika, +4 °C'de, 13200 rpm'de santrifüj edildi ve süpernant mikropipet yardımıyla atıldı.
10. Tüpler, oda ısısında 20 dakika bekletildikten sonra; yaklaşık 50 µl steril distile su ile çözüldü. Çözülecek su miktarı pelet büyüklüğüne göre ayarlandı.
11. Çözülen RNA'yı içeren tüp, -80 °C'de saklandı.

Her bir gruba ait testislerden izole edilen RNA'lar, spektrofotometre ile ölçülerek saflık ve konsantrasyonları belirlendi. İzole edilen RNA miktarı = (Absorbans değeri) x (Sulandırma faktörü) x (RNA sabiti (40)) formülü ile hesaplandı.

**Çizelge 3.1.** DNaz uygulamasında kullanılan içerikler. Bu uygulama ile genomik DNA'lar ortamdan uzaklaştırılmaktadır.

İçerik	Miktar (µl)
İzole edilen RNA	10 µg'lık hacim
DNaz I enzimi	1
10X DNaz I tamponu (2 ünite/µl)	RNA hacminin %10'u
Nükleaz içermeyen su	12 µl'ye tamamlandı.
<b>Toplam</b>	<b>12</b>

### 3.1.2. İzole Edilen Total RNA'ya DNaz Uygulaması

İzole edilen total RNA örneklerinden genomik DNA'nın uzaklaştırılması için DNaz uygulaması aşağıdaki basamaklarda gerçekleştirildi. DNaz uygulamasında, Ambion kiti (Ambion, katalog no: 1906) kullanıldı.

1. Aşağıda reaksiyon içerikleri 0.2 ml'lik steril tüplere konuldu (Çizelge 3.1). 0.2 ml'lik PCR tüpüne konulan içerikler 37 °C'de, 45 dakika inkübe edildi.

2. Süre sonunda tüplere 1.2 µl (total hacmin %10'u kadar) DNaz I inaktivasyon solüsyonundan konulup, tüpler iyice karıştırılıp; oda ısısında 2 dakika inkübe edildi.
3. Son olarak tüpler, 13200 rpm'de, +4 °C'de, 3 dakika santrifüj edildi.
4. Santrifüj sonrası RNA'yı içeren süpernatantlar yeni steril tüplere alındı.

**Çizelge 3.2.** cDNA eldesinde kullanılan içerikler. Verilen miktar ve son konsantrasyonlar, toplam reaksiyon hacmi olan 20 µl için hesaplandı. Elde edilen cDNA'lar gen ekspresyonlarının belirlenmesinde kullanıldı.

İçerik	Miktar (µl)	Son konsantrasyon
İzole edilmiş RNA	2 µg hacimde	100 ng/µl
Random dekamer (50 µM)	2	5 µM
10X RT tamponu	2	1X
dNTP (2.5 mM)	4	0.5 mM
RNaz inhibitörü (10 ünite/µl)	1	0.5 ünite
MMLV-geri transkriptaz (100 ünite/µl)	1	5 ünite
Nükleaz içermeyen su	20 µl'ye tamamlandı.	
<b>Toplam</b>	<b>20</b>	

### 3.1.3. cDNA (Komplementer DNA) Eldesi

cDNA eldesinde Ambion kiti (Ambion, katalog no: AM1710) kullanıldı. Her bir tüpe, homojen ve eşit miktarda reaksiyon karışımı ekleyebilmek amacıyla bir ana karışım hazırlandı.

Hazırlanan ana karışımdan her bir tüpe 8 µl konuldu. Temel karışım (10X RT tamponu, dNTP, RNaz inhibitörü ve MMLV-geri transkriptaz oluşmaktadır.) ve cDNA eldesinde kullanılan diğer içerikler Çizelge 3.2'de verildi.

1. 0.2 µl'lik reaksiyon tüplerine izole edilmiş olan RNA'dan 2 µg'lık hacimde konularak, üzerlerine 2 µl random dekamer (son konsantrasyon 5 µM olacak şekilde) eklendi. RNA ve random dekamer karışımı 85 °C'de, 3 dakika inkübe edilerek; sekonder RNA kıvrımlarının açılması sağlandı.
2. Daha sonra, her bir tüpe 8 µl ana karışımdan eklenerek, 44 °C'de, 60 dakika inkübe edildi.
3. Son olarak, tüpler 92 °C'de 10 dakika bekletildi.
4. Bu aşamalardan sonra elde edilen cDNA'lar -20 °C'de saklandı.

**Çizelge 3.3.** RT-PCR ve qRT-PCR tekniklerinde kullanılan primerler. Bu primerler ePABP, PABPC1, beta aktin, Scp3 ve Prm2 genlerinin belirli bölgelerinin çoğaltılmasını sağlamıştır.

Genin adı	İleri primer (F)	Geri primer (R)	PCR ürün büyüklüğü (bp)
ePABP (8F/9R)	5'-ACGAAACCGCTCTATGTGGCCC-3'	5'-CCTGGGGTCAGGTTGCATTGG-3'	246
PABPC1 (1F/2R)	5'-CCCAGCGCCCCAGCTAC-3'	5'-CACGTTCCGCGTCCGCC-3'	234
Aktin (3F/4R)	5'-TGC GTGACATCAAAGAGAAG-3'	5'-CGGATGTCAACGTCACACTT-3'	244
Scp3 (1F/3R)	5-TCAAAGCCAGTAACCAGA-3	Scp3 3R: 5-TCGAACATTTGCCATCTC-3	386
Prm2 (1F/2R)	5'-CGCTACCGAATGAGGAGCCCCAGTG-3	TTAGTGATGGTGCCCTCCTACATTCC-3'	318

### 3.1.3.1. RT-PCR Reaksiyonunun Kurulması

Elde edilen cDNA ve primerlerin kaliteleri ile PCR reaksiyon koşullarının belirlenmesi için ilk olarak geri transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) kuruldu.

1. RT-PCR ve qRT-PCR tekniklerinde kullanılan primer dizileri Çizelge 3.3'de verildi.
2. Her üç gen için, aşağıda belirtilen miktarları içeren ana karışımlar hazırlandı (Çizelge 3.4). ePABP, PABPC1 ve beta aktin (aktin) genleri için tüpler oluşturuldu.
3. cDNA içermeyen negatif kontrol tüpü oluşturularak, kullanılan reaksiyon içeriğinde DNA kontaminasyonu olup olmadığı da gözlemlendi.

**Çizelge 3.4.** RT-PCR reaksiyonu için kullanılan içerikler. Toplam reaksiyon hacmi olan 25 µl'deki son konsantrasyonlarda verildi. RT-PCR ile ePABP, PABPC1 ve aktin genlerinin semi-kantitatif ekspresyonları belirlendi.

İçerik	Miktar (µl)	Son konsantrasyon
<b>10X Renkli tampon</b> (Qiagen, katalog no:201203)	2.5	1X
<b>5X Q solüsyonu</b> (Qiagen, katalog no:201203)	5	1X
<b>dNTP (5 mM)</b> (Roche, katalog no:11969064001)	1	0.2 mM
<b>Primer F (10 µM)</b>	0.75	0.3 µM
<b>Primer R (10 µM)</b>	0.75	0.3 µM
<b>Taq DNA polimeraz</b> (Qiagen, katalog no:201203)	0.2	2 ünite/µl
<b>cDNA</b>	1	~10 ng/µl
<b>Nükleaz içermeyen su</b> (American Bioanalytical, cas no: 7732-18-5)	13.8	-
<b>Toplam</b>	<b>25</b>	

- ePABP, PABPC1 ve beta aktin genleri için amplifikasyon, 35 döngüde gerçekleştirildi. PCR cihazında (Bio-Rad, iCycler version 4.006, Hercules, CA, ABD) aşağıda belirtilen program kullanıldı (Çizelge 3.5). PCR protokolü (PCR programı tasarlanırken touch-down sisteminden yararlandı.)
- PCR reaksiyonu sonucunda elde edilen PCR ürünleri, hazırlanan %1,5'lük agaroz (American Bioanalytical, katalog no: AB00972-00500;) jelde yürütüldü. Tüm PCR ürünleri 100 voltta (3.00, 300 W), 45 dakika güç sağlayıcı (BioRad, PowerPac HCTM, Firmware, version 1.07, Hercules, CA, ABD) ile yürütülmesi jel elektroforezi gerçekleştirildi.
- Her PCR reaksiyon ürünleri agaroz jele yüklenmesi sürecinde DNA belirteci de (Invitrogen, katalog no: 10787-018) yüklendi. Böylece, elde edilen PCR ürünlerinin boyutları kontrol edildi.

**Çizelge 3.5.** RT-PCR için kullanılan PCR protokolü. Bu protokolede toch-down sistemi kullanıldı.

Basamaklar	Derece (°C)	Süre (saniye)
1. Basamak (Denatürasyon)	95	120
2. Basamak (10x) (-0.5 °C/döngü)	94	30
	65	30
	72	30
3. Basamak (25x)	94	30
	55	30
	72	30
4. Basamak (Son uzama)	72	420
5. Basamak	4	∞

### 3.1.3.2. Postnatal Testisler için Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR Uygulaması

Görelî ve kesin mRNA miktarını belirlemek için sıklıkla tercih edilen bir yöntem olan kantitatif gerçek zamanlı PCR, gen ekspresyonu çalışmalarında yoğun olarak kullanılan güvenilir bir tekniktir.

Çalışmada, her hücrede sabit miktarda eksprese olduğu bilinen beta aktin gen ekspresyonu temel alınarak; immatür ve matür testislerdeki ePABP ve PABPC1 genlerinin görelî kantitatif ekspresyon düzeyleri belirlendi. Ayrıca, PCR verimliliği ile görelî ePABP ve PABPC1 miktarlarını belirlemek için standard oluşturuldu. Standard oluşturulmasında, 1:4 oranında seri dilüsyonları yapılan erkek fare ovaryum cDNA'sı kullanıldı. Her bir gen için bu standartlar oluşturuldu.

1. İmmatür ve matür erkek fare testislerinden elde edilen cDNA'lar bu aşamada da kullanıldı. Aşağıdaki çizelgede belirtilen içerikler konularak reaksiyon ana karışımı oluşturuldu (Çizelge 3.6).



2. ePABP, PABPC1 ve beta aktin genleri için gerçek zamanlı PCR uygulaması üç kuyucuklu (triplicate) olarak gerçekleştirildi. Gerçek zamanlı PCR aşamasında kullanılan primerler, Çizelge 3.3'de verildi.
3. ePABP, PABPC1 ve beta aktin genleri için hazırlanmış örnekler kantitatif gerçek zamanlı PCR aletinde (Bio-Rad, iCycler Q Detection System, Hercules, CA, ABD) analiz edildi. Amplifikasyon, ilk 10 döngüde touch-down (-1 °C/döngü) ile kalan 30 döngü ise normal PCR uygulaması olacak şekilde toplam 40 döngü olarak kantitatif gerçek zamanlı PCR gerçekleştirildi (Çizelge 3.7). Ayrıca, melting curve analizi ile ürünlerin beklenen ve gözlenen T<sub>m</sub> değerleri karşılaştırılarak, PCR ürünlerinin doğruluğu değerlendirildi.

**Çizelge 3.6.** qRT-PCR uygulamasında kullanılan içerikler. Toplam reaksiyon hacmi olan 25 µl'deki son konsantrasyonlarda verildi. qRT-PCR uygulaması ile ePABP ve PABPC1 gen ekspresyonlarının kantitatif düzeyleri belirlendi.

İçerik	Miktar (µl)	Son konsantrasyon
2X SybrGreen süper karışım (Bio-Rad, katalog no: 1708880)	12.5	1X
Primer F (10 µM)	0.5	0.2 µM
Primer R (10 µM)	0.5	0.2 µM
cDNA	1	~10 ng/µl
Nükleaz içermeyen su (American Bioanalytical, cas no: 7732-18-5)	14	-
<b>Toplam</b>	<b>25</b>	

4. Gerçek zamanlı PCR aletinin standarda göre vermiş olduğu görelî miktarlar kullanılarak, genlerin görelî ekspresyon düzeyleri belirlendi. Böylece, immatür ve matür erkek fare testis dokularındaki görelî ePABP ve PABPC1 gen ekspresyonları kantitatif düzeyde belirlendi.

Postnatal fare testis dokuları için ePABP ve PABPC1 genlerinin kantitatif gen ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi: fare ovaryum cDNA'sının ana stok konsantrasyonu 200 ng/µl olarak kabul edilmiştir. Bu durumda, seri dilüsyon 1 (S1): 200 ng, S2: 50 ng, S3: 12.5 ng, S4: 3.13 ng S5: 0.782 ng S6: 0.195 ng S7: 0.0488 ng olarak hesaplandı. Böylece, her bir grup için ePABP,

PABPC1 ve beta aktin için görelî miktarlar software program tarafından otomatik olarak hesaplanmıştır.

Normalize değer (ePABP için)= ePABP görelî miktar/beta aktin görelî miktar

Normalize değer (PABPC1 için) = PABPC1 görelî miktar/beta aktin görelî miktar

**Çizelge 3.7.** qRT-PCR ve melting curve analizinde kullanılan PCR programı. Her basamakta kullanılan sıcaklık ve süreler verilmiştir. Melting curve analizi, elde edilen PCR ürünlerinin beklenen PCR ürünleri olduğu konusunda bilgi verici bir uygulamadır.

Basamaklar	Derece (°C)	Süre (saniye)
1. Basamak (Denatürasyon)	95	180
2. Basamak (10x) (-1 °C/döngü)	92	20
	65	20
	72	30
3. Basamak (30x)	92	20
	55	20
	72	30
<b>Melting Curve</b>		
1. Basamak (Denatürasyon/ Yapışma)	95	60
	55	60
2. Basamak (80x) (+0.5 °C/döngü)	55	10
3. Basamak	4	∞

ePABP için hesaplanan tüm normalize değerler en küçük değere oranlanarak ekspresyon düzeyindeki kat değişimler belirlendi. PABPC1 görelî

ekspresyon düzeyi de, aynı şekilde bütün görelî miktarların en küçük değere bölünmesi ile elde edilmiştir. Böylece, qRT-PCR ile analiz edilen postnatal testis dokularındaki ePABP ve PABPC1 gen ekspresyon değışimleri belirlenmiştir.

### 3.2. Postnatal Testis Dokularına RNA *In Situ* Hibridizasyon Tekniğinin Uygulanması

RNA *in situ* hibridizasyon (RNA ISH) ile ePABP mRNA'sının postnatal testis dokularındaki hücrel yerleşimleri belirlendi. Ergin erkek fare testis dokusunda ise hem ePABP ve hem de PABPC1 mRNA'larının hücrel yerleşimleri gözlemlendi.

#### Kullanılan solüsyonlar:

**Bouin fiksatif:** Aşağıdaki solüsyonları içeren hazır solüsyon (Sigma , katalog no: HT10132) olarak alınmıştır.

Suda doyurulmuş pikrik asit (Sigma, katalog no: 197378):	75 ml
%10 formalin (J.T. Baker, cas no: 50-000-0):	25 ml
Glasiyel asetik asit (Merck, katalog no: 1000632500):	5 ml

**ePABP, PABPC1 ve beta aktin primerlerin hazırlanması (10 µM):** Liyofilize halde Yale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Keck Biyoteknoloji Laboratuvarı tarafından sentezlenen 40 nmol'lük primerler 800 µl'lik nükleaz içermeyen distile suda çözüldü. Böylece, 50 µM konsantrasyonda stok primer solüsyonları oluşturuldu. Bu stok primer solüsyonları, 1/5 oranında nükleaz içermeyen distile suda dilüye ederek çalışma solüsyonları oluşturuldu. Primerlerin, stok ve çalışma solüsyonları -20 °C'de saklanmaktadır.

**%1.5'lik agaroz jelin hazırlanması:** 1.5 gram agaroz (American Bioanalytical, katalog no: 9012-36-6) hassas terazide ölçülerek 100 ml'lik TBE (American Bioanalytical, katalog no: AB14024-01000) solüsyonuna konuldu. Agaroz solüsyonu, 665 watt'lık mikrodalgada 2x5 dakika kaynatıldı. Kaynatma sonucunda solüsyonda agaroz parçalarının kalmayıp, berrak bir solüsyon halini almasına dikkat edildi.

**0.5 M EDTA:** 18.6 gr EDTA 80 ml distile suda çözüldü. Solüsyon pH'ı 1 N NaOH eklenerek 8.0'a ayarlandı. Solüsyon hacmi 100 ml'ye tamamlandı.

**10XTBE tamponunun hazırlanması:** 108 gr Tris baz (American Bioanalytical, katalog no: AB02000-01000), 55 gr Borik asit (American Bioanalytical, katalog no: AB00250-00500) ve 0.5 M EDTA'nın (pH=8.0) (American Bioanalytical, katalog no: AB00502) 40 ml'si, 1 litre distile suda çözümlenerek pH'ı 8.3'e ayarlandı. Bu şekilde hazırlanan 10X stok TBE solüsyonu, 1/10 oranında distile su ile dilüye edilerek 1X'lik çalışma solüsyonu oluşturularak kullanıldı.

**Markırın hazırlanması:** aşağıda belirtilen miktardaki solüsyonlarının karıştırılması ile hazırlandı. Hazırlanan markır solüsyonu 50 µl'lik hacimlerde tüplere bölünüp -20 °C'de saklandı.

DNA markır (Invitrogen, katalog no: 10787-018):	96 µl
1XTBE (American Bioanalytical, katalog no: AB14022-01000):	704 µl
6X yükleme boyaması (Invitrogen, katalog no: 10482055):	160 µl

**1XPBS'in hazırlanması:**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Merck, katalog no: M106580.1000):	7.2 gr
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Merck, katalog no: M104873.1000):	0.8 gr
NaCl (Merck, katalog no: M106404.1000):	16 gr

Miktardaki kimyasallar 2 litre distile suda çözülüp, pH değeri 7.3'e ayarlandı.

**Proteinaz K solüsyonu (5 µg/ml):** 100 mg proteinaz (Roche, katalog no: 03115879001) 10 ml distile suda çözülerek, 10 mg/ml konsantrasyonda ana stok hazırlandı. Bu ana stok, 1/2000 oranında distile su ile dilüye edilip; 5 µg/ml konsantrasyonda proteinaz hazırlandı. Çalışma solüsyonu da -20 °C'de saklandı.

**Permeabilizasyon solüsyonu:** aşağıdaki solüsyonları belirtilen konsantrasyonlarda içerecek şekilde 10 ml 1XPBS içinde hazırlandı.

Proteinaz K (10 mg/ml):	5 µl
Tween-20 (Sigma, katalog no: P7949) :	10 µl

**DEPC'li suyun hazırlanması:** 5 ml'lik DEPC (Sigma, katalog no: D575), 5 litre distile suda çözülüp otoklavlandı. Böylece, RNaz içermeyen distile su elde edilmiştir.

**%4 paraformaldehit:** 8 gram paraformaldehit (Sigma, Cas no: 30525-89-4) 150 ml distile suda çözüldü. Paraformaldehitin suda kolay çözünmesi için 4 damla 2 N NaOH konuldu ve manyetik karıştırıcı kullanıldı. Solüsyon berrak bir görünüm aldıktan sonra, 0.22 mikron çapındaki filtre ile süzüldü. Süzülen solüsyonun pH değeri 7.3'e ayarlandı. Son olarak, 50 ml 4XPBS konularak, son hacim 200 ml'ye tamamlandı. Bu şekilde, %4'lük paraformaldehit 1XPBS içinde hazırlanmış oldu.

**Prehibridizasyon solüsyonu:** Aşağıdaki solüsyon ve kimyasallardan belirtilen hacim ve miktarda konularak prehibridizasyon solüsyonu hazırlandı. Bu solüsyon karanlık ortamda saklandı.

Formamid (American Bioanalytical, katalog no: AB00600):	5 ml
EDTA (American Bioanalytical, katalog no: AB00502) (0.5 M):	1 ml
20XSSC (American Bioanalytical, katalog no: AB13156):	2 ml

Tween-20 (Sigma, katalog no: P7949):	10 µl
Bloklama reagenti (Roche, katalog no: 11585762001):	100 mg
Salmon sperm DNA (Stratagene, katalog no: 201190-81):	10 µl
CHAPS (Sigma, katalog no: C5070):	50 mg

### 1XMABT tamponunun hazırlanması:

Maleik asit (Sigma, katalog no: M0375):	11.6 gr
NaCl (American Bioanalytical, katalog no: AB01915):	8.76 gr
Tween-20 (Sigma, katalog no: P7949):	1 µl

miktardaki kimyasallar 1 litre'lik distile suda çözülerek, pH= 7.5'e ayarlandı.

### NTMT tamponu:

NaCl (American Bioanalytical, katalog no: AB01915):	5.8 gr
Tris HCl (American Bioanalytical, katalog no: AB14043-01000):	15.7 gr
MgCl <sub>2</sub> (J.T. Baker, katalog no: 7791-18-6):	4.76 gr
Levamisol (Sigma, katalog no: L9756):	0.48 gr

miktardaki kimyasallar 1 litre distile suda çözülüp, pH=9.5'e ayarlandı.

RNA ISH uygulaması, aşağıda anlatılan basamaklarda gerçekleştirildi.

Postnatal C57BL/6 erkek farelerden servikal dislokasyon işleminden sonra, steril koşullar altında testis organları alındı.

1. Testisler, Bouin fiksatifinde gece boyu (yaklaşık 12 saat) +4 °C'de fikse edildi.
2. Fiksasyon işleminden sonra testisler, çeşme suyu ile yıkanmadan dehidratasyon için artan alkol serilerinden (%70, %80, %90 ve %100'lük etanolden) geçirildi. Alkol serilerindeki bekletme süreleri, %70'de 2 gün, %80 ve %90'luk etanolde birer gün; %100'lük (absolüt) etanolde ise 3 saat olarak gerçekleştirildi.
3. Dehidratasyon işleminden sonra, ksilol (Sigma, katalog no: 16446) uygulaması ile organların şeffaflaştırılmaları ksilol I'de 3 dakika, ksilol II'de 3 dakika ve ksilol III'de ise 3 dakika bekletilerek yapıldı.
4. Şeffaflaştırmadan sonra organların parafinizasyon işlemi gerçekleştirildi. Parafin I, parafin II ve parafin III aşamalarında, birer saat 60 °C'lik etüvde tutulan testisler temiz parafin içine uygun oryantasyonda gömüldüler.
5. Temiz parafin içine gömülen testis örnekleri, bir gün oda ısısında bekletildikten sonra; mikrotomda (Nikon Diaphot 300, Melville, NY, ABD) kesit alınabilmesi için tahtalar üzerine yapıştırıldı. Bloklardan, RNA ISH

uygulamasında kullanılmak üzere pozitif yüklü lamlara 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitlerin alınmasında, rotari mikrotom (Leica, Wetzlar, Almanya) kullanıldı.

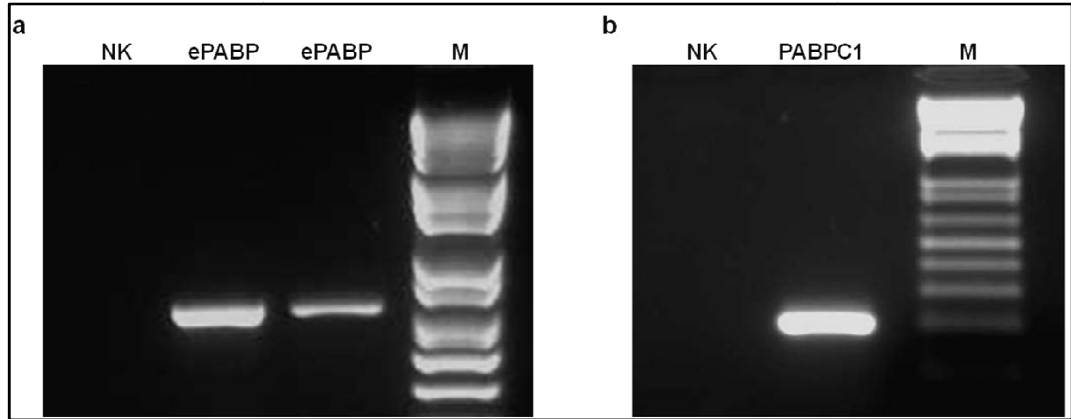
**Çizelge 3.8.** RNA *in situ* hibridizasyon tekniğinde kullanılan primerler. ePABP ve PABPC1 problemlerinin üretimi için, bu primerler kullanılarak PCR reaksiyonları kurulmuştur.

Genin adı	İleri primer (F)	Geri primer (R)	PCR ürün büyüklüğü (bp)
ePABP (1F/5R)	5'-CTCTATGTGGGCGATCTGCAC-3'	5'-TCTGGGCTTCTCATGCTTCTCAA-3'	700
ePABP (1-2F/2R)	5'-CTGACGCGGAACGGGCACTA-3'	5'-CGCGATCCATGTTTATTGTA-3'	226
PABPC1 (1F/2R)	5'-CCCAGCGCCCCAGCTAC-3'	5'-CACGTTCCGCGTCCGCC-3'	234

### 3.2.1. DIG işaretli ePABP ve PABPC1 DNA Problemlerinin Üretimi

RNA ISH uygulamasında kullanılan ePABP ve PABPC1 DNA problemlerinin eldesi, iki aşamalı PCR uygulaması ile gerçekleştirildi.

**I. PCR aşaması:** Birinci PCR, ePABP ve PABPC1 genlerine özgü primerler kullanılarak yapıldı. ePABP geni için birinci PCR aşamasında ergin dişi fareden alınmış ovaryum cDNA'sı kullanılırken; PABPC1 için ise ergin erkek fareden alınmış testis cDNA'sı kullanıldı.



**Şekil 3.1.** ePABP ve PABPC1 genlerinin birinci PCR sonuçları. a) ePABP için birinci PCR uygulamasında iki farklı ovaryum cDNA'sı kullanıldı. Ayrıca, birinci PCR aşamasında 1F/5R primerleri ile 700 bp'lik bir PCR ürünü oluşmuştur. b) PABPC1 geni için birinci PCR aşamasında ise fare testis cDNA'sı kullanıldı. PABPC1 için kullanılan 1F/2R primerleri, 196 bp'lik bir PCR ürünü vermiştir. Markır (Invitrogen, katalog no: 10787-018), 100 bp-12 kb aralığında olup; PCR ürünlerinin boyutlarının değerlendirilmesinde kullanıldı. RT-PCR ve qRT-PCR teknikleri ile elde edilen PCR ürün boyutlarının tahmin edilmesinde markırlar kullanılmaktadır. Böylece, elde edilen PCR ürünlerinin doğruluğu değerlendirilebilmektedir.

ePABP ve PABPC1 genleri için kullanılan primerler Çizelge 3.8'de verildi. ePABP ve PABPC1 genleri için birinci PCR reaksiyonu Çizelge 3.4'de belirtilen içerikler kullanılarak kuruldu.

Elde edilen PCR ürünlerinin 10 µl'si %1.5'lik agaroz jelde (American Bioanalytical, katalog no: 9012-36-6) yürütülerek, ePABP ve PABPC1 PCR ürünleri kontrol edildi (Şekil 3.1). Kalan PCR ürünleri ile de ikinci PCR reaksiyonu kuruldu.

**Çizelge 3.9.** Prob sentezinde kullanılan içerikler ve miktarları. ePABP ve PABPC1 DNA problemleri, DIG işaretli ve DIG işaretiz olarak sentezlendi.

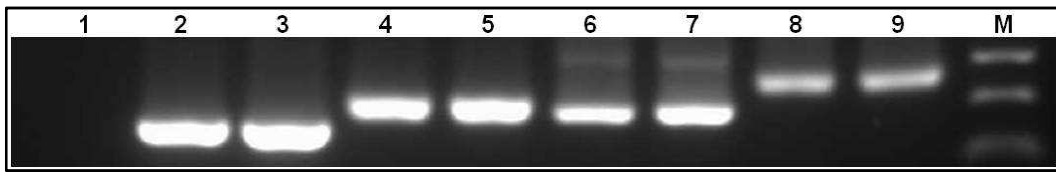
İçerik	Miktar (µl) (İşaretli)	Miktar (µl) (İşaretsiz)	Son konsantrasyon
10X Renkli tampon (Qiagen, katalog no:201203)	5	5	1X
5X Q solüsyonu (Qiagen, katalog no:201203)	10	10	1X
dNTP (5 mM) (Roche, katalog no:11969064001)	-	2	0.2 mM
Primer F (10 µM)	2.5	2.5	0.5 µM
Primer R (10 µM)	2.5	2.5	0.5 µM
Taq DNA polimeraz (Qiagen, katalog no:201203)	0.5	0.5	2.5 ünite/µl
2 mM dACG/1.3 µM dTTP (Roche, katalog no: 11969064001)	5	-	0.2 mM dACG/ 0.13 µM dTTP
DIG-UTP (10 mM) (Roche, katalog no: 11573179910)	1	-	0.2 mM
I. PCR ürünü	2	2	-
Nükleaz içermeyen su (American Bioanalytical, cas no: 7732-18-5)	21.5	25.5	-
<b>Toplam</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	

**II. PCR aşaması:** DIG işaretlemesi bu PCR aşamasında gerçekleştirildi. Reaksiyon içerikleri ve konulan miktarlar Çizelge 3.9'da verildi. İkinci PCR aşamasında ePABP geni için kullanılan primerler aşağıda belirtildi. PABPC1 geni için ise birinci PCR aşamasında kullanılan aynı primer kullanıldı (Çizelge 3.8).

I. ve II. PCR aşamalarında, PCR cihazında (Bio-Rad, iCycler version 4.006, Hercules, CA, ABD) aşağıda belirtilen “touch-down” PCR programı kullanıldı (Çizelge 3.5).

İkinci PCR uygulamasından elde edilen PCR ürünlerinin tamamı, %1.5'lik agaroz jelde (American Bioanalytical, katalog no: AB00972-00500) yürütülerek DIG işaretleme durumu ve PCR ürünleri kontrol edildi (Şekil 3.2).

DIG işaretli PCR ürünleri, işaretli olanlara göre daha yavaş yürümektedir. Agaroz jelden PCR ürünlerinin eldesi, aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleştirildi.



**Şekil 3.2.** ePABP ve PABPC1 genlerinin ikinci PCR sonuçları. PCR ürünleri, %1.5'lük agaroz jelde yürütüldü. DIG ile işaretli olan ePABP ve PABPC1 PCR ürünleri, DIG işaretli olanlara göre daha yavaş yürümüşlerdir. 1: Negatif kontrol; 2, 3: PABPC1-işaretsiz; 4, 5: PABPC1-işaretli, 6, 7: ePABP-işaretsiz, 8, 9: ePABP-işaretli, M: Markır. Markır (Invitrogen, katalog no: 10787-018) 100 bp-12 kb aralığında olup, PCR ürünlerinin boyutlarının değerlendirilmesinde kullanıldı.

### 3.2.2. Agaroz Jelden PCR Ürünlerinin Eldesi

Agaroz jelden DIG-işaretli ve DIG-işaretsiz PCR ürünlerinin eldesinde “QIAEX II, jel gen ekstraksiyon kiti”(Qiagen, katalog no: 20021) kullanıldı.

1. Steril 1.5 ml tüplerin üzerine gerekli bilgiler yazıldıktan sonra, hassas terazide daraları alındı.
2. UV altında agaroz jeldeki PCR ürünleri, bistürü yardımıyla kesilip; steril 1.5 ml'lik tüplere konuldu.
3. Tüpler tekrar ölçülerek, içerisine konulan PCR ürününü içeren jel parçasının ağırlığı belirlendi.
4. QX-1 tamponundan, her tüpe yaklaşık 900 µl konuldu (QX-1 tampon miktarı, 300 mg jel parçası için 300 µl olarak ayarlanmıştır.). Tüplere QIAEX II tamponundan da 10 µl konularak, tüpler iyice karıştırıldı.
5. Tüpler 50 °C'lik su banyosunda 10 dakika inkübe edildi. (İnkübasyon süresinde tüpler her iki dakikada bir karıştırıldı.)



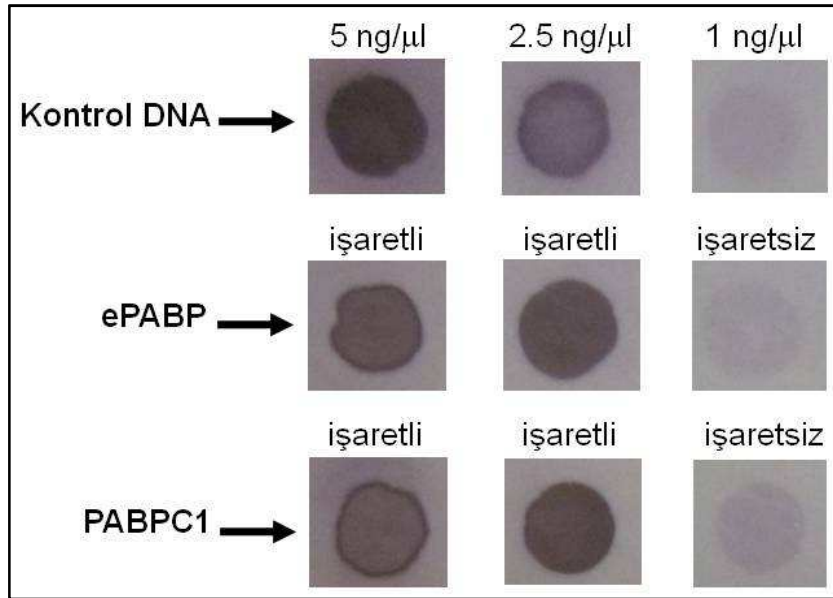
6. Süre sonunda tüpler 13200 rpm'de, 30 saniye santrifüj edildi. Peletin üzerindeki sıvı kısım pipetle dikkatlice alınıp, atıldı.
7. Pelet üzerine yıkama amaçlı (kalan agaroz parçalarını uzaklaştırmak için) 500 µl QX1 tamponundan konulup, karıştırıldı.
8. 13200 rpm'de, 30 saniye santrifüj işleminden sonra süpernatant döküldü. Tüplere, yıkama amaçlı olarak tampon PE'den 500 µl konuldu.
9. Süre sonunda tüpler 13200 rpm'de, 30 saniye santrifüj edildi. Tekrar tampon PE ile yıkama işlemi gerçekleştirildi.
10. Santrifüj sonrası süpernatant döküldü ve tüpler oda ısısında 15 dakika kurumaya bırakıldı.
11. Süre sonunda tüplere 25 µl tampon EB solüsyonundan konulup, 50 °C'lik su banyosunda 10 dakika inkübe edildi. Her iki dakikada bir tüpler karıştırıldı.
12. Süre sonunda tüpler 13200 rpm'de, 30 saniye santrifüj edildi ve DNA'yı içeren sıvı kısım temiz bir tüpe alındı.
13. İşaretli ve işaretsiz DNA prob eldesini arttırmak için 12. ve 13. basamaklar tekrarlandı.

### **3.2.3. DIG İşaretli Prob Miktarının Belirlenmesi**

İşaretli, işaretsiz ve negatif kontrol için elde edilen ürünlerin prob miktarları ve kalitelerinin belirlenmesi için aşağıda belirtilen basamaklar uygulandı. İşaretsiz prob ve negatif kontrollerde reaksiyon olmaması beklenmektedir.

1. DIG-işaretli kontrol DNA'dan (5 ng/µl) (Roche, katalog no: 11585738910), 2.5 ng/µl ve 1 ng/µl'lik dilüsyonlar tampon EB içinde hazırlandı.
2. Naylon membran üzerine DIG-işaretli kontrol DNA'dan ve seri dilüsyonların her birinden birer µl (5 ng/µl, 2.5 ng/µl ve 1 ng/µl) damlatıldı.
3. Aynı membranın alt sırasına elde edilen ePABP ve PABPC1 PCR ürünlerinden (DIG-işaretli, DIG-işaretsiz ve negatif kontrol) birer µl damlatıldı.

4. Membranın kuruması için oda ısısında 15 dakika bekletildi.
5. DNA'ların membrana iyice tutunmasını sağlamak için, membran 2 dakika UV-ışığına maruz bırakıldı.
6. Süre sonunda membran 1X yıkama solüsyonunda (Roche, katalog no: 11585762001) 5 dakika, çalkalayıcıda yıkandı.
7. Yıkama solüsyonu süre sonunda dökülüp, membran üzerine 1X maleik asitte (Roche, katalog no: 11585762001) hazırlanmış olan %1'lik bloklama solüsyonu (Roche, katalog no: 11585762001) konularak 30 dakika, çalkalayıcıda inkübe edildi. (Kit ile 10X konsantrasyonda gelen stok solüsyonlar, steril distile su ile istenilen konsantrasyona dilüye edildi.)



**Şekil 3.3.** ePABP ve PABPC1 problemlerinin miktar analizi. Şekilde üstte, kontrol DNA'nın dilüye edildiği konsantrasyonlar verildi. ePABP ve PABPC1 prob eldesinde işaretli noktalarda sadece çok düşük düzeyde artalan reaksiyonu görülmektedir. ePABP ve PABPC1 problemlerinin miktarları, kontrol DNA'daki reaksiyon şiddeti temel alınarak 3 ng/μl (soldan ilk nokta) ve 4 ng/μl (soldan ikinci nokta) olarak kabul edildi.

8. Süre sonunda, bloklama solüsyonu dökülüp üzerine anti-DIG ve alkalın fosfataz enzimi ile işaretli antikorda (1/5000, %1 bloklama solüsyonu içeren 1X maleik asitte hazırlandı) çalkalayıcıda, 30 dakika inkübe edildi.
9. Membran, aynı koşullarda 1X yıkama solüsyonunda (Roche, katalog no: 11585762001) 2x15 dakika yıkandı.

10. Süre sonunda membran 1X deteksiyon solüsyonunda (Roche, katalog no: 11585762001) çalkalayıcıda, 2 dakika inkübe edildi.
11. Membran üzerine, alkalın fosfataz enzimi ile reaksiyona giren substrat solüsyonu (45 µl NBT ve 35 µl BCIP, 10 ml deteksiyon tamponunda hazırlandı.) konuldu.
12. Hazırlanan substrat solüsyonu membran üzerine konulduktan 3 dakika sonra sadece, işaretli PCR ürünlerinde reaksiyon gözlemlendi. Dilüye edilen kontrol DNA'nın verdiği reaksiyon şiddetine göre üretilen ePABP ve PABPC1 prob miktarları belirlendi (Şekil 3.3).

#### **3.2.4. RNA *In Situ* Hibridizasyon Uygulama Basamakları**

RNA *in situ* hibridizasyon uygulamasında kullanılan solüsyonlar DEPC ile muamele edilmiş distile suda hazırlandı. DEPC, RNaz enzimine bağlanarak inhibe etmektedir. Böylece, hedef dokudaki RNA'lar degradasyondan korunmaktadır.

RNA ISH tekniği, aşağıda belirtilen basamaklarda gerçekleştirildi.

1. Postnatal fare testislerinden alınmış olan kesitleri içeren preparatlar, 60 °C'lik etüvde 1 saat bekletilerek; dokuların lam yüzeyine iyi bir şekilde yapışması sağlandı.
2. Daha sonra, preparatlar iki kez 10 dakika (2x10 dakika) ksilol I ve ksilol II aşamalarından geçirildi.
3. Preparatların rehidratasyonu gerçekleştirildi. Rehidratasyon, azalan etanol serilerinde (%100, %90, %80 ve %70'lik etanol) preparatların beşer dakika tutulması ile yapıldı.
4. Preparatlar, %0.1 dietilpirokarbonat (DEPC) (Sigma, katalog no: D5758) içeren distile suda 2x10 dakika yıkandı. Kesitlerin etrafı hidrofobik kalemle çizilerek, kesitler üzerine konulan damlalarında dağılması önlenmiştir.
5. Preparatlardaki kesitler üzerine permeabilizasyon solüsyonu damlatılarak, 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi.
6. Süre sonunda preparatlar, %4'lük paraformaldehit (J.T. Baker, 30525-89-4) içinde 5 dakika tutularak; postfiksasyonları gerçekleştirildi.
7. Postfiksasyondan sonra preparatlar, %0.1 tween-20 içeren 1XPBS (PBST) içinde 2x10 dakika yıkandı.

8. Yıkama işleminden sonra preparatlar, prehibridizasyon solüsyonunda 37 °C'de 1 saat inkübe edildi.
9. Kullanıma kadar -20 °C'de saklanan proplar, kaynayan suda 5 dakika bekletilerek, denatüre edildi. Prehibridizasyon solüsyonunda 300 ng/ml konsantrasyonda hazırlanan digoxigenin işaretli ePABP ve PABPC1 DNA probları, kesitlerin üzerine damlatıldı. Preparatlar, 42 °C'lik etüvde gece boyu inkübe edildi.
10. Hibridizasyon sonrasında, preparatlar 3x15 dakika 2XSSC'de ve 3x15 dakika 0.1XSSC'de 62 °C'lik etüvde yıkandı.
11. Preparatlar 2x10 dakika MABT'de yıkandı.
12. Preparatlar, NTMT tamponunda 30 dakika bekletilerek, dengelenmesi gerçekleştirildi.
13. Daha sonra preparatlar, bloklama solüsyonunda 30 dakika bekletildi. Bloklama solüsyonu: %1 bloklama reagentı 1XMAB içinde hazırlandı.
14. Preparatlar, 1/800 dilüsyonda hazırlanan alkalin fosfataz ile konjuge edilmiş anti-digoxigenin antikoru (Roche, katalog no: 11093274910), oda ısısında 1 saat inkübe edildi. Alkalin fosfataz antikoru, %1 bloklama solüsyonu içeren 1XMAB içinde hazırlandı.
15. Süre sonunda, preparatlar MABT ile 6x10 dakika çalkalayıcıda yıkandı.
16. Renk solüsyonu (1 ml'lik NTMT tamponu içinde: 4.5 µl/ml 5-bromo, 4-kloro, 3-indolil fosfat (Roche, katalog no: 11383221001) ve 3.5 µl/ml nitroblue tetrazolium (Roche, katalog no: 11383213001) olacak şekilde hazırlandı.) ve kesitlerin üzerine damlatılarak geceboyu (12-16 saat) oda ısısında inkübe edildi. Kesitlerdeki renk oluşum durumu ışık mikroskopunda aralıklarla incelendi.
17. Renk oluşumu gerçekleştikten sonra, preparatlar PBST ile birkaç kez yıkanarak reaksiyon durduruldu.
18. Preparatlar, dehidratasyon (artan alkol serilerinden geçirilerek) ve ksilol uygulamalarının ardından Entellan (Thermo Scientific, katalog no: 8310) ile kapatılıp ışık mikroskopunda ePABP ve PABPC1 mRNA'ların hücresel yerleşimleri analiz edildi.

### **3.3. Postnatal Testis Dokularında Hematoksilen-Eozin Boyaması**

Postnatal testis dokularındaki germ hücre oranlarının belirlenmesi için postnatal testislere hematoksilen-eozin (HE) boyaması yapıldı. Her bir

yaş grubundan (6., 8., 16., 20., 29., 32. ve 88. günler), iki fareden alınan toplam dört adet testis dokusunda sayım gerçekleştirildi. Her bir testis kesitinde rastgele seçilmiş on adet, toplamda 40 adet seminifer tübülde germinal epitel hücreleri sayıldı.

Hematoksilen-eozin boyama aşağıda belirtilen basamaklarda gerçekleştirildi.

1. Preparatlar, 60 °C'lik etüvde 1 saat bekletilerek kesitlerin lam yüzeyine iyi bir şekilde yapışması sağlandı.
2. Daha sonra, preparatlar ksilol I ve ksilol II'de 10'ar dakika bekletildi.
3. Preparatların rehidratasyonu azalan etanol serilerinde (%100, %90, %80 ve %70'lik etanol) preparatların beşer dakika tutulması ile gerçekleştirildi.
4. Preparatlar, çeşme suyunda 2x10 dakika yıkandı.
5. Preparatlar süzölmüş hematoksilen boyasında 2 dakika bekletildikten sonra çeşme suyunda yıkandı. Süre sonunda preparatlar eozin boyasında 15 saniye tutulduktan sonra çeşme suyunda yıkandı.
6. Preparatlar, %70, %80, %90 ve %100'lük etanol serilerinde birer dakika tutularak, dehidratasyonları yapıldı.
7. Son olarak ksilol I ve II'de 10'ar dakika tutulan preparatlar, Entellanla kapatıldı.
8. HE boyanmış testis preparatları, ışık mikroskopunda analiz edilerek spermatogenik hücrelerin oranları belirlendi.

### **3.4. Postnatal Testislerden Spermatogenik Hücre İzolasyonu**

İmmatür (6., 8., 16., 20., 29., ve 32. günler) ve matür erkek fare (88. gün) testislerinden spermatogenik hücreler (spermatogonya, spermatosit, yuvarlak spermatid ve uzamış spermatid) "yerçekimine bağlı çökme hızına" göre %2-4 BSA süreksiz gradiyent yöntemi ile izole edildi. Bu yöntem, farklı çalışmalarda spermatogenik hücrelerin izolasyonu işlemlerinde sıklıkla kullanılmaktadır [110-112].

Ergin erkek fare (88. gün) kauda epididimisinden sperm eldesi de yapıldı. İzole edilen spermatogenik hücre tiplerindeki ePABP ve PABPC1 gen ekspresyon düzeyleri gerçek zamanlı PCR ile belirlendi.

## **Kullanılan solüsyonlar:**

**%0.5 BSA:** 0.5 gram BSA (American Bioanalytical, katalog no: AB01088-00100) 100 ml DMEM:F12 medyumunda çözülerek hazırlandı.

**0.5 mg/ml kollajenaz:** 100 mg kollajenaz, 10 ml sterile distile suda çözülerek 10 mg/ml konsantrasyonda stok solüsyon hazırlandı. Çalışma solüsyonu, stok solüsyonunun 1/20 oranında distile su ile dilüye edilmesi ile hazırlandı. Stok ve çalışma solüsyonları -20 °C'de saklandı.

**0.25 mg/ml tripsin:** %0.05'lik tripsin (Life Technologies, katalog no: 25300096), medyum ile ½ oranında dilüye edilerek 0.25 mg/ml konsantrasyonda tripsin solüsyonu hazırlandı. %0.05'lik tripsin: 100 ml medya içinde 0.05 gram tripsin olduğu anlamına gelmektedir.

**1 µg/ml DNaz:** 100 mg DNaz (Roche, katalog no: 10104159001) 10 ml steril distile suda çözülerek, stok solüsyon hazırlandı. Stok solüsyon 1/10 oranında dilüye edilerek, çalışma solüsyonu (1 mg/ml) hazırlandı. Bu çalışma solüsyonundan 5 µl alınarak, 5 ml medyaya konuldu ve 1 µg/ml DNaz son konsantrasyonu uygulandı. Stok ve çalışma solüsyonları, -20 °C'de saklandı.

Otuz iki günlük farelerin kauda epididimislerinde sperm olmadığı incelendi. Bu amaçla, deneyde kullanılan 32 günlük farelerin kauda epididimisler alınıp; DMEM:F12 medyası içinde parçalandı. Parçalanan kauda epididimis örnekleri 37 °C'de 30 dakika inkübe edildikten sonra inverted mikroskopta kontrol edildi. İncelenen medyum içeriğinde sperm hücresi görülmemesi nedeniyle, bu yaş grubundaki erkek fareler immatür gruba alındı.

Spermatogenik hücreler, postnatal yaşlara bağlı olarak elde edildi. Spermatogonya eldesi, 6., 8., 16., ve 32. günlerden yapılırken; spermatozitler, 16., 29., 32., ve 88. günlerden; yuvarlak spermatidler 32. ve 88. günlerden, uzamış spermatidler ise 88. günden izole edildi. Sperm eldesi ise sadece 88 günlük erkek fareden alınan kauda epididimislerde gerçekleştirildi. Spermatogonyaların ergin erkek fare testisinde az sayıda olması nedeniyle, %2-4 BSA süreksiz gradiyent yöntemiyle yüksek saflıkta eldesi yapılamamıştır. İmmatür ve matür erkek fare seminifer tübüllerden spermatogenik hücrelerin izolasyonu aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleştirildi.

1. İmmatür ve matür erkek farelerden, servikal dislokasyon işleminden sonra steril koşullarda diseke edilen testisler DEMEM:F12 medyumunda bulunan petri kaplarına (Beckman Dickson, katalog no: 351008) alındı.
2. Testislerin kapsülleri soyulduktan sonra, seminifer tübüller 0.5 mg/ml kollajenaz enzimi içeren 5 ml medyuma konuldu.

3. Petri kabındaki seminifer tübüller, diseksiyon mikroskobu altında pens yardımıyla birbirlerinden ayrıldıktan sonra; 20 dakika 34 °C inkübe edildi. İnkübasyon süresince seminifer tübüller diseksiyon mikroskobu altında kontrol edildi ve yavaş bir şekilde elle sürekli çalkalandı.
4. Süre sonunda petri kabının yüzeyinde yer alan intertübüler hücreleri içeren sıvı kısım mikropipetle çekilip, atıldı. Seminifer tübüllerin üzerine tekrar 0.5 mg/ml konsantrasyonda kollajenaz içeren 5 ml medyum konularak, 20 dakika/ 34 °C'de inkübe edildi. İnkübasyon süresince, seminifer tübüller diseksiyon mikroskobu altında kontrol edildi ve elle sürekli çalkalandı.
5. Süre sonunda üstteki sıvı kısım mikropipetle alınıp, atıldı. Seminifer tübüller iki defa 5 ml DMEM:F12 medyumunu ile yıkandı. Böylece, petri kabında sadece seminifer tübüller kalırken tübüller arasındaki hücreler uzaklaştırıldı.
6. Yıkama işleminden sonra seminifer tübüllerin üzerine 0.25 mg/ml tripsin (Life Technologies, katalog no: 25300096) ve 1 µg/ml DNase içeren 5 ml DMEM:F12 medyası konularak 20 dakika, 34 °C'de inkübe edildi. İnkübasyon süresinde seminifer tübüller diseksiyon mikroskobu altında kontrol edildi ve cam Pasteur pipeti ile pipetaj yapıldı. Böylece, seminifer tübüllerdeki spermatogenik hücrelerin ayrılması sağlandı.
7. Pipetaj sonrası petri kabının üzerindeki sıvı kısım 15 ml'lik tüplere (Beckman Dickson, katalog no: 352097) alındı. Altıncı basamak tekrarlanarak, petri kabındaki sıvı kısım aynı tüpe konuldu.
8. Tüpler, 1600 rpm'de 5 dakika, +4 °C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant dökülüp, pelet üzerine %0.5'lik BSA (American Bioanalytical, katalog no: AB01088-00100) içeren medya konulup, pelet süspansiyon edildi.
9. Tüpler, 1600 rpm'de 5 dakika, +4 °C'de tekrar santrifüj edildi. Santrifüj sonrası, süpernatant dökülüp; üzerine 1 µg/ml DNaz içeren %0.5'lik BSA içeren medya konuldu ve tüpler 3 dakika oda ısısında inkübe edildi.
10. Süre sonunda tüpler, 1600 rpm'de, 5 dakika, +4 °C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı ve pelet üzerine %0.5 BSA içeren 3 ml medya ile süspansiyon edildi.
11. Hücre süspansiyonu, sırasıyla 70 ve 40 µm'lik filtrelerden geçirildi.
12. Filtrattaki hücre sayısı, Makler'in çemberi (Sefi-Medical Instruments, İsrail) ile belirlendi. Hücre sayımı, yaklaşık 2 ml medyum ile oluşturulan

süspansasyondan 5 µl alınan Makler'in çemberinde on kare sayılması ile gerçekleştirildi. On karede sayılan toplam hücre sayısı süspansiyonun mililitresindeki milyon hücre sayısını vermektedir.

13. Hücre sayımından sonra, 15 ml'lik tüplere %2-4 BSA gradiyenti hazırlandı. Gradyent hazırlanmasında, tüpe oldukça yavaş bir şekilde önce %10'luk BSA'dan 1 ml konuldu. Sonra sırasıyla %4'ten %2'ye kadar 0.2 birimlik azaltmalar (%4, %3.8, %3.6, %3.4, %3.2,%3.0, %2.8,%2.6, %2.4, %2.2 ve %2'lik BSA'lar medyum içinde hazırlandı) ile oluşturulan % BSA'lardan birer ml yavaş bir şekilde konuldu.
14. Süreksiz %2-4 BSA gradiyentini içeren 15 ml'lik tüpe, 350 000 hücre/ml olacak şekilde %0.5 BSA içeren DMEM:F12 medyada hazırlanan 1 ml spermatogenik hücre karışımı konuldu.
15. Hücre süspansiyonu konulan tüpe, %0.2 BSA'da 1 ml yavaş bir şekilde eklendikten sonra; +4 °C'de 4 saat, çalkalayıcıda (10 saniye/döngü) (VWR, Houston, TX, ABD) inkübe edildi.
16. Süre sonunda tüpün en üst bölgesinden birer ml'lik hacimlerde alınarak, 1.5 ml'lik tüplere konuldu. Tüpler 2000 rpm'de, 5 dakika, +4 °C'de santrifüj edildi.
17. Süpernant döküldü ve pelet süspansiyon edilip, 5 µl alınarak lam üzerine konuldu. Her küçük damla mikromanüplatörde incelenerek, zenginleşmiş spermatogenik hücre fraksiyon bölgeleri belirlendi. Spermatogenik hücrelerin morfolojik görüntüleri temel alınarak ayırt edildi.
18. Spermatogonya, spermatosit, yuvarlak spermatid ve uzamış spermatid olan bölgeler aynı tüplerde toplanıp santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süspansiyon edilen çökeltiden 10 µl alıp lam üzerine yayma yapılarak hematoksilen-eozinle boyandı. Ayrıca, %0.4'lük tripan mavisi (Sigma, katalog no: T8154) ile boyama yapılarak hücrelerin canlılık oranları belirlendi.
19. HE ile boyanması: a) Spermatogenik hücre fraksiyonlarının yayıldığı preparatlar oda ısısında 45 dakika bekletilerek kurumaları sağlandı. b) Süre sonunda preparatlar 2x5 dakika ksilol I ve II aşamalarından geçirildi. c) Azalan alkol serilerinde (%100, %90,%80 ve %70'lik) ikişer dakika tutuldu. d) Distile suda beş dakika tutulan preparatlar 4 dakika hematoksilen de (Sigma, katalog no: HHS128) boyandı. e) Süre sonunda yıkanan preparatlar eozinde (Sigma, katalog no: HT110132) 10 saniye boyanıp, distile su ile yıkandı. f) Artan alkol serilerinden (%70, %80, %90 ve %100) birer dakika bekletilen preparatlar; ksilol I ve ksilol II'de beşer dakika tutulduktan sonra Entellan ile lamel kullanılarak kapatıldı.



20. %0.4'lük tripan mavisi ile hücrelerin canlılık oranlarının belirlenmesi: a) İzole edile her bir hücre fraksiyonundan 1.5 ml'lik steril tüplere 5 µl alınıp, üzerine 5 µl tripan mavisi konulup karıştırıldı. Tüpler, karanlıkta ve oda ısısında 10 dakika inkübe edildi. b) İnkübasyon süresi sonrasında tüpler 2000 rpm'de 5 dakika, +4 °C'de santrifüj edildi. c) Santrifüj sonrasında peletin üzerinde 5 µl'lik sıvı kısım kalacak şekilde süpernatant atıldı. d) Pelet süspanse edildikten sonra, 2 µl alınıp lam üzerine konulup; üzerine lamel kapatılıp ışık mikroskobunda analiz edildi. Her spermatogenik hücre fraksiyonundaki canlılık oranını belirlemek için 100 hücre sayıldı. İçerisine tripan mavisi girmiş olan hücreler, ölü olarak kabul edildi.
21. HE ile boyanmış olan hücreler ışık mikroskobunda incelenerek spermatogonya, spermatosit, yuvarlak spermatid ve uzamış spermatidlerin izole edildiği fraksiyonlardaki saflık oranları belirlendi. Spermatositler, en büyük hücreler olması (yaklaşık 11 µm) ve küçük noktali kromatin yapıları temel alınarak ayırt edildi. Yuvarlak spermatidler ise 6-7 µm çapında olmaları, yuvarlak nükleusu, belirgin nükleolusu ve nükleusun ön kısmında akrozom yapısının görülmesi ile tanımlandı. Uzayan spermatidler, çekirdeğin uzamaya başlaması ve kamçının görülmeye başlaması ile ayırt edildi. Uzamış spermatidler ise kanca şekilli baş, uzun kamçı ve çok az sitoplazma içermesi ile tanımlandı. Uzayan ve uzamış spermatidler uzamış spermatid grubunda toplandı. Her hücre fraksiyonundaki spermatogenik hücrelerin saflık oranları, ışık mikroskobu ile 100 adet sayılarak bulundu. Saflık oranı %77'den fazla olduğu belirlenen spermatogenik hücre fraksiyonları, RNA izolasyonunda kullanıldı.
22. İzole edilen spermatogenik hücrelerden total RNA izolasyonu, cDNA eldesi ve gerçek zamanlı PCR uygulamaları ile ePABP ve PABPC1 gen ekspresyon düzeyleri kantitatif düzeyde belirlenip, karşılaştırıldı.

#### **3.4.1. Spermatogenik Hücrelerden Total RNA İzolasyonu**

İzole edilen spermatogenik hücrelerden total RNA izolasyonu kit (Ambion, katalog no: AM1931) ile yapıldı.

1. İzole edilen spermatogenik hücreyi içeren 1.5 ml'lik tüpe, 100 µl lizis solüsyonu konulup, +4 °C, 10 dakika tutuldu.
2. Üzerine 50 µl %100'lük etanol eklenip, vorteks ile iyice karıştırıldı.
3. Lizat ile etanol karışımı belirli bir por çapına sahip filtre içeren tüpe mikropipetle konuldu, böylece karışımdaki RNA'lar filtreye tutundu.
4. Mikropipetle yıkama solüsyonu-1'den 180 µl çekilip, filtrenin üzerine konuldu ve tüpler 13200 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.

5. Yıkama solüsyonu-2'den çekilen 180 µl ile filtre tekrar yıkandı. Yıkama solüsyonu-2 ile tekrar yıkama işlemi gerçekleştirildi.
6. Filtre ilk tüpten alınıp, ayırma tüpüne yerleştirildi. Dört derecede saklanan ve kullanım öncesi 75 °C'ye ısıtılan ayırma solüsyonundan 6 µl alınıp, filtrenin tam merkezine gelecek şekilde konuldu. Tüplerin kapağı kapatılıp, oda ısısında 1 dakika bekletildikten sonra; 13200 rpm hızda 1 dakika santrifüj edildi.
7. Aynı işlem 75 °C ısısındaki 6 µl'lik ayırma solüsyonu ile bir kez daha yapıldı; bu işlem RNA'ların mikro ayırma tüpünün dibine toplanması sağlandı.
8. Ayırma tüpünün dibinde toplanan ve RNA'yı içeren yaklaşık 10 µl'lik kısım steril 0.2 ml'lik tüplere alındı.
9. Elde edilen total RNA'ya DNaz uygulaması, cDNA eldesi ve qRT-PCR uygulamaları aşağıda basamaklarda belirtildiği gibi gerçekleştirildi.

#### **3.4.2. Spermatojenik Hücrelerden Elde Edilen Total RNA'ya DNaz Uygulaması**

İzole edilen total RNA örneklerinden genomik DNA'nın uzaklaştırılması için DNaz uygulaması aşağıdaki basamaklarda gerçekleştirildi. İzole edilen spermatojenik hücrelerden elde edilen RNA'nın az olması nedeniyle elde edilen total RNA'nın tamamı kullanıldı.

1. Çizelge 3.1'de verilen reaksiyon içerikleri 0.2 ml'lik steril tüplere konulup, 37 °C'de 45 dakika inkübe edildi.
2. Süre sonunda tüplere 1.2 µl DNaz I inaktivasyon solüsyonundan konulup, tüpler iyice karıştırılıp; oda ısısında 2 dakika inkübe edildi.
3. Son olarak tüpler, 13200 rpm'de, +4 °C'de, 3 dakika santrifüj edildi.
4. Santrifüj sonrası RNA'yı içeren süpernatantlar, yeni steril 0.2 µl'lik tüplere alındı.

#### **3.4.3. Spermatojenik Hücrelerden cDNA Eldesi**

İzole edilen spermatojenik hücre fraksiyonlarından elde edilen total RNA'nın tamamı cDNA elde edilmesinde de kullanıldı. cDNA eldesinde kit (Ambion, AM1710) kullanıldı.

1. Yaklaşık 10 µl'lik hacimdeki total RNA üzerine 2 µl random dekamer (son konsantrasyon 5 µM olacak şekilde) eklendi (Çizelge 3.2). RNA ve

random dekamer karışımı, 85 °C'de 3 dakika inkübe edilerek, sekonder RNA kıvrımlarının açılması sağlandı.

2. Her bir tüpe, homojen ve eşit miktarda reaksiyon karışımı ekleyebilmek amacıyla bir ana karışım hazırlandı. Elde edilen karışımdan her bir tüpe 8 µl konuldu (Çizelge 3.2).
3. Daha sonra, her bir tüpe 8 µl ana karışımdan eklenerek, 44 °C'de, 60 dakika inkübe edildi.
4. Son olarak, tüpler 92 °C'de 10 dakika bekletildi.
5. Bu aşamalardan sonra elde edilen cDNA'lar, qRT-PCR'de kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklandı.

#### **3.4.4. Spermatozit ve Yuvarlak Spermatozid Fraksiyonlarında Scp3 ve Prm2 Ekspresyonu**

Spermatozit ve yuvarlak spermatozid fraksiyonlarında sinaptonemal kompleks 3 (Scp3) ve Protamin 2 (Prm2) ekspresyon durumları RT-PCR uygulaması ile kontrol edildi. Scp3, spermatozit belirteci olması nedeniyle spermatozit fraksiyonunda yüksek, yuvarlak spermatozid fraksiyonunda ise düşük düzeyde eksprese olması beklenmektedir. Prm2 ise spermatozid belirteci olup, yuvarlak spermatozid fraksiyonunda yüksek, spermatozit fraksiyonunda ise düşük düzeyde eksprese olması beklenmektedir.

Scp3, Prm2 ve beta aktin genleri için kullanılan primer dizileri Çizelge 3.3'de verildi.

Spermatozit ve yuvarlak spermatozid fraksiyonlarından yukarıda anlatıldığı şekilde elde edilen cDNA'lar, PCR reaksiyonunun kurulmasında kullanıldı.

RT-PCR uygulamasının PCR aşaması aşağıda belirtilen basamaklarda gerçekleştirildi.

1. Scp3, Prm2 ve beta aktin genleri için aşağıda belirtilen miktarları içeren temel karışım hazırlandı (Çizelge 3.4). Ayrıca, cDNA içermeyen negatif kontrol tüpü de oluşturularak herhangi bir DNA kontaminasyonu olmadığı da gösterildi.
2. Prm2, Scp3 ve beta aktin için amplifikasyon, 35 döngü olarak aşağıda belirtilen PCR protokolü kullanılarak gerçekleştirildi. PCR protokolü olarak touch-down sistemi kullanıldı (Çizelge 3.5).

3. Kurulan reaksiyon sonucunda elde edilen PCR ürünleri markır (Invitrogen, katalog no: 10787-018) ile birlikte, hazırlanan %1.5'lik agaroz (American Bioanalytical, katalog no: AB00972-00500) jelde yürütüldü. Tüm ürünler, jelde 100 voltta (3.0 Amper, 300 W) 45 dakika yürütüldü. Böylece, spermatogenik hücre fraksiyonlarında, Prm2 ve Scp3 genlerinin kalitatif ekspresyon düzeyleri, beta aktin ekspresyonu temel alınarak değerlendirildi.

#### **3.4.5. Spermatogenik Hücrelere Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR Uygulaması**

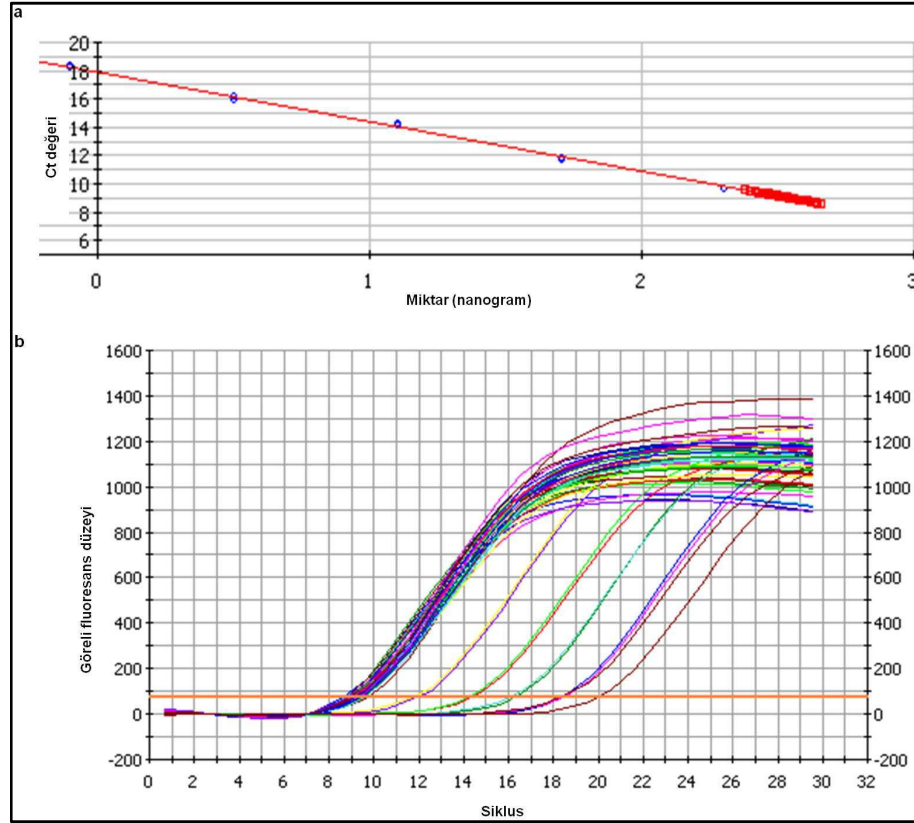
Her hücrede sabit miktarda eksprese olduğu bilinen beta aktin gen ekspresyonu temel alınarak spermatogenik hücrelerde ve kauda epididimisten elde edilen spermde, ePABP ve PABPC1 genlerinin görel kantitatif düzeyleri belirlendi. Ayrıca, ergin erkek fare testisinden elde edilen cDNA'nın ¼'lük seri dilüsyonları (S1'den S7'ye kadar) oluşturularak ePABP, PABPC1 ve beta aktin mRNA'larının görel miktarları ve PCR verimlilikleri standarda bağlı olarak belirlendi.

1. İzole edilen spermatogenik hücre ve spermden elde edilen cDNA'lar bu aşamada kullanıldı.
2. Çizelge 3.6'de belirtilen içerikler konularak reaksiyon karışımı oluşturuldu. Gerçek zamanlı PCR aşamasında kullanılan primerler de Çizelge 3.3'de verildi.
3. Standard için kullanılan fare ovaryum cDNA'sının seri dilüsyonları: Her tüpte (S1-S7), cDNA/steril distile su oranı ¼ olacak şekilde hazırlandı.
4. ePABP, PABPC1, beta aktin ve standartlar için gerçek zamanlı PCR uygulaması üçlü kuyucuklu (triplicate) olarak gerçekleştirildi. Negatif kontrol tüpleri de her bir gen için üçlü olarak hazırlandı.
5. Bütün tüplerdeki örnekler 25 µl hacimde 96'luk kuyucukları (Applied Biosystem, katalog no: N8010560) konuldu.
6. ePABP, PABPC1, beta aktin ve standard için hazırlanmış örnekler kantitatif gerçek zamanlı PCR aletinde okutuldu ve software programı yardımıyla görel ekspresyon düzeyleri hesaplandı. Amplifikasyon, 40 siklusta gerçekleştirildi. Ayrıca, Melting curve analizi ile ürünlerin beklenen ve gözlenen Tm değerleri karşılaştırılarak PCR ürünlerinin doğruluğu değerlendirildi. Gerekli görüldüğü taktirde, gerçek zamanlı PCR ürünleri %1.5'luk agaroz jelde yürütülerek ürünlerin kalitesi ve negatif tüpler kontrol edildi. Gerçek zamanlı PCR programında, Touch-down sistemi kullanıldı (Çizelge 3.7).

Gerçek zamanlı PCR aletinin standardına göre miktarlarını temel olarak vermiş olduğu konsantrasyon değerlerine göre genlerin kat olarak ekspresyon değişimleri řu şekilde hesaplandı: Beta aktin için l tüplerden elde edilen üç değerin ortalaması alındı. ePABP ve PABPC1'in görelilik miktarlarını normalize etmek için bütün gruplarda elde edilen ePABP ve PABPC1 değerleri tek tek ortalama aktin değerinden çıkarıldı. Son olarak, ePABP ve PABPC1 normalize değerlerinin her biri kendi içinde en küçük değere oranlanarak görelilik kat değişimleri hesaplandı. Böylece, immatür ve matür erkek farelerden izole edilen spermatogenik hücrelerdeki ePABP ve PABPC1 genlerinin kantitatif ekspresyon düzeyleri belirlendi.

## BULGULAR

Bu çalışmada, C57BL/6 immatür ve matür erkek fare testis dokularında ePABP ve PABPC1 gen ekspresyonlarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda ilk olarak immatür (6., 8., 16., 20., 29., ve 32. günler) ve matür erkek (88. gün) fare testis dokularında ePABP ve PABPC1 gen ekspresyonları kantitatif bir yöntem olan qRT-PCR ile gösterildi.

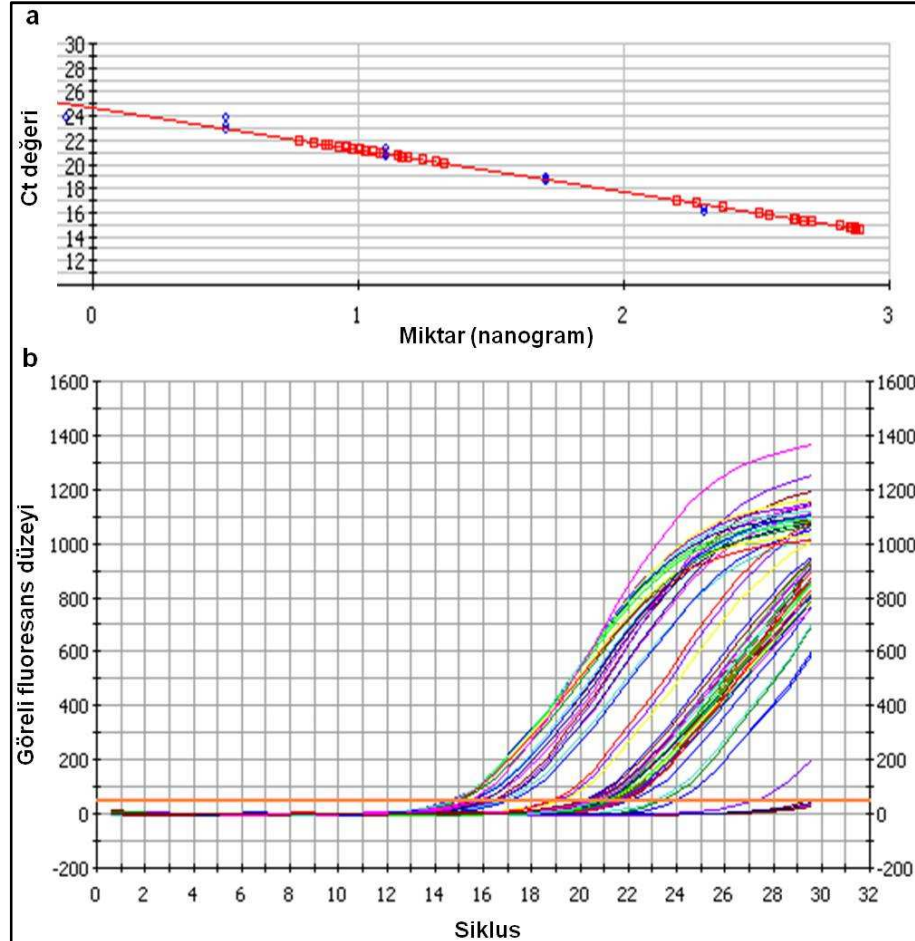


**Şekil 4.1.** Aktin için oluşturulan standard ve qRT-PCR eğrileri. a. Aktin primerleri ile fare ovaryum cDNA'ları ile oluşturulan standard eğrinin eğimi -3.49, PCR verimliliği ise %93.4 olarak bulunmuştur. Küçük mavi yuvarlaklar, standardın verilerini gösterirken; kırmızı küçük kareler ise örneklerin değerlerini göstermektedir. b. Postnatal testis dokularında görel (göreceli) aktin mRNA düzeylerinin belirlendiği sigmoid eğriler görülmektedir.

Ayrıca, postnatal fare testis dokularında spermatogonya, spermatozoid, yuvarlak spermatozoid ve uzamış spermatozoid izolasyonları gerçekleştirildi. Matür erkek fare kauda epididiminden ise sperm elde edildi.

Elde edilen bu spermatogenik hücrelerde ePABP ve PABPC1 genlerinin ekspresyon durumları da qRT-PCR yöntemi ile değerlendirildi.

ePABP mRNA'sının postnatal fare testislerindeki hücresel yerleşimi RNA ISH tekniği ile belirlendi. Matür erkek fare testis dokusunda PABPC1 mRNA'sının hücresel yerleşimi gösterildi ve ePABP ile karşılaştırıldı.



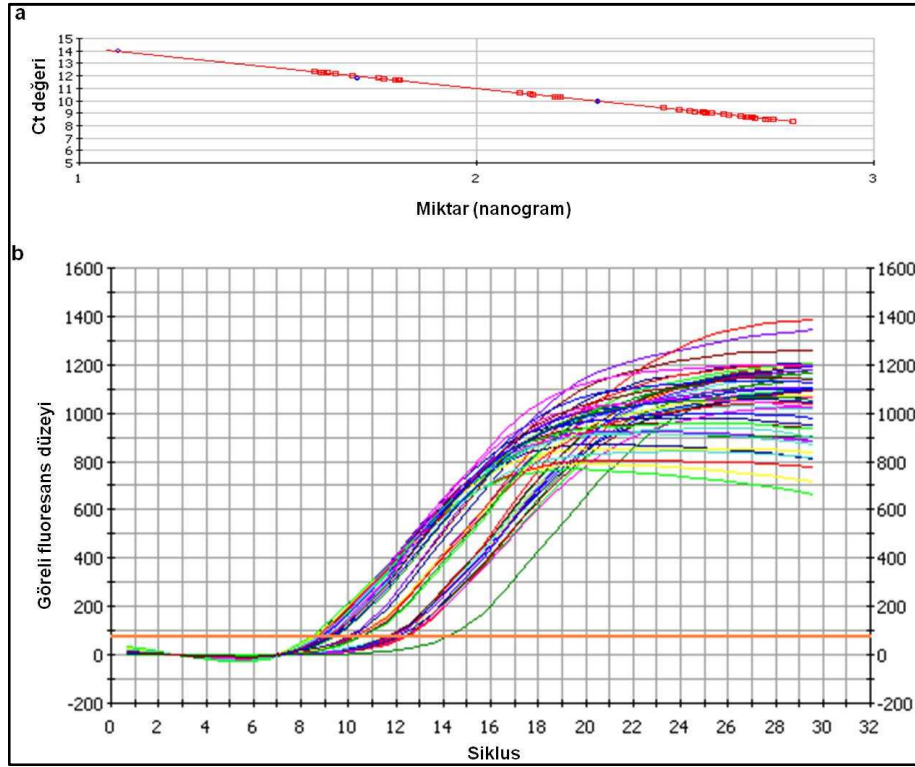
**Şekil 4.2.** ePABP için oluşturulan standard ve qRT-PCR eğrileri. a. ePABP primerleri ile fare ovaryum cDNA'ları kullanılarak oluşturulan standard eğrinin eğimi -3.503, PCR verimliliği ise %92.9 olarak bulunmuştur. b. Postnatal testis dokularında görel ePABP mRNA düzeylerinin belirlendiği sigmoid eğriler görülmektedir.

#### 4.1. Postnatal Testislerde ePABP ve PABPC1 Ekspresyonu

Çalışmada ilk olarak, immatür ve matür erkek fare testis dokularında ePABP ve PABPC1 gen ekspresyon düzeyleri kalitatif bir yöntem olan RT-PCR ile analiz edildi. Aynı genlerin ekspresyonları, kantitatif bir yöntem olan qRT-PCR ile de belirlendi. Bu amaç için beta aktin, ePABP ve PABPC1 genleri için seri dilüsyonlar ile standartlar oluşturuldu.

Aktin geni için eğim değeri -3.49 bulunurken; PCR verimliliği ise %93.4 olarak bulunmuş (Şekil 4.1a). Aktin geni için postnatal testis dokularında

belirlenen gerçek zamanlı PCR eğrileri Şekil 4.1b'de verilmiştir. ePABP ve PABPC1 primerleri kullanılarak oluşturulan standard ve postnatal testis dokularındaki gerçek zamanlı PCR sigmoid eğrileri sırasıyla Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'de verildi. ePABP geni için oluşturulan standard eğrinin eğimi -3.503, PCR verimliliği ise %92.9 olarak bulundu. PABPC1 geni için oluşturulan standardın eğimi -3.349, PCR verimliliği ise %98.9 olarak hesaplandı.



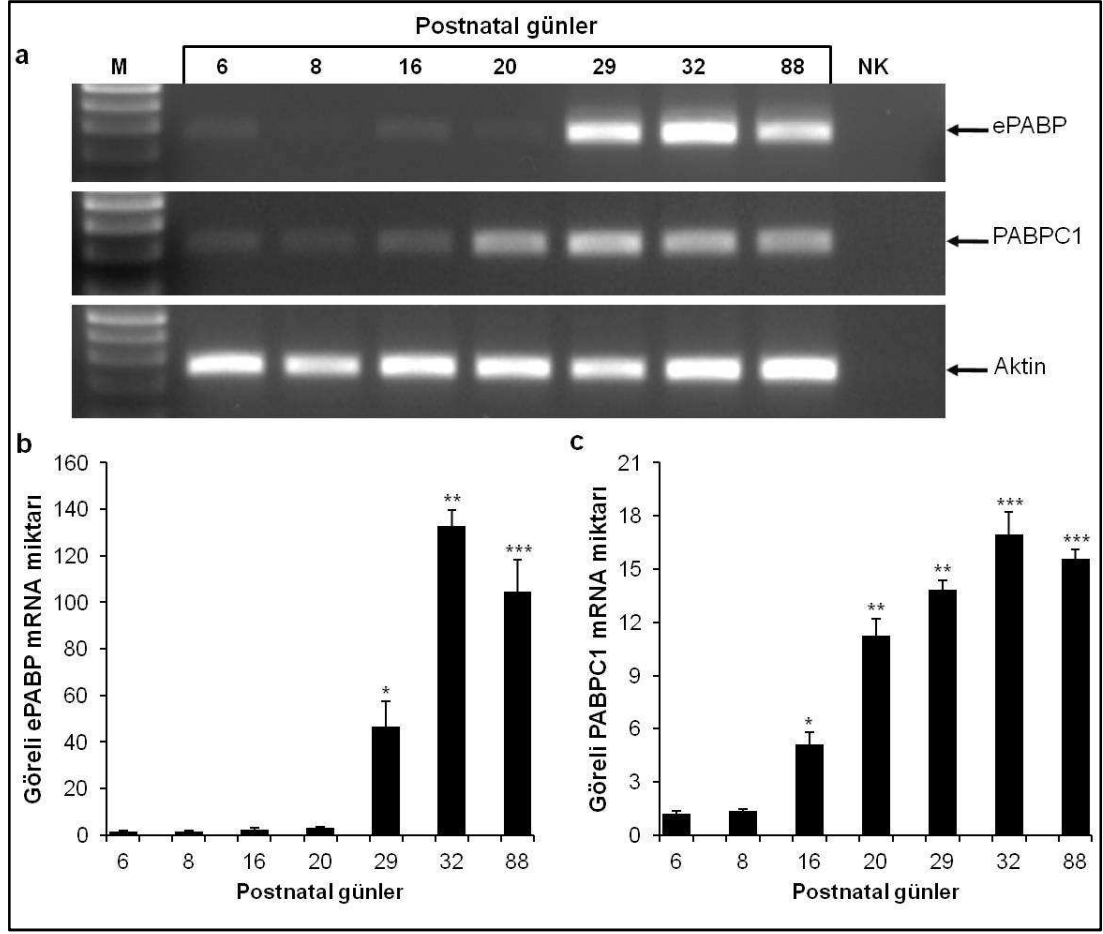
**Şekil 4.3.** PABPC1 için oluşturulan standard ve qRT-PCR eğrileri. a. PABPC1 primerleri ile fare ovaryum cDNA'ları kullanılarak oluşturulan standard eğrinin eğimi -3.349, PCR verimliliği ise %98.9 olarak bulundu. b. Postnatal testis dokularında görel ePABP mRNA düzeylerinin belirlendiği sigmoid eğriler görülmektedir.

ePABP gen ekspresyonu erken postnatal gelişim dönemleri olan 6., 8., 16. ve 20. gün immatür testislerde oldukça düşük düzeyde bulundu.

Postnatal gelişimin ilerleyen günlerinde (29., 32., ve 88. günlerde) ise ePABP gen ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yükselmiştir. ePABP mRNA düzeyi ilk olarak 29. günde belirgin bir artış gösterdi ve bu artış 32. gün testiste de devam etmiştir (Şekil 4.4a ve b).

ePABP ekspresyon düzeyi matür testiste (88. gün) ise 32. güne göre biraz azaldığı görüldü. Matür testisteki ePABP mRNA düzeyinin, 29. gün testiste göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu da belirlenmiştir (Şekil 4.4a ve b).





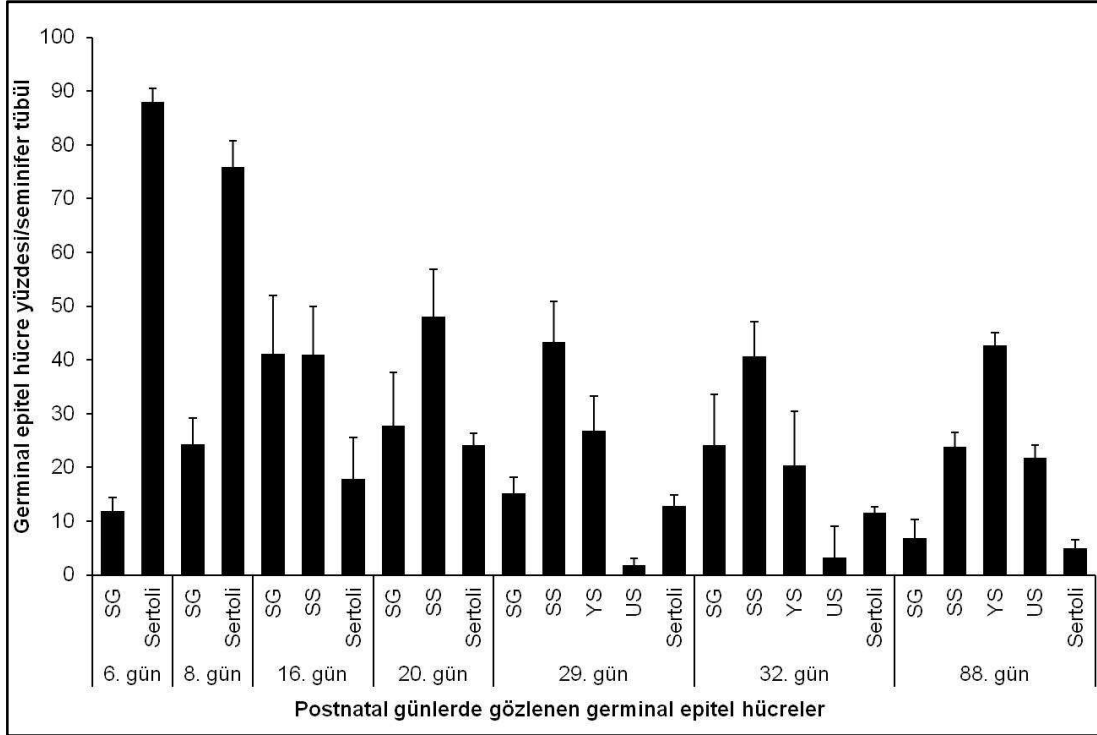
**Şekil 4.4.** ePABP ve PABPC1 genlerinin RT-PCR ve qRT-PCR sonuçları. a) Kalitatif ePABP ve PABPC1 genlerinin ekspresyonları 6-88 günlük postnatal testislerde analiz edildi. Beta aktin, yükleme kontrolü olarak kullanıldı. NK: negatif kontrol, M: DNA markırını belirtmektedir. b) Postnatal testislerdeki (6-88. gün) ePABP gen ekspresyonu qRT-PCR tekniği ile ortaya konuldu. c) PABPC1 gen ekspresyon düzeyi de qRT-PCR ile belirlendi. Yıldız(lar), istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir. İstatistiksel anlamlılık için  $P$  değeri  $< 0.05$  olarak kabul edilmiştir.

PABPC1 gen ekspresyon düzeyi ise 6. ve 8. gün testislerde oldukça düşük düzeydeyken, 16. günde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır. Bu artış 20., 29. ve 32. gün testislerde de devam etmiştir. Matür erkek fare testisinde (88. günde) PABPC1 ekspresyonu, 32. güne göre düşük miktarda bir azalma göstermiştir. PABPC1 gen ekspresyonu da ePABP'ninkine benzer olarak 32. gün testiste en yüksek düzeyine ulaşmıştır (Şekil 4.4b ve c).

#### 4.2. Postnatal Testislerde Germinal Epitel Hücrelerinin Oranı

Postnatal testis gelişim dönemlerine bağlı olarak spermatogonya, spermatozoid, yuvarlak spermatozoid, uzamış spermatozoid ve Sertoli hücrelerinin oranları belirlenmiştir. Bu amaç için her bir yaş grubundaki (6., 8., 16., 20., 29., 32. ve 88. günler) iki fareden alınan toplam dört adet testis dokusundan

alınan ve HE ile boyanmış kesitlerde rastgele toplamda 40 adet seminifer tübüldeki germinal epitel hücreleri sayıldı (Şekil 4.5). Bu sayımlar ile spermatogenik hücrelerin postnatal döneme bağlı oranları ölçüsündeki ePABP ve PABPC1 gen ekspresyon düzeylerine katkı düzeyleri değerlendirildi.

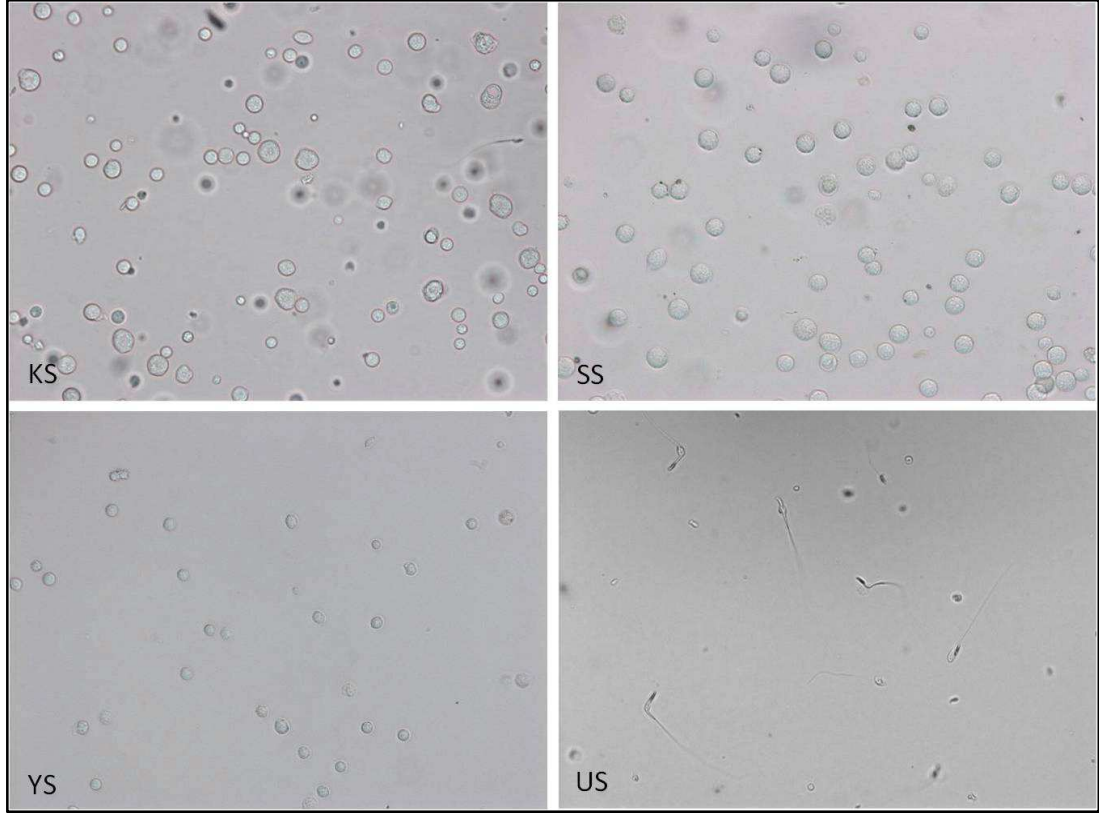


**Şekil 4.5.** Postnatal testislerde germinal epitel hücre yüzdeleri. Germinal epitel hücrelerinin postnatal testis gelişim günlerindeki (6., 8., 16., 20., 29., 32. ve 88. günlerde) yüzde oranları değişimleri göstermektedir. SG: spermatogonya, SS: spermatozoa, YS: yuvarlak spermatozoa, US: uzamış spermatozoa.

İlk olarak 6 günlük postnatal testiste germinal epitel hücre sayımı gerçekleştirildi. Bu dönemde seminiferöz tübüllerde sadece spermatogonya ve Sertoli hücreleri bulunmaktadır. Sertoli hücre oranı 6. günde yaklaşık %88 olup, oldukça yüksektir. Sertoli hücre oranı 8. günde de yüksek oranda (yaklaşık %76) olmasına rağmen 16., 20., 29., 32. ve 88. günlerde diğer spermatogenik hücrelerin seriyeye katılmasıyla birlikte oranı düşmektedir. Ergin farede ise YS ve US hücrelerinin sayılarının artması, Sertoli hücre oranının ~%5'lere düşmesine neden olmuştur.

Spermatogonyaların oranı ise 6. günden 16. güne doğru yükselmiş, fakat 20., 29. ve 88. günlerde ise yavaş yavaş düştüğü gözlenmiştir. Otuz iki günlük testiste, 6., 29. ve 88. günlere göre SG'lerdeki hafif düzeydeki yükselmeye dikkati çekmektedir. Spermatozoaların oranları incelendiğinde bu hücrelerin 16., 20., 29. ve 32. günlerde yüksek oranda (%40-%48) olmasına rağmen ilginç bir şekilde ergin farede oranının düştüğü (%24) görülmektedir. Postnatal gelişimin 29. gününden itibaren sayımını gerçekleştirdiğimiz

yuvarlak spermatidlerin oranının ergin farede arttığı gözlemlendi. YS'lere benzer olarak US'lerin 29. (%2) ve 32. günlerde (%3) oldukça düşük düzeydeyken, 88. günde belirgin oranda arttığı (%22) ortaya konuldu.

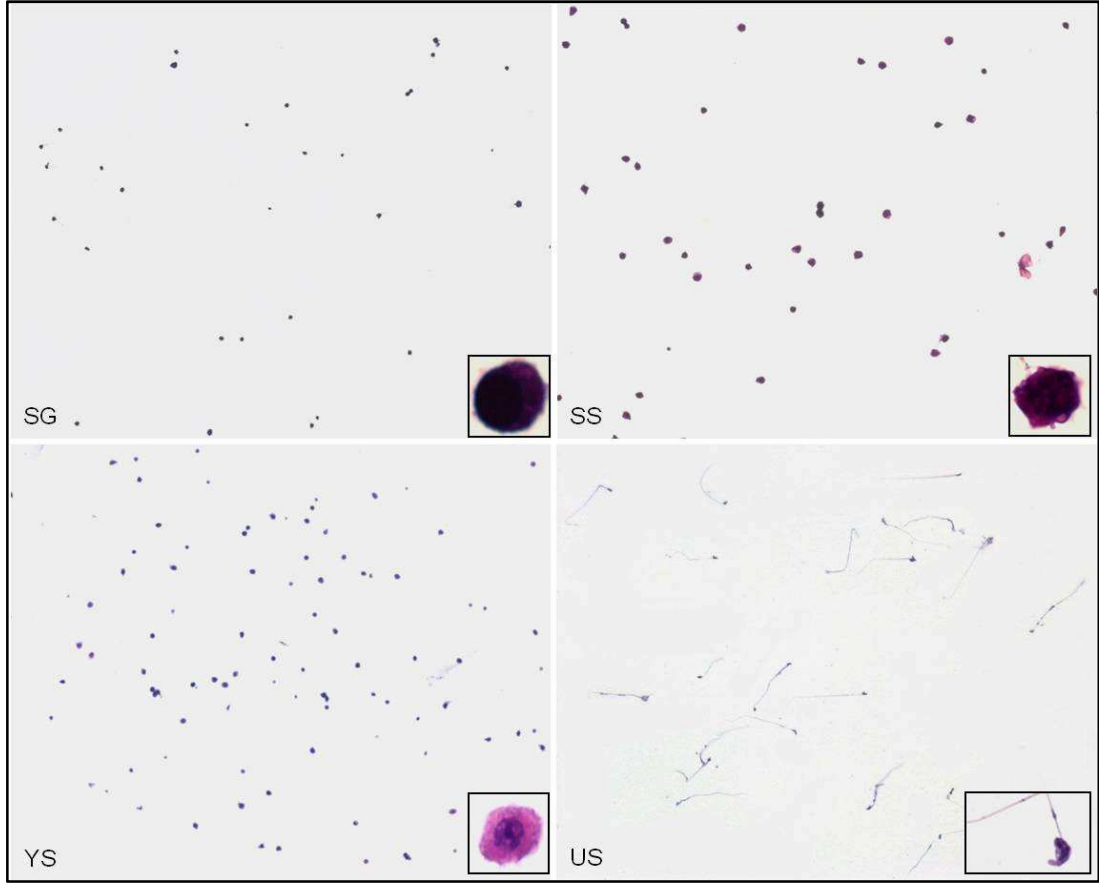


**Şekil 4.6.** Ergin fare testisinden izole edilen spermatogjenik hücreler. Spermatogjenik hücreler seminifer tübüllerden kollajenaz ve tripsin uygulamaları ile karışık spermatogjenik hücreler olarak (KS) izole edildi. Spermatogjenik hücrelerin %2-4 BSA gradiyenti ile fraksiyonlara ayrılarak spermatosit, yuvarlak spermatid ve uzamış spermatid fraksiyonları elde edildi. Her spermatogjenik hücre tipinin izolasyon sonrası ışık mikroskopik incelemeleri gerçekleştirildi. KS: karışık spermatogjenik hücreler, SS: spermatosit, YS: yuvarlak spermatid, US: uzamış spermatid.

#### 4.3. Postnatal Testislerde Spermatogjenik Hücre İzolasyonu

RT-PCR ve qRT-PCR yöntemleri ile ePABP ve PABPC1 genlerinin postnatal hayatın belirli günlerinde farklı ekspresyonlar sergiledikleri belirlendi. Postnatal testislerde ePABP ve PABPC1 gen ekspresyonlarındaki bu farklılığın kaynağını belirlemek için spermatogjenik hücrelerin izolasyonu gerçekleştirildi. Spermatogjenik hücre izolasyonu, günlere bağlı olarak belirli günlerdeki immatür ve matür erkek fare testislerinden yapıldı. Spermatogonyalar 6., 8., 16., ve 32. günlerdeki testislerden izole edildi. Ergin erkek fare testisinde (88. gün) az sayıda spermatogonya bulunması nedeniyle %2-4 BSA süreksiz gradiyent uygulaması ile bu hücrelerin yüksek saflıkta izolasyonu yapılamamıştır. Spermatosit izolasyonu ise 29., 32. ve 88. gün testislerden gerçekleştirildi. Yuvarlak spermatid eldesi ise 32. ve 88.

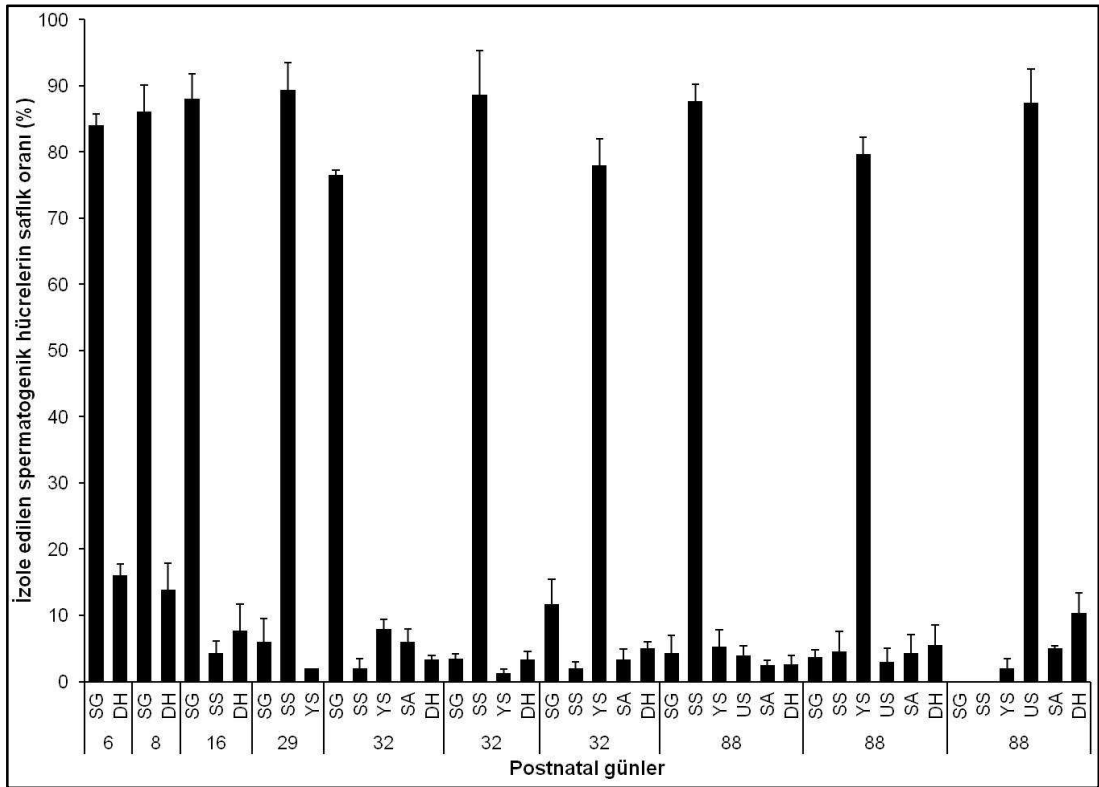
günlerden; uzamış spermatid ise sadece 88. günden izole edildi. Sperm izolasyonu, 88. gün erkek farelerin kauda epididimislerinden gerçekleştirildi. İzole edilen spermatogenik hücreler, ilk olarak ışık mikroskopik olarak değerlendirildiler. Ergin erkek fare testisinden izole edilen germ hücrelerine ait boyanmamış, ışık mikroskopik örnek resimler şekil 4.6'da verildi.



**Şekil 4.7.** İzole edilen spermatogenik hücrelerin HE boyanmış resimleri. İzole edilen spermatogenik hücre fraksiyonlarından, yayma ile hazırlanan preparatlar HE ile boyandı. Matür ve immatür erkek fare testislerinden her izolasyon işlemi sonrası elde edilen farklı fraksiyonlardan 100 hücre, ışık mikroskopunda incelendi. Böylece, her fraksiyondaki izole edilen spermatogenik hücrelerin yüzde saflık oranları belirlendi. SG: spermatogonya, SS: spermatosit, YS: yuvarlak spermatid, US: uzamış spermatidi göstermektedir. Büyük resimler 100X orijinal büyütmede, büyük resimlerin sağ alt köşesindeki küçük resimler ise 1000X orijinal büyütme ile elde edildi.

İmmatür ve matür testislerden izole edilen spermatogenik hücre fraksiyonlarının yayma preparatları hazırlanıp, HE ile boyandı. HE ile boyanmış preparatlar, ışık mikroskopunda analiz edilerek her bir spermatogenik hücre fraksiyonundaki saflık oranı belirlendi. Her bir izolasyon işleminden elde edilen hücre fraksiyonundan 100 hücre analiz edilip, ortalamaları alındı. İzole edilen spermatogenik hücrelerin saflık oranları  $\geq 77\%$  olarak bulundu.

Şekil 4.7’de izole edilen spermatogenik hücrelerin HE ile boyanmış örnek resimleri görülmektedir. Şekil 4.8’de ise her fraksiyondan elde edilen spermatogenik hücrelerin saflık oranları verilmiştir. Spermatogenik hücrelerin ayırımında HE ile boyama sonucu elde edilen morfolojik özellikleri temel alındı. Spermatogonyalar, 5 µm’lik çapa sahip olması ve noktalı kromatin görüntüsü ile ayırt edildi. Spermatozidler, en büyük hücreler olmaları (~12 µm) ve küçük noktalı kromatin yapıları temel alınarak tanımlandı. Yuvarlak spermatozidler ise 6-7 µm çapında olmaları, yuvarlak nükleusları, belirgin nükleolusu ve nükleusun ön kısmında akrozom yapısının görülmesi ile diğer spermatogenik hücrelerden ayrıldı. Uzun spermatozidler ise kanca şekilli baş, kamçı ve çok az sitoplazma içermeleri ile tanımlandı.

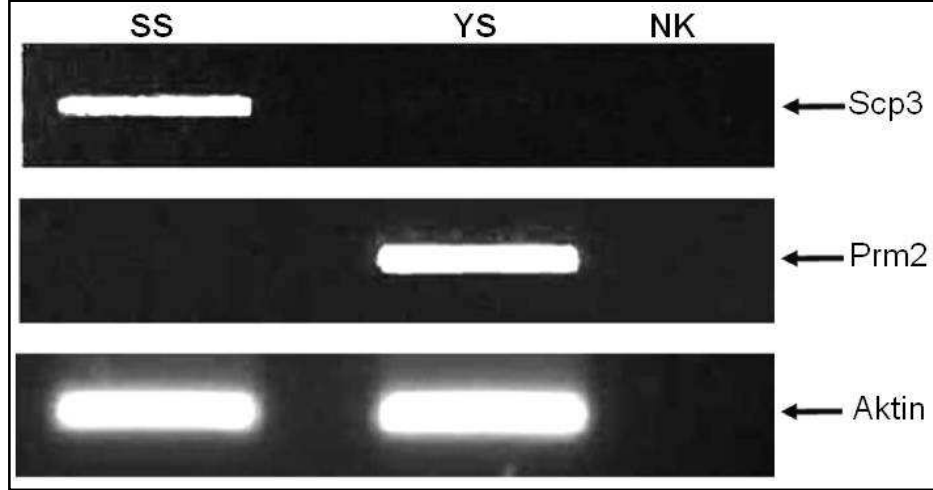


**Şekil 4.8.** İzole edilen spermatogenik hücrelerin saflık oranları. İmmatür ve matür erkek fare testislerinden spermatogenik hücrenin izolasyonu, %2-4 BSA gradient yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. Grafikte, her sütunun altında spermatogenik hücre izolasyonu için kullanılan farenin yaşı verildi. SG: spermatogonya, YS: yuvarlak spermatozid, US: uzun spermatozid, SA: Sitoplazmik atılım, DH: diğer hücreler.

#### 4.3.1. Spermatozid ve Yuvarlak Spermatozid Fraksiyonlarında Scp3 ve Prm2 Ekspresyonu

Ergin erkek fare testislerinden izole edilen spermatogenik hücrelerden olan spermatozid (SS) ve yuvarlak spermatozid (YS) fraksiyonlarında Scp3 ve Prm2 belirteçlerinin ekspresyonları analiz edildi. Bilindiği gibi, Scp3 (Sinaptonemal kompleks 3) spermatozid belirteci olarak kullanılırken; Prm2 (Protamin 2) ise yuvarlak spermatozid belirteci olarak

kullanılmaktadır. Beklenildiği gibi, Scp3 belirteci sadece spermatozoid fraksiyonunda bulunurken; yuvarlak spermatozoidlerde görülmedi. Aynı şekilde Prm2 ekspresyonu da sadece yuvarlak spermatozoid fraksiyonunda belirlenirken; spermatozoid fraksiyonunda reaksiyon gözlenmedi. Bu sonuç, spermatozoid ve yuvarlak spermatozoid fraksiyonlarının saflık oranlarının oldukça yüksek olduğunu göstermektedir (Şekil 4.9).



**Şekil 4.9.** Scp3 ve Prm2'nin SS ve YS fraksiyonlarındaki ekspresyonları. Beta aktin, yükleme kontrolü olarak kullanıldı. NK: negatif kontrol. SS: spermatozoid, YS: yuvarlak spermatozoid.

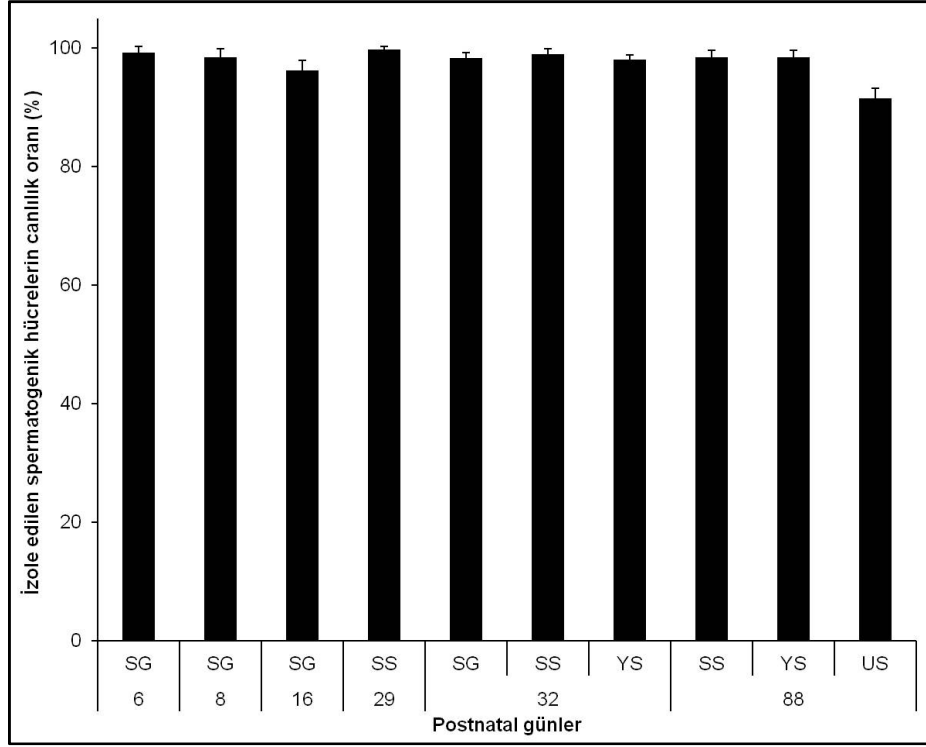
#### 4.3.2. İzole Edilen Spermatozoid Hücrelerin Canlılık Oranı

Çalışma kapsamında, izole edilen spermatozoid hücrelerin canlılık oranları da belirlendi. Canlılık oranı analizi, izolasyonda kullanılan %2-4 süreksiz BSA gradiyent yönteminin hücrelerin canlılık oranına etkisinin değerlendirilmesine imkân sağlamıştır.

İzole edilen spermatozoid hücrelerin canlılık oranlarının değerlendirilmesinde tripan mavisi ve MTT analizi gibi çeşitli yöntemler ile farklı firmaların ürettiği kitler kullanılmaktadır. Çalışmamızda canlılık analizi, etkin bir yöntem olan tripan mavisi ile gerçekleştirildi.

Tripan mavisi boyaması sonucunda, spermatozoid hücrelerin canlılık oranları  $\geq 91.5$  olarak bulundu. En düşük canlılık oranı, ergin erkek fare testisinden izole edilen uzamış spermatozoidlerde (%91.5) gözlemlendi (Şekil 4.10).

US eldesinde, yakın hücresel yoğunluktaki diğer hücreler tarafından kontamine edilebilmesi nedeniyle ikinci bir gradiyent oluşturulmuştur. Bu durumun US fraksiyondaki canlılık oranında azalmaya neden olmuş olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, US'lerde transkripsiyonel aktivitenin durmasının da bu süreçte etkili olabileceği kanısındayız. Bilindiği gibi, transkripsiyonel aktivitenin durması protein sentezini etkilemektedir.



**Şekil 4.10.** İzole edilen spermatogenik hücrelerin % canlılık oranları. Süreksiz %2-4 BSA gradiyent yöntemi ile izole edilen spermatogenik hücrelerin (spermatogonya, spermatosit, yuvarlak spermatid ve uzamış spermatid) canlılık oranları tripan mavisi ile boyanarak belirlendi. Her hücre izolasyonu sonrasında, yüz hücre değerlendirilip ortalama canlılık oranları hesaplandı.

#### 4.3.3. İzole Edilen Spermatogenik Hücrelerde ePABP Gen Ekspresyonu

İmmatür ve matür erkek fare testislerinden izole edilen spermatogenik hücrelerde ePABP ve PABPC1 genlerinin kantitatif ekspresyon düzeyleri qRT-PCR ile belirlendi.

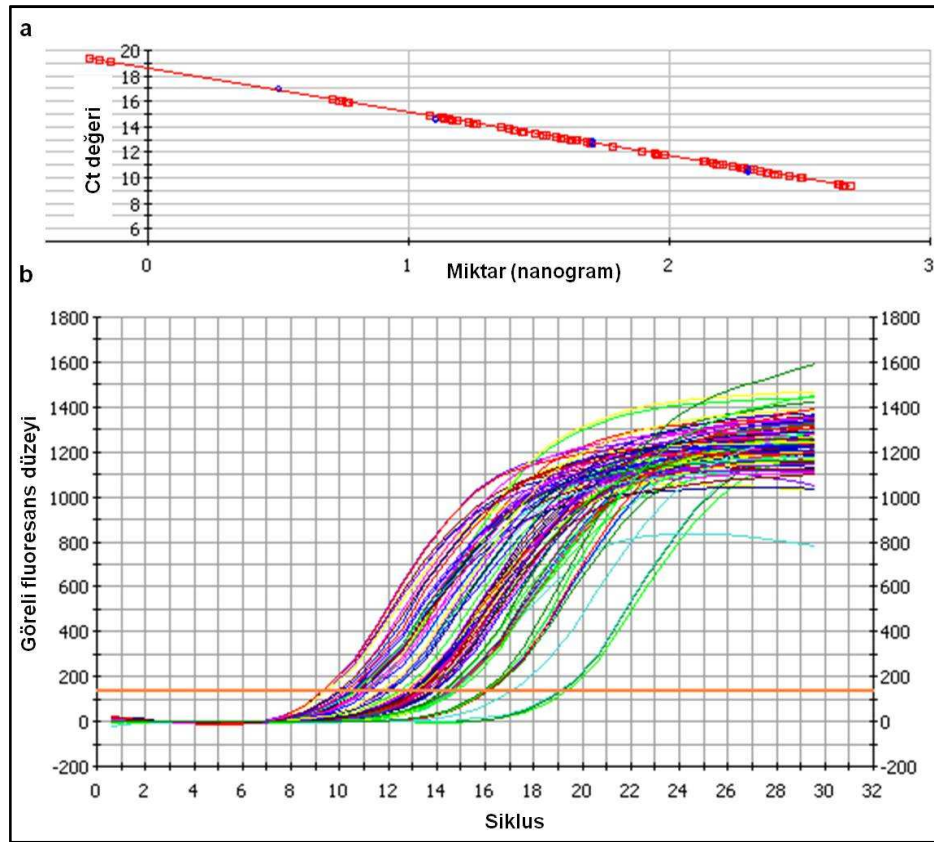
Aktin, ePABP ve PABPC1 primerleri için fare ovarium cDNA'sı ile seri dilüsyonlar oluşturuldu. Ayrıca, ePABP, PABPC1 ve aktin genlerinin görel ekspresyon düzeylerinin belirlendiği standard ve sigmoid eğriler sırasıyla Şekil 4.11, 4.12 ve 4.13'de verildi.

Her üç gen için oluşturulan standartlar bu genlerin görel ekspresyon düzeylerinin belirlenmesinde kullanıldı. Görel ekspresyon düzeyi hesaplamaları "Gereç ve Yöntem" başlığı altında anlatıldığı gibi genler için elde edilen görel miktarların, aktin görel miktarına normalize edilmesiyle gerçekleştirildi.

qRT-PCR çalışmalarında reaksiyon sonucunda sigmoidal eğriler gözlenmesi reaksiyonun doğru bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir. Bu nedenle reaksiyon sonucunda oluşan eğriler, her qRT-PCR uygulaması sonucunda değerlendirildi.

İzole edilen spermatogenik hücrelerin görelî aktin düzeylerinin belirlenmesi için standard oluşturuldu. Aktin primerleri ile oluşturulan standardın eğimi -3.439 olarak bulunurken; PCR verimliliği ise %95.4'dir. İzole edilen spermatogenik hücrelerden elde edilen cDNA'lar ile qRT-PCR reaksiyonu kuruldu. Beklenildiği gibi, eğriler sigmoid şekildedir (Şekil 4.11a ve b).

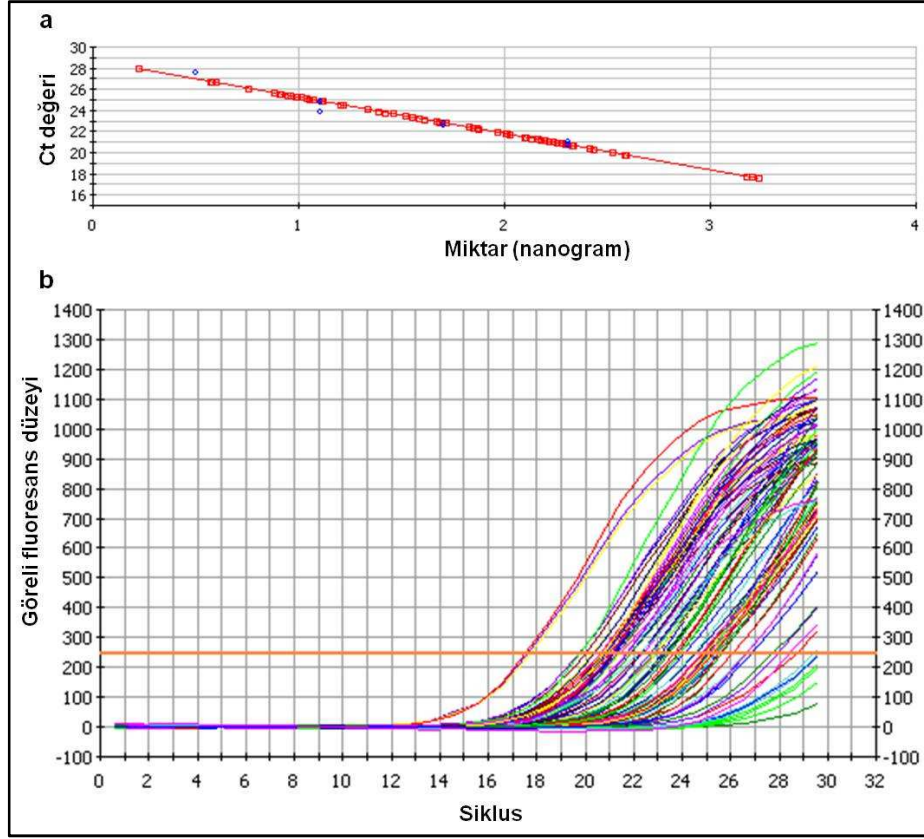
Görelî ePABP düzeylerinin belirlenmesi için de standard oluşturuldu. ePABP primerleri ile oluşturulan standardın eğimi -3.450 olarak bulunurken; PCR verimliliği ise %94.9 olarak hesaplandı. İzole edilen spermatogenik hücrelerden elde edilen cDNA'lar ile qRT-PCR reaksiyonu kuruldu. Beklenildiği gibi, PCR eğrileri sigmoidal şekildedir (Şekil 4.12a ve b).



**Şekil 4.11.** Aktin geni için oluşturulan standard ve qRT-PCR eğrileri. a. Fare ovaryum cDNA'sından oluşturulan seri dilüsyonların aktin primerleri ile kurulan reaksiyonun standard eğrisi görülmektedir. b. Postnatal testislerden izole edilen spermatogenik hücrelerin görelî aktin mRNA düzeyinin belirlendiği sigmoid eğriler görülmektedir.

Aktin ve ePABP genlerine benzer olarak, PABPC1 düzeylerinin belirlenmesi için de standard oluşturuldu. PABPC1 primerleri ile oluşturulan standardın eğimi -3.437 olarak bulunurken; PCR verimliliği ise %95.4 olarak hesaplandı.





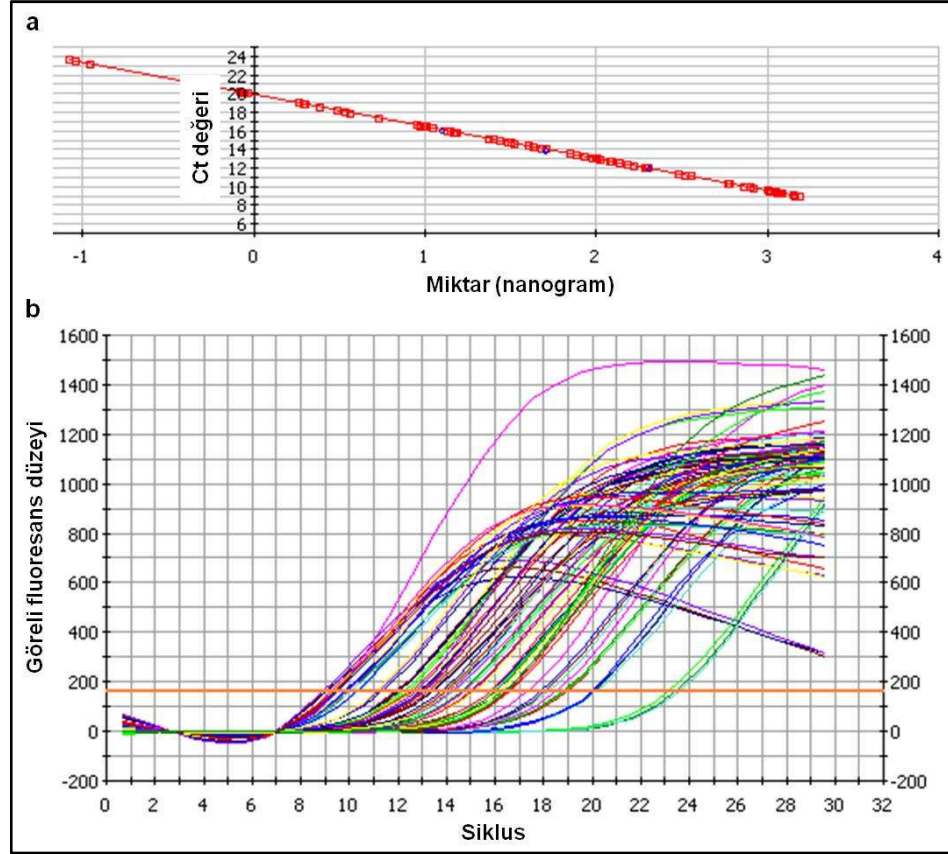
**Şekil 4.12.** ePABP geni için oluşturulan standart ve qRT-PCR eğrileri. a. Aktin primleri kullanılarak fare ovaryum cDNA'sı seri dilüsyonları ile oluşturulan standart eğri eğimi -3.450, PCR verimliliği ise %94.9 olarak bulunmuştur. b. Postnatal testislerden izole edilen spermatogonik hücrelerin görelü ePABP mRNA düzeyinin belirlendiği sigmoid eğriler görülmektedir.

Postnatal testislerden izole edilen spermatogonik hücrelerden elde edilen cDNA'lar ile qRT-PCR reaksiyonu kuruldu. Beklenildiği gibi, PABPC1 PCR reaksiyon ürünleri, sigmoidal bir eğri oluşturdu (Şekil 4.13a ve b).

İmmatür testislerden (6., 8., 16. ve 32. günlerde) elde edilen spermatogonyalarda ePABP gen ekspresyonu analiz edildiğinde: ePABP gen ekspresyonunun, 6 ve 8 günlük testislerden elde edilen spermatogonyalarda düşük düzeydeyken; 16. günde yükselmeye başlamış ve 32. günde ise istatistiksel olarak anlamlı düzeyde en yüksek düzeye ulaşmıştır.

ePABP düzeyi 29., 32., ve 88. günlerdeki testislerden elde edilen spermatozoidlerde de analiz edildi. Spermatozoidlerde ePABP düzeyi 29. günde düşük düzeydeyken, 32. günde anlamlı miktarda yükselmiştir (Şekil 4.14).

ePABP ekspresyonu, 88. gün testisten elde edilen spermatozoidlerde, 32. güne göre biraz azalmasına rağmen 29. günden daha yüksek olduğu görüldü. İstatistiksel analizler ise 32. gün testisten elde edilen spermatozoidlerin, 29. ve 88. günlerden elde edilen spermatozoidlerden anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu ortaya koymuştur (Şekil 4.14).



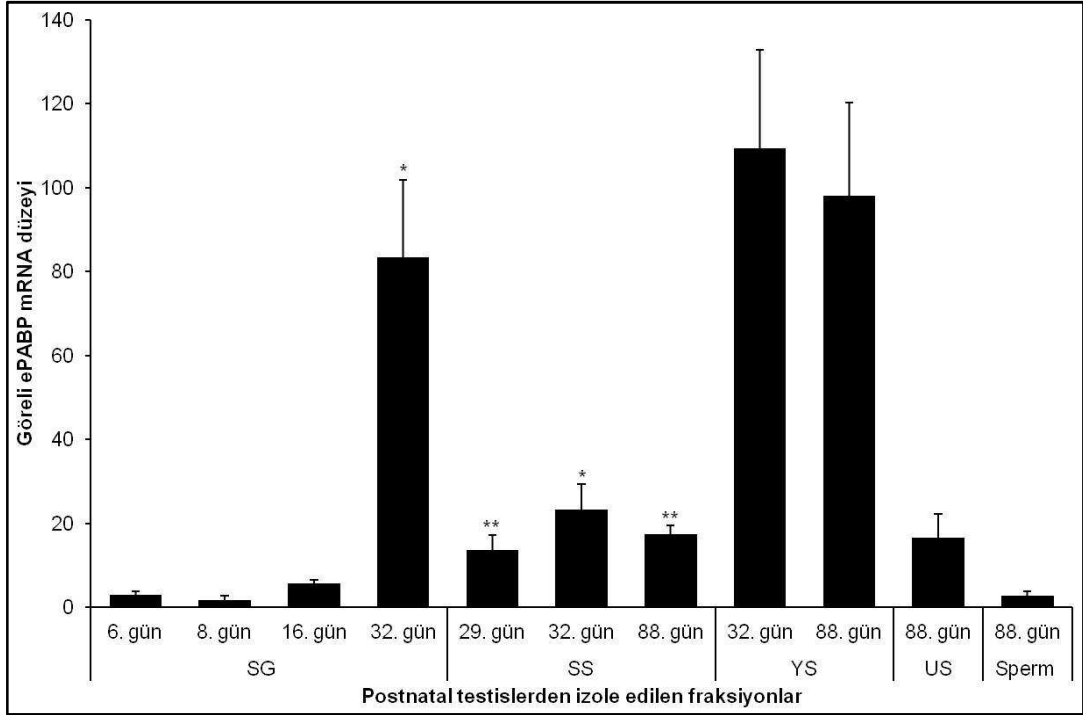
**Şekil 4.13.** PABPC1 geni için oluşturulan standard ve qRT-PCR eğrileri. a. PABPC1 primleri kullanılarak fare ovaryum cDNA'sı seri dilüsyonları ile oluşturulan standard eğri eğimi -3.437, PCR verimliliği ise %95.4 olarak bulunmuştur. b. Postnatal testislerden izole edilen spermatogonik hücrelerin görece PABPC1 mRNA düzeyinin belirlendiği sigmoid eğriler görülmektedir.

Yuvarlak spermatid izolasyonu verimli şekilde sadece 32. ve 88. gün testislerden elde edildiği için, ePABP mRNA düzeyi sadece bu günlerde değerlendirildi. Bu iki günden elde edilen yuvarlak spermatid fraksiyonlarında anlamlı bir fark gözlenmemesine rağmen, 32. günde ePABP gen ekspresyon düzeyinin daha yüksek olduğu belirlendi. Ergin erkek fareden elde edilen uzamış spermatid ve spermlerde ise ePABP gen ekspresyonu, uzamış spermatidlerde sperme göre daha yüksek bulundu.

#### 4.3.4. İzole Edilen Spermatogonik Hücrelerde PABPC1 Gen Ekspresyonu

İmmatür ve matür erkek fare testislerinden izole edilen spermatogonik hücrelerde PABPC1 gen ekspresyon düzeyi de analiz edildi. PABPC1 ekspresyonu, 6., 8., 16., ve 32. gün testislerden elde edilen spermatogonyalarda yaşla orantılı olarak yükselmiştir. ePABP ekspresyon durumuna paralel olarak, PABPC1 mRNA miktarı istatistiksel olarak anlamlı düzeyde 32. günde en yüksek düzeye ulaşmıştır. Ayrıca, PABPC1'in 16. gün testisten elde edilen spermatogonyalardaki düzeyinin 6. ve 8. gün

testislerden elde edilen spermatogonyalara göre anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu gözlemlendi (Şekil 4.15).

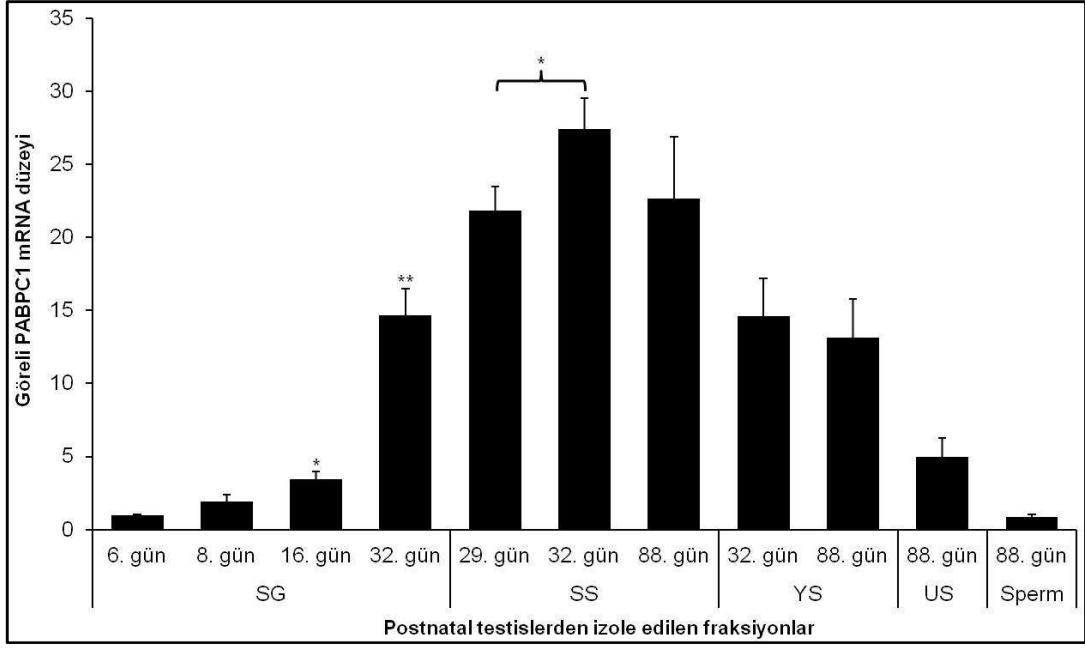


**Şekil 4.14.** İzole edilen spermatogonik hücrelerde ePABP ekspresyonu. ePABP ekspresyon düzeyleri, elde edilen ePABP görelî miktarlarının beta aktine normalize edilmesi ile elde edildi. İmmatür ve matür erkek fare testislerinden izolasyon yapılan günler ve elde edilen spermatogonik hücre fraksiyonları şekilde gösterildi. SG: spermatogonya, SS: spermatozoid, YS: yuvarlak spermatozoid, US: spermatozoid. Yıldız(lar) istatistiksel olarak anlamlılığın varlığını göstermektedir. İstatistiksel anlamlılık için  $P$  değeri  $< 0.05$  olarak kabul edildi.

Spermatozoidlerdeki PABPC1 ekspresyonu ise 32. günde 29. güne göre anlamlı düzeyde daha yüksek bulunmuş ve 88. günde ise azalmıştır. Yuvarlak spermatozoidlerde PABPC1 ekspresyon durumu analiz edildiğinde: 32. günde, 88. güne göre daha yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Ergin erkek fareden (88. gün) elde edilen uzamış spermatozoidlerde, spermatozoidlere göre daha fazla PABPC1 ekspresyonu olduğu belirlendi (Şekil 4.15).

#### 4.4. Postnatal Testislerde ePABP mRNA'sının Dağılımı

ePABP mRNA'sının postnatal testis dokularındaki hücreler yerleşimini belirlemek için RNA *in situ* hibridizasyon tekniği uygulandı. Bu uygulama ile ePABP mRNA'sının seminifer tübüllerde bulunduğu ve spermatogonik hücrelerde sitoplazmik yerleşim gösterdiği ortaya konuldu. Ayrıca, RNA *in situ* yapılan postnatal testis kesit serileri hematoksil-eozin ile boyanarak histolojik yapıları değerlendirildi.

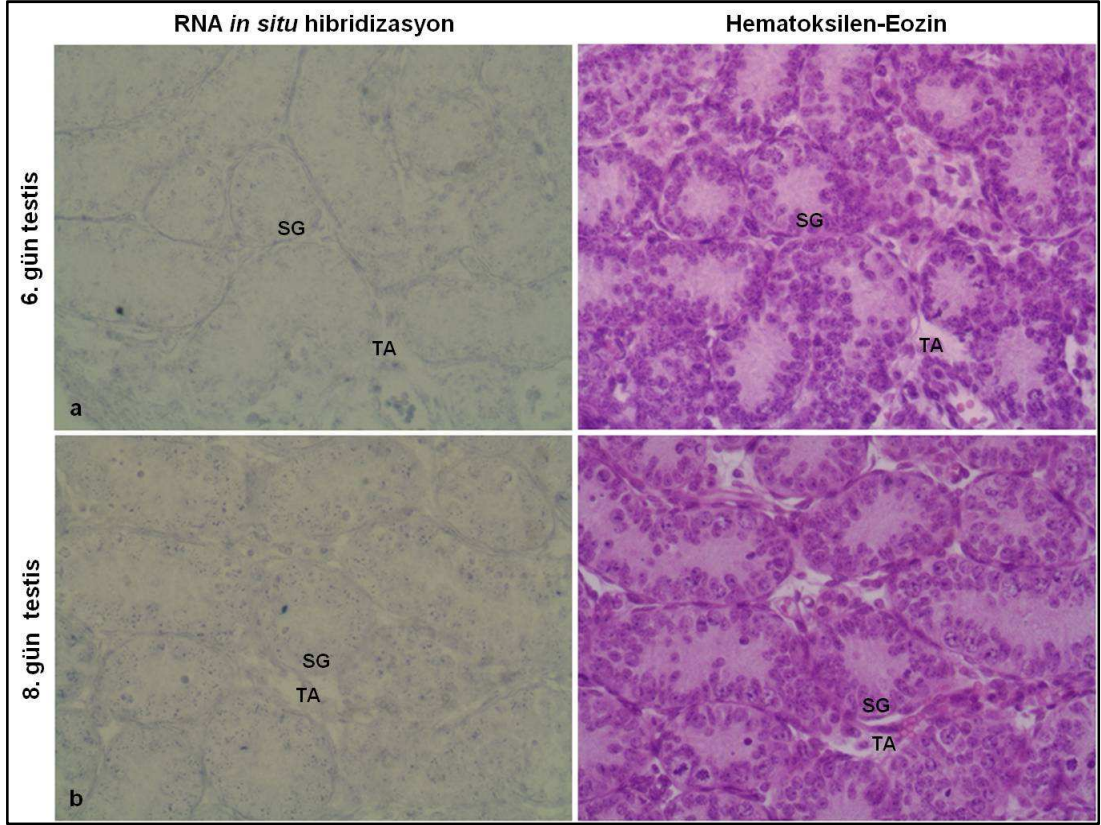


**Şekil 4.15.** İzole edilen spermatogenik hücrelerde PABPC1 ekspresyonu. Görel PABPC1 ekspresyon düzeyleri, elde edilen PABPC1 görel miktarlarının beta aktine normalize edilmesi ile hesaplandı. İmmatür ve matür erkek fare testislerinden izolasyon yapılan günler ve elde edilen spermatogenik hücre fraksiyonları şekilde gösterildi. SG: spermatogonya, SS: spermatosit, YS: yuvarlak spermatid, US: uzamış spermatid göstermektedir. Yıldız(lar) istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir. İstatistiksel anlamlılık için  $P$  değeri  $< 0.05$  olarak kabul edildi.

Altı günlük fare testis dokusunda uygulanan RNA *in situ* hibridizasyon sonucunda, ePABP mRNA ekspresyonu sadece seminifer tübüllerde gözlemlendi. Bu dönemde seminifer tübüllerde, Sertoli hücreleri ve spermatogonyalar bulunmaktadır. ePABP mRNA ekspresyonu ise sitoplazmik yerleşimli olarak sadece spermatogonyalarda oldukça zayıf düzeyde belirlendi (Şekil 4.16a).

Sekiz günlük fare testis dokusunda da 6. gün testise benzer bir ePABP ekspresyon dağılımı gözlemlendi. ePABP mRNA'sı sadece seminifer tübüldeki spermatogonyaların sitoplazmasında zayıf düzeyde görüldü. Ayrıca, germinal epitelini oluşturan diğer hücre tipi olan Sertoli hücrelerinde ePABP mRNA'sı olmadığı belirlendi (Şekil 4.16b). Her iki postnatal gelişim dönemi (6. ve 8. gün) testislerin tübüller arası bağ dokusunda ve kapsül bölgesinde ePABP pozitif reaksiyon alanları gözlenmedi (Şekil 4.16).

Postnatal hayatın ilerleyen günlerinde ePABP mRNA yerleşimi ve ekspresyon şiddetinde bir değişim olup olmadığını belirlemek için 16., 29. ve 32. gün testislere de RNA ISH uygulandı. On altıncı gün testis dokusunda, spermatogonyalara spermatositlerde katılmaktadır.



**Şekil 4.16.** Altı ve sekiz günlük testis dokusunda RNA ISH ve HE sonuçları. a: Altı günlük testis; b: Sekiz günlük testis için RNA *in situ* hibridizasyon sonucu verilmiştir. Hematoksilen-eozin ile boyanmış seri kesitler, histolojik değerlendirmeler için kullanıldı. SG: Spermatogonya; TA: Tübüller arası bölge. Tüm resimler, 200X orijinal büyütmede elde edildi.

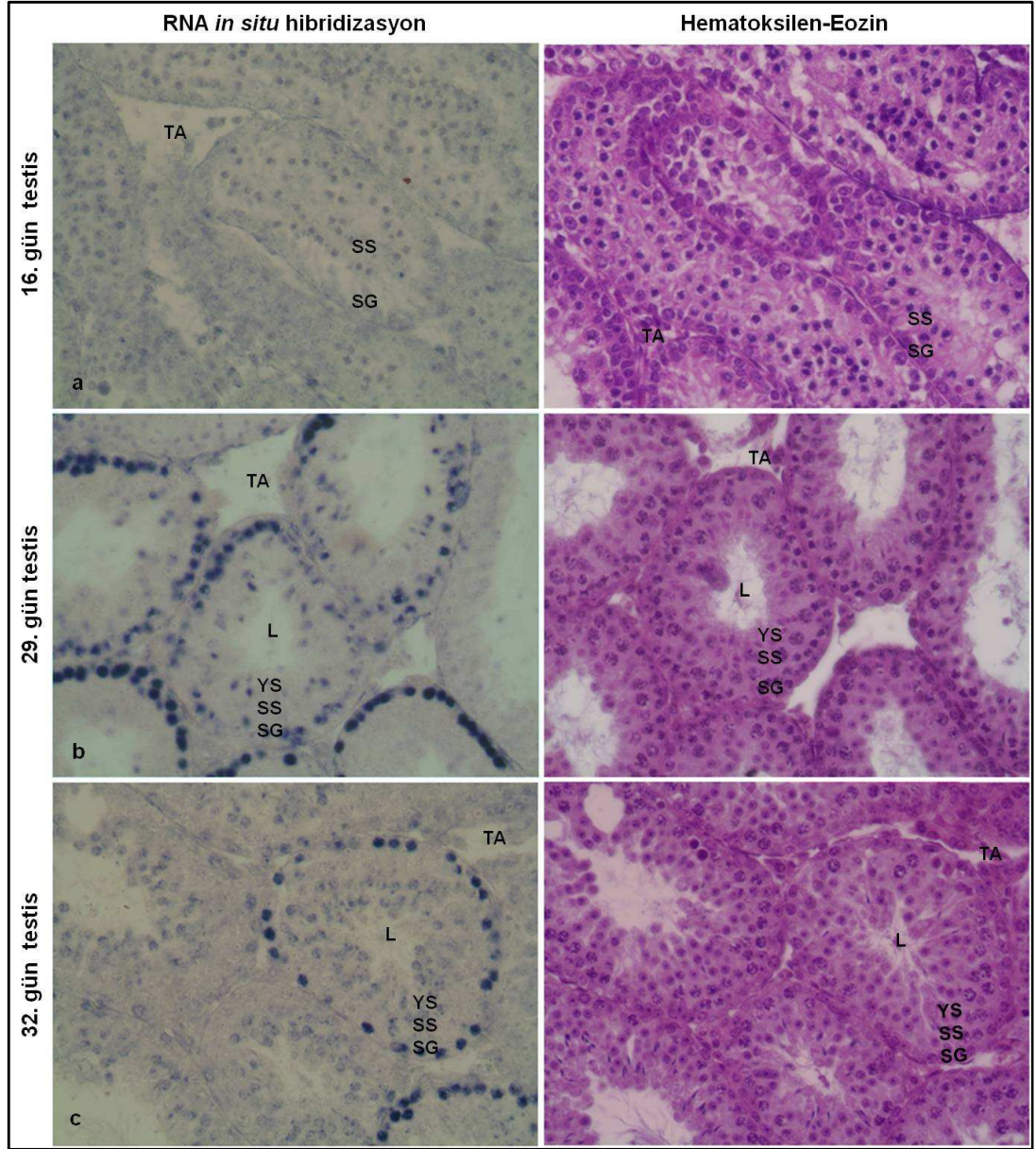
RNA ISH uygulaması sonucunda: 16. gün testiste sadece seminifer tübüllerde ePABP mRNA ekspresyonu olduğu görüldü. Seminifer tübüllerde ise sadece spermatogonya ve spermatozoidlerde ekspresyon gözlemlendi. Her iki hücre tipinde de sitoplazmik yerleşimli olan ePABP ekspresyonu, spermatozoidlerde spermatogonyalara göre daha şiddetli olduğu görüldü (Şekil 4.17a).

Postnatal hayatın 29. günündeki testiste ise ePABP ekspresyonunda değişiklikler göze çarpmaktadır. Bu dönemde, spermatogonya ve yuvarlak spermatozoidlerde yoğun ePABP ekspresyonu gözlenirken; spermatozoid grubunda oldukça düşük düzeyde olduğu görülmüştür. RNA *in situ* hibridizasyon ile elde edilen sonuçlar, izole edilen spermatogenik hücelere uygulanan qRT-PCR sonuçları ile uyumlu olduğu görüldü (Şekil 4.17b).

Erken dönem postnatal testislere benzer olarak, tübüller arası alanda ve kapsül bölgesinde herhangi bir reaksiyon gözlenmedi. Böylece, tübüller arası alanda yer alan bağ dokusu hücreleri ve seminifer tübülü çevreleyen miyoid hücrelerde ePABP ekspresyonu olmadığı ortaya konuldu (Şekil 4.17b). Bu sonuçların intertübüler hücrelerin izolasyonunu takiben



uygulanacak qRT-PCR tekniği ile onaylanmasının önemli olacağı düşünülmektedir.



**Şekil 4.17.** Postnatal testis dokusunda RNA ISH ve HE sonuçları. Postnatal 16., 29. ve 32. gün testis doku kesitlerine RNA *in situ* hibridizasyon ve seri kesitine de HE boyaması yapıldı. a: 16. güne b: 29. güne ve c: 32. güne ait testis dokularına uygulanan RNA ISH ve hematoksilin-eozin sonuçları verilmiştir. Tüm resimler, 200X orijinal büyütmede elde edildi. TA: Tübüller arası bölge, L: Lümen, SG: Spermatogonya, SS: Spermatosit, YS: Yuvarlak spermatid.

Otuz iki günlük testis dokusunda ise 29. güne benzer olarak spermatogonya ve yuvarlak spermatidlerde yüksek ePABP ekspresyonu gözlenirken; spermatositlerde ise düşük ekspresyon olduğu belirlendi. Diğer testiküler bölgelerde ise ePABP ekspresyonu görülmedi (Şekil 4.17c).

#### 4.4.1. Ergin Fare Testisinde ePABP ve PABPC1 mRNA'larının Dağılımı

Ergin erkek fare testis kesitlerine (88. gün), RNA *in situ* hibridizasyon tekniği uygulanarak hem ePABP hem de PABPC1 mRNA'larının hücrel yerleşimleri ve ekspresyon şiddetleri belirlendi. ePABP mRNA'sı, seminifer tübüllerde gözlenirken; PABPC1 ise hem seminifer tübül hücrelerinde hem de tübüller arası hücrelerde gözlemlendi.

Seminifer tübüllerde ePABP transkripti, sadece spermatogenik hücrelerin sitoplazmalarında belirlendi. Spermatogenik hücreler içinde en yoğun ePABP mRNA'sı spermatogonyalarda görüldü. Bilindiği gibi spermatogonyalar, seminifer tübülü çevreleyen bazal lamina üzerine oturan ve çok sayıda mitotik aktivite geçiren kök hücrelerdir. Yuvarlak spermatidlerde ise ePABP mRNA düzeyinin, spermatozoid ve uzamış spermatidlerden daha yüksek düzeyde olduğu belirlendi. Uzamış spermatidlerde ise çok zayıf bir ePABP ekspresyonu görüldü. ePABP mRNA'sı, tübüller arası alandaki ve kapsüldeki hücrelerde ekspresyon edilmediği gözlemlendi (Şekil 4.18a).

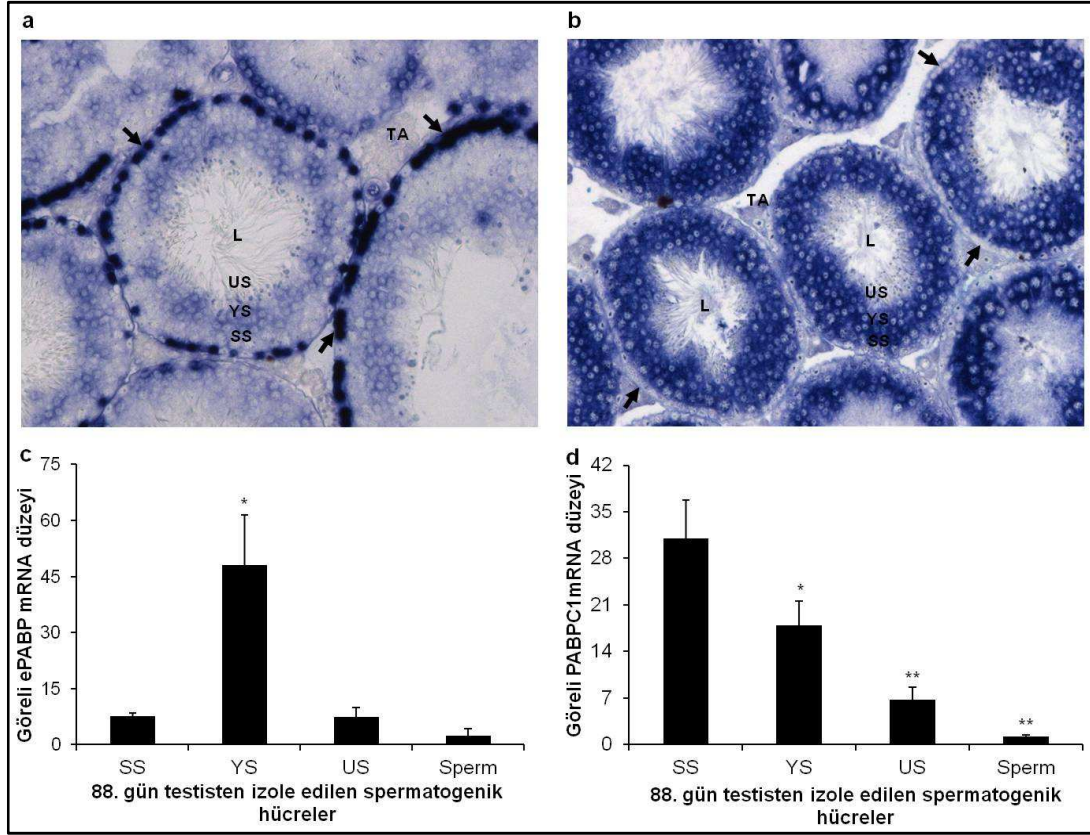
Ergin fare testislerinde PABPC1 ekspresyonu ise ePABP'ten farklı olarak spermatogonyalarda oldukça düşük düzeyde bulunmuştur. Spermatozoid ve yuvarlak spermatidlerde PABPC1 ekspresyonu oldukça yüksek düzeyde izlenirken, spermatogonya ve uzamış spermatidlerde ise düşük düzeydeydi (Şekil 4.18b). Somatik bir hücre olan Sertoli hücresinde, ePABP mRNA'sı görülmezken; zayıf düzeyde PABPC1 ekspresyonu görüldü (Şekil 4.18).

#### 4.4.2. Spermatogenik Hücrelerde ePABP ve PABPC1 Ekspresyonu

ePABP ve PABPC1 gen ekspresyonu, ergin erkek fareden (88. gün) izole edilen spermatogenik hücrelerde (spermatozoid, yuvarlak spermatid, uzamış spermatid ve spermde) qRT-PCR ile de analiz edildi. Yuvarlak spermatidlerde spermatozoid, uzamış spermatid ve spermde göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek ePABP ekspresyonu olduğu belirlendi. Spermatozoid ve uzamış spermatidlerdeki ePABP transkript düzeyi spermde daha yüksek bulunmasına rağmen bu fark anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.18c).

İzole edilen spermatogenik hücrelerde kantitatif PABPC1 gen ekspresyonu da analiz edildi. Spermatozoidlerde yuvarlak spermatid, uzamış spermatid ve spermde göre anlamlı düzeyde daha yüksek PABPC1 ekspresyonu olduğu belirlendi. Yuvarlak spermatidlerde ise uzamış spermatid ve sperm fraksiyonlarından daha yüksek PABPC1 mRNA'sı olduğu görülmüştür. Uzamış spermatidlerde spermde göre daha fazla PABPC1 mRNA'sı olmasına rağmen, bu fark anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.18d). Ergin farelerden %2-4 BSA süresiz gradiyent yöntemi ile spermatogonya eldesi gerçekleştirilemediği için bu hücrelerde ePABP ve PABPC1 gen ekspresyonu değerlendirilememiştir. qRT-PCR ile izole edilen

spermatogenik hücrelerde belirlenen ePABP ve PABPC1 ekspresyon düzeyleri, RNA *in situ* ile elde edilen sonuçlar ile paralellik göstermektedir.



**Şekil 4.18.** ePABP ve PABPC1'in RNA *in situ* ve qRT-PCR sonuçları. Ergin erkek fare testisinde ePABP ve PABPC1 mRNA'larının hüresel yerleşimleri ve ergin erkek fare testisinden izole edilen spermatogenik hücrelerdeki qRT-PCR sonuçları görülmektedir. RNA *in situ* hibridizasyon uygulamasının ışık mikroskopik resimleri (200X orijinal büyütmeye) sırasıyla a (ePABP için) ve b (PABPC1 için) şekillerinde verildi. Oklar, ePABP ve PABPC1 probunun spermatogonyalardaki reaksiyonunu göstermektedir. Ergin erkek fare testisinden izole edilen spermatosit, yuvarlak spermatid, uzamış spermatid ve spermde c) ePABP ekspresyonu, d) PABPC1 ekspresyonu qRT-PCR ile belirlendi. Yıldız(lar) istatistiksel anlamlılığın varlığını göstermektedir. İstatistiksel anlamlılık için  $P$  değeri  $< 0.05$  olarak kabul edilmiştir. TA: Tübüller arası bölge, L: Seminifer tübül lümenini, SS: spermatositi, YS: yuvarlak spermatidi, US: uzamış spermatidi işaret etmektedir. Resimler (a ve b), 200X orijinal büyütmeye elde edildi.



## TARTIŞMA

Bu çalışmada, postnatal fare testislerinde (6., 8., 16., 20., 29. 32. ve 88. gün) ve izole edilen spermatogenik hücrelerde ePABP ve PABPC1 genlerinin ekspresyon düzeyleri belirlendi. Ayrıca, postnatal fare testis dokularına RNA *in situ* hibridizasyon uygulanarak ePABP mRNA'sının hücresel yerleşimi ortaya konuldu. Ergin erkek fare testisinde ise ePABP ve PABPC1 mRNA'ların hücresel yerleşimleri RNA *in situ* hibridizasyon ile birlikte değerlendirildi.

ePABP ve PABPC1 genlerinin ekspresyon düzeylerini ve hücresel yerleşimlerini belirlemek için postnatal fare testis gelişiminin belirli günleri (6., 8., 16., 20., 29., 32. ve 88.) seçilmiştir. Bu postnatal günler, Bellvé AR. tarafından fareler üzerinde yapılmış olan araştırmalar temel alınarak belirlendi [113, 114]. Bu çalışmada, spermatogenik hücre tiplerinin (spermatogonya, spermatosit, yuvarlak spermatid ve uzamış spermatidlerin) ortaya çıkma zamanları ve oranları ortaya konulmuştur (Çizelge 5.1). Spermatogonyalar, altı ve sekiz günlük testiste ayırt edilebilmekte ve oranları postnatal gelişimin ilerleyen dönemlerinde azalmaktadır. Mayozun faklı aşamalarında olan preleptoten, leptoten, zigoten ve pakiten spermatosit aşamalarının tamamı ise 16 günlük testiste görülebilmektedir. Yuvarlak spermatidler (spermatid 1-8), 18. günde düşük oranda görülmesine rağmen spermatogenik hücre içindeki oranları 20. günde artmakta ve 29. gün testiste ise oldukça yükselmektedir [113]. Otuz iki günlük testis ise olgun sperm üretimine yakın bir dönem olması nedeniyle tercih edilmiştir. Bu dönemde kauda epididimiste sperm olmadığı kontrol edildikten sonra bu güne ait testisler çalışmada kullanılmıştır. Ergin dönem ve olgun spermın üretildiği dönem olarak, 88. gün testis kullanılmıştır. Sonuç olarak, bu çalışmada spermatogenik hücrelerin seride ortaya çıkma dönemleri temel alınarak postnatal fare testis günleri belirlenmiştir.

Bu çalışma ile postnatal fare testis dokuları ve izole edilen spermatogenik hücrelerde ePABP gen ekspresyonu ilk defa belirlendi. ePABP gen ekspresyonunun, erken dönem postnatal testis dokularında (6., 8., 16. ve 20. günlerde) düşük olduğu görülmüştür. Erken postnatal gelişim dönemlerinde ePABP gen ekspresyon düzeyinin düşük olması, bu dönemde ePABP proteinine gereksinim duyulmamasına bağlı olduğu düşünülmektedir. Bilindiği gibi ePABP, transkripsiyonel aktivite durdurduktan sonra depo mRNA'ların translasyonel kontrollerinde rol oynamaktadır. Dişi farelerde gerçekleşen oogenez sürecinde mayotik matürasyonla birlikte transkripsiyon durmakta ve farede 2-hücreli embriyo aşamasında tekrar başlamaktadır. Bu dönemde depo edilmiş maternal mRNA'ların translasyonel kontrolünde

ePABP proteininin görev aldığı belirtilmektedir [65]. Benzer bir durum spermatogenez sürecinde de meydana gelmektedir. Spermatogenezin spermiyogenez aşamasının ortasına doğru transkripsiyon durmaktadır. Bu bilgiyle uyumlu olarak, ePABP mRNA düzeyi 29. gün testis dokusunda belirgin artmakta ve 32. gün testiste en yüksek düzeyine ulaşmaktadır. Bilindiği gibi spermiyogenez süreci eşeyssel olgunluğun kazanıldığı 35. güne doğru tamamlanıp, sperm üretimi gerçekleştirilmektedir [115]. ePABP düzeyi, 32. gün testisten düşük olmakla birlikte 88. gün testiste de oldukça yüksek düzeyde olduğu görülmüştür. Ergin, 88 günlük fare testisinde ePABP ekspresyonunun yüksek düzeyde olmasının spermatogenezin dalgalar halinde meydana gelmesinden kaynaklandığı kanısındayız.

**Çizelge 5.1.** Postnatal fare testisinde germ hücre oranları. Bu tablo [114] nolu yayından modifiye edilmiştir.

Hücre tipi	Postnatal Günler						
	6. gün	8. gün	10. gün	16. gün	18. gün	20. gün	84. gün
Spermatogonya	16	27	18	17	10	10	4
Spermatozit	-	-	30	44	60	58	22
Spermatid (1-8. aşama)	-	-	-	-	1	4	31
Spermatid (12-16. aşama)	-	-	-	-	-	-	40
Sertoli hücresi	84	73	52	39	29	28	3

Çalışmada postnatal testis örneklerinde ePABP gen ekspresyon düzeyi yüksekliğinin, spermatogonik hücrelerden kaynaklanıp kaynaklanmadığı da değerlendirildi. Bu amaçla, postnatal hayatın belirli yaşlarındaki erkek farelerden alınan testis örneklerinden spermatogonik hücrelerin izolasyonları gerçekleştirildi. İzolasyon için elde edilecek spermatogonik hücre sayılarının en yüksek oranda olduğu günler seçildi. Spermatogonik hücre oranları,  $\geq 77\%$  olan hücre fraksiyonları aynı tüpte toplanarak ePABP gen ekspresyonu ortaya konuldu. Saflık oranları, 32. gün testisten elde edilen SG ( $\sim 77\%$ ) ve YS ( $78\%$ ) fraksiyonlarında en düşük yüzde de bulundu. Bu hücrelerin morfolojik özellikleri ve hücre içi yoğunluklarının birbirleri ve diğer hücrelerle yakın olması nedeniyle saflık oranları düşmektedir. SG fraksiyonunu kontamine eden hücreler arasında spermatozit, yuvarlak spermatid, sitoplazmik atıklar ve diğer hücreler de yer almaktadır. Fraksiyonu kontamine eden hücre ve sitoplazmik atıkların hücresel yoğunluklarının SG ile benzer olduğu tahmin edilmektedir. Yuvarlak spermatid fraksiyonu da benzer yoğunluktaki hücreler olan spermatogonya, spermatozit, sitoplazmik atılım parçacıkları ve diğer hücreler tarafından

kontamine edilmiştir. Bu durum çalışmada kullandığımız %2-4 süresiz BSA gradiyentin 32. gün testisten çok yüksek saflıkta SG ve YS eldesi için yeterli olmadığı göstermektedir.

İmmatür ve matür erkek fare testislerinden izole edilen spermatogenik hücrelerin canlılık oranları, BSA gradiyent uygulamasını takiben her hücre tipinde belirlendi. Bu hücreler arasında en düşük canlılık oranı, uzamış spermatid fraksiyonunda (%91.5) gözlemlendi. Diğer spermatogenik hücrelerde bu oran  $\geq 96$ 'dır. Uzamış spermatidlerde canlılık oranının diğer spermatogenik hücrelerden düşük olmasının bu hücrelerde transkripsiyonel aktivitenin durmasına bağlı olduğu kanısındayız. Transkripsiyonel aktivitenin durması, bu hücrelerin izolasyon sürecinde maruz kaldığı *in vitro* etkilere karşı kendisini iyi bir şekilde koruyamadığını düşündürmektedir.

Postnatal gelişimin 29., 32. ve 88. gün testis dokularında ePABP gen ekspresyon yüksekliğinin spermatogonya, spermatosit ve yuvarlak spermatidlerde yüksek düzeydeki ePABP gen transkripsiyonundan kaynaklandığı qRT-PCR ve RNA *in situ* hibridizasyon teknikleri ile ortaya konuldu. ePABP gen ekspresyonu 32. gün testisten elde edilen SG'lerde oldukça yüksek düzeyde bulundu. SG'lerdeki yoğun ePABP mRNA üretimi, 32. gün testiste artmış ePABP gen ekspresyonuna katkısı olduğu görülmektedir. Spermatosit fraksiyonlarında (29., 32. ve 88. gün testislerde), SG'lere benzer olarak en yüksek ePABP ekspresyonu 32. günde gözlenmektedir. Fakat, ePABP'in SS'lerdeki ekspresyonu SG'lerinkinden düşük olmakla birlikte 29., 32. ve 88. gün testislerdeki ePABP ekspresyon yüksekliğine katkısı olduğu düşünülmektedir. Yuvarlak spermatidlerde de, 32. gün ve 88. günlerde yüksek miktarda ePABP olduğu görüldü. YS'lerdeki ePABP ekspresyon düzeyinin SG ve SS'lerden de daha yüksek olduğuda görülmektedir. Bu sonuçlar 29., 32. ve 88. gün testis örneklerindeki yüksek ePABP gen ekspresyon düzeyinin, SG, SS ve YS'lerdeki fazla miktardaki ePABP mRNA üretiminden kaynaklandığını göstermektedir.

Yuvarlak spermatidlerdeki yüksek ePABP ekspresyonunun, erken spermatogenez sürecinde depolanan mRNA'ların korunmasında bu genin görev aldığını düşündürmektedir. Bilindiği gibi, erken spermatogenezde transkribe edilen mRNA'lar yaklaşık 160 adenin nükeotidinden oluşan uzun bir poli(A) kuyruğuna sahiptir [39, 40]. Bu uzun poli(A) kuyruğunun korunması için yüksek düzeyde ePABP ekspresyonuna gereksinim duyulduğu tahmin edilmektedir. Geç spermatogenezde, transkripsiyonun durmasına ve poli(A) kuyruğunun kısalmasına bağlı olarak uzamış spermatid ve spermlerde ePABP mRNA düzeyinin düştüğü kanısındayız. ePABP özgü antikor olmaması nedeniyle çalışmada sadece mRNA düzeyleri değerlendirildi. ePABP özgü antikor üretimi sonrasında ePABP'in yuvarlak spermatidlerdeki görevleri daha net olarak ortaya konulabilecektir.

Çalışma kapsamında, postnatal testis dokularında ePABP mRNA'sının hücrel yerleşimi RNA *in situ* hibridizasyon ile ortaya konuldu. ePABP mRNA'sı sadece seminifer tübüllerde gözlenip, tübüller arası alan ve kapsülde belirlenmedi. Altıncı ve sekizinci gün testis dokularında, SG'lerde çok zayıf ePABP mRNA'sı olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç, 6. ve 8. gün fare testislerinden izole edilen spermatogonyalarda belirlenen zayıf ePABP ekspresyonu ile uyumludur. Erken postnatal gelişim dönemi testislerdeki spermatogonyalar, çok sayıda mitotik bölünmeler geçirerek hem spermatogenez için gerekli olan kök hücre havuzunu hem de primer spermatositleri oluşturmaktadır. Bu süreçte, bu hücrelerdeki transkripsiyonel aktivite ise devam etmektedir. Transkripsiyonel aktivitenin devam etmesi nedeniyle, bu hücrelerde ePABP'e gereksinim olmadığı düşünülmektedir.

On altıncı gün testiste SG'lerde zayıf ekspresyon görülürken; SS'lerin ePABP mRNA yoğunluğu SG'ye göre yüksek bulunmuştur. Bu dönemde SS izolasyonu gerçekleştirilmemesine rağmen; 16. gün testiste ePABP düzeyindeki artışta SS'lerdeki yoğun ePABP transkripsiyonundan kaynaklandığı tahmin edilmektedir. ePABP mRNA yoğunluğunun, 29. ve 32. gün testislerde SG ve YS'lerde yüksek olması; eşeyssel olgunluğa bağlı olarak depo mRNA'ların korunması için ePABP'e gereksinim duyulmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Ergin erkek fare testis örnekleri SG'lerindeki yoğun ePABP ekspresyonu, bu proteinin spermatogonyaların mitotik aktivitelerinin düzenlenmesi ile primer spermatositlere farklılaşma sürecinde rol alan mRNA'ların posttranskripsiyonel kontrollerinde görev alabileceğini düşündürmektedir. Spermatogonyaların mitotik aktivitesini düzenleyen genler arasında Gdnf [116], Gfra1 [117], Ret [117], Etv5 [118], Taf4b [119], Bcl6b [120], Atm [121], Zbtb16 (Plzf) [122] yer alırken; farklılaşma süreçlerinde ise Kitl, Utp14b [123], Sohlh1 [124], Sohlh2 [125], Sox3 [126] gibi genler rol oynamaktadır. ePABP proteininin, spermatogonyalarda bu genlerinin hangilerinin ekspresyonel düzenlenmesinde görev aldığı konusunda yeni çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.

ePABP ile benzer yapısal özelliklere sahip olan ve mRNA'ların translasyonel kontrollerinde görev alan PABPC1 geninin postnatal testis dokuları ve spermatogenik hücrelerdeki ekspresyon düzeyleride analiz edildi. PABPC1 mRNA ekspresyonu, 16. gün testisten itibaren yavaş yavaş yükselmekte ve 32. günde ise en yüksek seviyesine ulaşmaktadır. PABPC1 ekspresyonu, matür erkek fare testisinde (88. gün), 32. güne göre az miktarda düşmektedir. İzole edilen spermatogenik hücrelerdeki PABPC1 transkript düzeyinin SG, SS ve YS fraksiyonlarında yüksek bulunmuştur. Bu durum PABPC1 ekspresyonunun 16. günden başlayarak artmasının spermatogonya, spermatosit ve yuvarlak spermatidlerde bu genin yüksek düzeyde ekspresyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca SG, SS ve YS'ler 16. gün testis seminifer tübüldeki germinal epitel hücreleri arasında önemli bir oranı oluşturmaktadır. Bu spermatogenik hücrelerin sayısal fazlalığının testisteki PABPC1 ekspresyonunun 16. günden itibaren yükselmesi ve bu yüksek ekspresyonun devamlılığında etkili olduğu kanısındayız.

Postnatal fare testislerinde yaptığımız bu çalışmaya benzer bir çalışma Kimura ve arkadaşları tarafından da yapılmıştır [101]. Bu çalışmada, PABPC1 ve PABPC2 proteinlerinin testis, beyin, akciğer, kalp, karaciğer, dalak, böbrek, ovaryum ve uterus dokularındaki ekspresyon durumu immünoyotlama ile gösterilmiştir. PABPC1, analiz edilen tüm somatik ve gonadal dokularda eksprese edilirken; PABPC2 ise sadece testis dokusunda eksprese edilmektedir. Postnatal hayatın farklı yaşlardaki farelerden (5., 10., 14., 18., 22., 26. ve 60. günler) alınan total testislerde PABPC1 ve PABPC2 mRNA ekspresyonları da araştırılmıştır. Northern blot yönteminin kullanıldığı bu analizde, tüm postnatal testislerde PABPC1 ekspresyonu görülürken; özellikle 14. günden başlayarak PABPC1 ekspresyonu yavaş yavaş yükseldiği görülmüştür. Bu bulguların, çalışmamızla uyumlu olduğu görülmektedir. Bizim çalışmamızda 14. gün fare testisinde inceleme yapılmamış olmakla birlikte; PABPC1 ekspresyonunun 16. günden itibaren artmaya başladığını qRT-PCR yöntemi ile belirledik. Ayrıca, her iki çalışmada da matür dönemdeki PABPC1 ekspresyonunda düşük miktarda bir azalmada dikkati çekmektedir [101].

Kimura ve arkadaşları bu çalışmalarında, PABPC2 ekspresyonunu ilk olarak 18. günde görmüşler ve 60. güne kadarda ekspresyonunun artan düzeyde devam ettiğini göstermişlerdir. Postnatal günlerde PABPC1 ve PABPC2 protein düzeyleri immünoyotlama ile değerlendirildiğinde: PABPC1 proteini 5. günde zayıf düzeydeyken diğer günlerde belirgin miktarda arttığı belirlenmiştir. PABPC2 ise mRNA bulgularıyla uyumlu olarak 18. gün ve sonrasındaki testis dönemlerinde protein düzeyinde artan miktarda varlığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada, izole edilen pakiten spermatosit, yuvarlak spermatid ve uzayan spermatidlerde (bu fraksiyonun sitoplazmik atılımları da içerdiği belirtilmiştir.) PABPC1 ve PABPC2 proteinlerinin ekspresyonel düzeyleri immünoyotlama ile ortaya konulmuştur. En yüksek PABPC1 protein düzeyi uzayan spermatid fraksiyonunda gözlenirken; yuvarlak spermatid de ise uzayan spermatid ve pakiten spermatosit gruplarından daha düşük düzeyde olduğu gözlenmiştir. PABPC2 ekspresyonu uzayan spermatidlerde görülmemesine rağmen; pakiten spermatositlerde ve yuvarlak spermatidlerde bulunmuştur. PABPC1 için postnatal testislerde mRNA düzeyinde elde ettiğimiz sonuçların, bu çalışmada elde edilen protein düzeyindeki sonuçlarla uyumlu olduğu görülmektedir. PABPC1'in mRNA düzeyinde olduğu gibi protein düzeyi de testiküler gelişime paralel olarak yükselmektedir. İzole edilen spermatogenik hücrelere immünoyotlama ve ergin testis dokusuna immünoyotlama tekniklerinin uygulamaları sonucunda PABPC1 protein düzeyi, çalışmamızdaki mRNA düzeyindeki sonuçlara benzer olarak spermatosit ve yuvarlak spermatid aşamalarında yüksek düzeyde bulunmuştur. Fakat, uzayan spermatid fraksiyonunda spermatosit ve yuvarlak spermatid fraksiyonlarından anlamlı düzeyde daha yüksek düzeyde PABPC1 proteini olduğu görülmektedir. Çalışmamızda ise ES fraksiyonundaki PABPC1 mRNA miktarı SS ve YS fraksiyonlarına göre oldukça düşük düzeyde bulunmuştur. PABPC1'in mRNA düzeyininin ES fraksiyonunda düşük olmasının transkripsiyonel aktivitenin mid-spermiyogenez aşamasında durmasına bağlı olduğu düşünülmektedir [101].

US'lerde translasyonel aktivite devam ettiği için PABPC1'in ihtiyaca bağlı olarak fazla miktara sentezlendiği kanısındayız. Ayrıca, Kimura ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışmada uzayan spermatid fraksiyonunda sitoplazmik atılımların bulunması, PABPC1 protein miktarının bu hücre grubunda normalden yüksek çıkmasına neden olmuş olabilir. Bizim çalışmamızda ise US grubunda yüksek saflıkta uzamış spermatidler bulunup; sitoplazmik atılım çok düşük oranda bulunmaktadır.

Çalışmamızda spermatogonyal hücre izolasyonu sadece 6., 8., 16., ve 32. gün immatür testislerde yapıldı. Ergin erkek farelerde (88. gün) spermatogonya sayısının oldukça düşük bir yüzde de (%6.8) olduğunu yaptığımız spermatogenik hücre sayımında gözlemledik. Bu nedenle %2-4 BSA gradiyent yöntemi ile yüksek saflıkta spermatogonya izolasyonu gerçekleştirilemedi. Yaptığımız izolasyon denemelerinde yaklaşık %60 saflıkta spermatogonya elde edildi. Bu saflık oranı, gen ekspresyon değerlendirmeleri için yeterli bulunmamıştır. Farklı çalışmalarda, yüksek saflıkta spermatogonya eldesinde akış sitometri (FACS) [127, 128], MACS (Manyetik Hücre Seçimi) [129], laminin matriksle kaplı [130] ortamda kültürasyon gibi farklı yöntemler kullanılmıştır. MACS ve akış sitometri yöntemlerinde, spermatogonyalara özgü olan belirteçler ile pozitif seçim ve spermatogonyalar tarafından eksprese edilmeyen genlerin ekspresyon analizi ile de negatif seçimler yapılmaktadır. Böylece, yüksek saflıkta (>%80) spermatogonya eldesi gerçekleştirilebilmektedir. Araştırmamızda diğer spermatogenik hücrelerin izolasyonunda %2-4 BSA gradiyenti kullanılması nedeniyle, spermatogonya eldesi için farklı bir yöntemin kullanılmasının uygun olmayacağı düşünülmüştür. Ergin erkek fare testisinden spermatogonya eldesi mümkün olmaması nedeniyle, bu dönemdeki spermatogonyaların ePABP ve PABPC1 ekspresyon durumları sadece RNA *in situ* hibridizasyon ile değerlendirilmiştir. RNA *in situ* uygulaması sonucunda, ePABP mRNA düzeyinin spermatogonyalarda yüksek düzeyde olduğu gözlenirken; PABPC1 mRNA düzeyinin ise oldukça düşük miktarda olduğu görüldü. Spermatogonyalardaki bu ekspresyon durumu, bu hücrelerdeki mRNA'ların sitoplazmik poliadenilasyon kontrollerinde ePABP'in önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir.

Çalışmamızda, ergin erkek fare testisinden izole edilen spermatogenik hücrelere uygulanan qRT-PCR ve testis örnekleri üzerinde gerçekleştirilen RNA *in situ* hibridizasyon sonuçları temel alındığında: ergin erkek fare testisinde spermatosit ve yuvarlak spermatidlerde yüksek düzeyde PABPC1 mRNA'sı olduğu gözlenirken, spermatogonya ve uzamış spermatidlerde ise oldukça düşük düzeyde olduğu görüldü. Bu bulgular, Kleene ve arkadaşlarının ergin fare testisinden BSA gradiyentinin birim yerçekiminde sedimantasyonu yolu ile spermatogenik hücreleri (pakiten spermatosit, yuvarlak spermatid ve uzamış spermatidleri (geç dönem spermatidleri)) izole ettikleri sonuçlar ile uyumludur [61]. Araştırmacılar tarafından izole edilen spermatogenik hücrelerde PABPC1 ve PABPC2 (PABPt) mRNA düzeyleri Northern blot yöntemi ile ortaya konulmuştur. Pakiten spermatosit ve yuvarlak spermatidlerde yüksek düzeyde PABPC1

ekspresyonu gözlenirken; uzamış spermatidlerde ise PABPC1 ekspresyonu olmadığı görülmüştür. PABPC2 ekspresyonu ise PABPC1 sonuçlarına benzer olarak, pakiten spermatozoid ve yuvarlak spermatidler yüksek ekspresyon görülürken; uzamış spermatidlerde PABPC2 ekspresyonu belirlenmemiştir. Bu sonuçlar, çalışmamızda qRT-PCR ve RNA *in situ* hibridizasyon ile ergin erkek farelerde elde ettiğimiz sonuçlarla büyük ölçüde uyumlu olduğu görülmektedir. Çalışmamızda, Kleene ve arkadaşları tarafından elde edilen sonuçlara benzer olarak spermatozoid ve yuvarlak spermatidlerde yüksek düzeyde PABPC1 mRNA ekspresyonu olduğu ortaya konuldu. Fakat, Kleene ve arkadaşları uzamış spermatidlerde PABPC1 ekspresyonu belirlememelerine rağmen; çalışmamızda hem RNA *in situ* hem de qRT-PCR uygulamaları sonucunda uzamış spermatidlerde PABPC1 mRNA'sının varlığı gözlemlendi. İki çalışmanın US fraksiyonlarından elde edilen sonuçlardaki farklılığın kullanılan tekniklerden kaynaklandığı kanısındayız. Çalışmamızda kullanılan qRT-PCR tekniği, Northern blot yöntemine göre daha hassas bir teknik olup; az miktarda bulunan mRNA'ların varlığının gösterilmesinde etkin bir yöntemdir. Bu nedenle, US fraksiyonunda PABPC1 mRNA'sının var olduğu; fakat Northern blot yöntemi ile ortaya konulamayacak kadar düşük düzeyde olduğu düşünülmektedir.

Féral ve arkadaşları ise insan somatik ve gonadal dokularda PABPC1 ve PABPC3 (PABP3) gen ekspresyon düzeylerini araştırmışlardır. Dalak, timus, prostat, testis, ovaryum, incebağırsak, kolon ve periferik kan lökositlerinde bu genlerin mRNA düzeylerini Northern blot ile değerlendirdiklerinde: testis ve ovaryumda PABPC1 mRNA düzeyi en yüksek düzeyde olmakla birlikte, bütün somatik dokularda bu genin ekspresyonunu gözlemişlerdir. PABPC3 ise faredeki ekspresyon durumuna paralel olarak, analiz edilen insan dokuları arasında sadece testiste olduğu belirlenmiştir. Aynı çalışmada PABPC1 ve PABPC3 mRNA'larının ergin insan testis dokusundaki hücresel yerleşimleri RNA *in situ* hibridizasyon yöntemiyle değerlendirilmiştir [62]. RNA *in situ* hibridizasyon uygulamasında bu genlere özgü olan anlamlı ve anlamsız oligonükleotid problemler kullanılmıştır. PABPC1 mRNA'sının pakiten spermatozoid ve yuvarlak spermatidlerde yerleşik olduğu gözlemişlerdir. PABPC2 mRNA'sının ise sadece yuvarlak spermatidlerde olduğu belirlenmiştir. İnsan testisinde PABPC1 mRNA yerleşimi, çalışmamızdaki bulgulardan farklılık göstermektedir. Çalışmamızdaki fare testisinde PABPC1 mRNA'sı pakiten spermatozoid ve yuvarlak spermatidlere ek olarak düşük düzeyde de olsa spermatogonya ve uzamış spermatidlerde de bulunmuştur. Bu farklılığın, spermatogonya ve uzamış spermatidlerin memeli türüne bağlı olarak PABPC1 için ekspresyonel farklılık göstermelerinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, çalışmamızda PABPC1 mRNA'sının belirlenmesi için DNA probe kullanılırken, bu çalışmada oligonükleotid problemlerden yararlanılmıştır. Bu durumun da spermatogonya ve uzamış spermatidlerde farklı sonuçların bulunmasına neden olmuş olabilir.

Özetle, ePABP ve PABPC1 gen ekspresyonları postnatal testis gelişim sürecinde zamansal ve uzaysal farklılıklar göstermektedir. Postnatal

testislerde, ePABP 29. gün testiste artmaya başlarken; PABPC1 ise 16. günde yükselmeye başlamaktadır. Postnatal gelişimin 29., 32., ve 88. günlerinde izole edilen spermatozoidlerde PABPC1 düzeyi ePABP'e göre daha yüksek miktardadır. Fakat, bu genlerin postnatal testis ve izole edilen spermatogonik hücrelerdeki ekspresyon durumlarında benzerlikler de bulunmaktadır. Her iki genin ekspresyon düzeyi de 32. gün testisinde en yüksek düzeye ulaşmakta ve 88. günde de bu yüksek ekspresyon devam etmektedir. Ayrıca, 32. gün testisten izole edilen spermatogonyaya ve yuvarlak spermatidlerde ePABP ve PABPC1 genlerinin yüksek ekspresyon gösterdikleri gözlenmiştir. Erkek fare testis kesitlerinde RNA *in situ* hibridizasyon uygulamalarında da ePABP düzeyi spermatogonyalarda yüksek düzeyde bulunurken, PABPC1 düzeyi ise oldukça düşük düzeyde bulunmuştur. ePABP ve PABPC1 genlerinin postnatal testis ve izole edilen spermatogonik hücrelerdeki ekspresyonları, spermatogenez sürecinde mRNA'ların translasyonel kontrolleri ve deadenilasyondan korunmasında önemli rolleri olduğunu düşündürmektedir. Bu olası rollerin net olarak ortaya konulabilmesi için protein düzeyinde yeni çalışmalara gereksinim duyulmaktadır. Protein düzeyinde çalışmalar yapılabilmesi için PABPC1 için ticari antikolar olmasına rağmen, ePABP'e özgü antikor üretimi gerekmektedir. Bu nedenle, insan ve farede ePABP ile ilgili yapılmış olan çalışmalar sadece mRNA düzeyindedir. ePABP proteinine özgü antikor üretimi, bu proteininin spermatogenez ve oogenez sürecindeki rollerinin ve PABPC1 ile olan ilişkisinin açık bir şekilde ortaya konulmasını sağlayacaktır. Ayrıca, ePABP'in etkileşim içinde olduğu mRNA'lar ve proteinler de belirlenebilecektir.



## SONUÇLAR

Bu çalışma ile postnatal fare testis dokularında ePABP ve PABPC1 genlerinin ekspresyon düzeyleri ve hücresel yerleşimleri araştırılmıştır. Ayrıca, immatür ve matür testislerden izole edilen spermatogenik hücrelerde bu genlerin kantitatif ekspresyon durumları da değerlendirildi. Çalışma kapsamında elde edilen sonuçlar aşağıda maddeler halinde özetlenmiştir.

1. Postnatal testis dönemlerinde (6., 8., 16., 20., 29., 32. ve 88. günlerde) ePABP gen ekspresyonu 29. günde belirgin oranda artmakta ve 32. gün testiste en yüksek düzeyine ulaşmaktadır. Ergin fare testisinde ise (88. gün) ePABP düzeyi 32. günden düşük, 29. günden ise yüksek düzeyde bulundu.
2. Aynı postnatal günlerde PABPC1 ekspresyonu ise 16. günden belirgin bir artış göstermekte ve ePABP'e benzer olarak 32. günde en yüksek düzeyine ulaşmaktadır. Ergin fare testisinde (88. gün) ise 32. günden düşük olmakla birlikte 29. günden daha yüksek miktarda PABPC1 mRNA varlığı belirlendi.
3. %2-4 süresiz BSA gradiyent yöntemi ile spermatogenik hücrelerin izolasyonu, hücre kültürü araştırmalarında kullanılacak güvenilir bir izolasyon tekniğidir.
4. Postnatal fare testislerinde %2-4 süresiz BSA gradiyenti ile elde edilen spermatogenik hücre fraksiyonlarında Prm2 ile Scp3 genlerinin SS ile YS fraksiyonlarında beklenildiği gibi yüksek düzeyde eksprese edilmektedir.
5. Germinal epitel hücrelerinin seminifer tübüllerdeki oranları, postnatal gelişim günlerine bağlı olarak farklılıklar göstermektedir. Spermatogenik hücrelerin gelişim dönemindeki oranlarına bağlı olarak, postnatal testislerdeki ePABP ve PABPC1 gen ekspresyonuna katkı düzeyleri değişmektedir.
6. ePABP gen ekspresyonu, postnatal testis günlerinden izole edilen spermatogonya, spermatosit ve yuvarlak spermatid fraksiyonlarında en yüksek düzeyine 32. gün testiste ulaşmaktadır. Otuz ikinci günde spermatogenezin spermiyogenez aşaması görülmeye başlamaktadır. Bilindiği gibi, spermiyogenezin ortasında transkripsiyonel aktivite durmaktadır. Bu dönemde yüksek ePABP ekspresyonunun, erken

spermatogenezde sentezlenen ve depolanan mRNA'ların translasyonel kontrolleri için gerekli olabileceği düşünülmektedir.

7. Spermatogonya fraksiyonundaki yüksek ePABP ekspresyonunun öneminin ne olduğu net olarak bilinmemekle birlikte; ePABP'in bu hücrelerin mitotik aktivite ve farklılaşma süreçlerini kontrol eden genlere ait mRNA'ların translasyonel düzenlenmesinde görev aldığı kanısındayız.
8. Spermatozit fraksiyonlarında ePABP gen ekspresyon düzeyinin spermatogonya ve yuvarlak spermatozid fraksiyonlarından (29., 32. ve 88. günlerden elde edilen) düşük düzeyde olması ePABP'in spermatozitlerdeki mayoz bölünme ve diğer hücre içi fizyolojik aktivite için çok kritik olmadığını düşündürmektedir.
9. PABPC1 gen ekspresyonu, ePABP'e benzer olarak 32. gün testisten elde edilen spermatogonya, spermatozit ve yuvarlak spermatozid fraksiyonlarında en yüksek düzeyine ulaşmaktadır. Fakat, PABPC1 mRNA düzeyi, ePABP'den farklı olarak spermatozit fraksiyonunda spermatogonya ve yuvarlak spermatozid fraksiyonlarından daha yüksektir. Bu durum, spermatozitlerdeki mayoz bölünme ve diğer hücre içi fizyolojik süreçlerde gerekli olan mRNA'ların translasyonel kontrollerinde PABPC1'in ePABP'e göre daha etkin bir rol oynadığını düşündürmektedir.
10. Otuz iki günlük testisteki, spermatogonya ve yuvarlak spermatozidlerde de yüksek düzeyde PABPC1 transkripti bulunması; bu hücrelerdeki posttranskripsiyonel kontrol işlemlerinde PABPC1'in ePABP ile birlikte görev yaptığı kanısındayız.
11. ePABP mRNA'sı, RNA *in situ* hibridizasyon uygulaması sonucunda postnatal fare testis dokularının (6., 8., 16., 29., 32. ve 88. gün) seminifer tübüllerinde gözlenmiştir. Seminifer tübüllerde ise ePABP mRNA'sı sadece spermatogonik hücrelerin sitoplazmalarında belirlenmiştir. RNA *in situ* hibridizasyon ile postnatal testis dokularındaki spermatogonik hücrelerdeki ePABP ekspresyonu, izole edilen spermatogonik hücrelerde qRT-PCR ile belirlenen ePABP ekspresyon sonuçlarıyla uyumludur.
12. Ergin erkek fare (88. gün) testisinde, RNA *in situ* uygulaması sonucunda spermatogonyalarda yoğun ePABP ekspresyonu görülmesi: ePABP'in bu hücrelerin mitotik aktivite ve primer spermatozitlere farklılaşma süreçlerinde görev alan mRNA'ların translasyonel kontrollerinde görev aldığını düşündürmektedir.
13. Ergin erkek fare (88. gün) testisinde yuvarlak spermatozidlerde, spermatozit, uzamış spermatozid ve sperm fraksiyonlarından daha yüksek ePABP ekspresyonu vardır. ePABP'in bu yüksek ekspresyonu erken

spermatogenez sürecinde sentezlenip, depolanan mRNA'ların degradasyondan korunması ve posttranskripsiyonel kontrol aşamalarında bu genin görev aldığını göstermektedir.

14. RNA *in situ* hibridizasyon uygulaması sonucunda, ergin erkek fare testis dokusunda PABPC1 mRNA'sı seminifer tübüllerdeki spermatogenik hücrelerin ve intertübüler alandaki hücrelerin sitoplazmalarında gözlenmiştir. Spermatogenik hücrelerde, PABPC1 ekspresyonu yuvarlak spermatid ile spermatositlerde spermatogonya ve uzamış spermatidlerden daha yüksektir. PABPC1'in ePABP'den farklı olarak, spermatositlerde yüksek düzeyde bulunması, spermatositlerdeki posttranskripsiyonel kontrol sürecinde PABPC1'in ePABP'e göre daha etkin bir rol oynadığı kanısındayız. Yuvarlak spermatidlerde ise depo mRNA'ların translasyonel kontrollerinde ePABP ile PABPC1'in birlikte fonksiyon görüyor olabilirler. Spermatogonyalarda PABPC1 mRNA düzeyinin zayıf olması: ePABP'in bu hücrelerde PABPC1'e göre daha etkin olduğunu düşündürmektedir.

## KAYNAKLAR

1. Demir R. Histoloji ve hücre biyolojisi: patolojiye giriş: Spermatogenez. 2006, Palme kitabevi: Ankara.
2. Neill J.D. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction: 2005, Elsevier academic press: San Diego.
3. Demir R. and Vatansever S. Di Fiore histoloji atlası fonksiyonel ilişkileriyle: Erkek üreme sistemi 2008, Palme Yayıncılık: Ankara.
4. Aytekin Y. and Solakoglu S. Temel histoloji: 2009, Nobel tıp kitabevi: Ankara.
5. Moore K.L. and Persaud T.V.N. Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi: 2009, Nobel kitabevi: Capa, Istanbul, Turkey.
6. Başaklar A.C. Langman's medikal embriyoloji: Genital sistem. 1995, Palme yayınevi:
7. Verma G.P. Fundamentals of histology: 2001, New age international publisher:
8. Junqueira L.C. and Carneiro J. Temel histoloji: Erkek Üreme Sistemi. 2009, Nobel kitabevi: Istanbul.
9. Shalet S.M. Normal testicular function and spermatogenesis. Pediatr Blood Cancer, 2009; 53(2): 285-8.
10. Clermont Y. and Trott M. Duration of the cycle of the seminiferous epithelium in the mouse and hamster determined by means of 3H-thymidine and radioautography. Fertil Steril, 1969; 20(5): 805-17.
11. Eddy E.M. Male germ cell gene expression. Recent Prog Horm Res, 2002; 57(103-28).
12. Strauss J.F. and Barbieri R.L. Yen and Jaffe's reproductive endocrinology: The testis and male accessory organs. 2004, Elsevier Saunders: Pennsylvania.

13. Sertoli E. Dell'esistenza di particolari cellule ramificate nei canali-coli seminiferi del testicolo umano. Morgagni, 1865; 7(
14. Shatkin A.J. and Manley J.L. The ends of the affair: capping and polyadenylation. *Nat Struct Biol*, 2000; 7(10): 838-42.
15. Proudfoot N.J., Furger A. and Dye M.J. Integrating mRNA processing with transcription. *Cell*, 2002; 108(4): 501-12.
16. Wilusz C.J., Wormington M. and Peltz S.W. The cap-to-tail guide to mRNA turnover. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001; 2(4): 237-46.
17. Mata J., Marguerat S. and Bahler J. Post-transcriptional control of gene expression: a genome-wide perspective. *Trends Biochem Sci*, 2005; 30(9): 506-14.
18. Kini H.K., Vishnu M.R. and Liebhaber S.A. Too much PABP, too little translation. *J Clin Invest*, 2010; 120(9): 3090-3.
19. Jackson R.J., Hellen C.U. and Pestova T.V. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010; 11(2): 113-27.
20. Villalba A., Coll O. and Gebauer F. Cytoplasmic polyadenylation and translational control. *Curr Opin Genet Dev*, 2011;
21. Imataka H., Gradi A. and Sonenberg N. A newly identified N-terminal amino acid sequence of human eIF4G binds poly(A)-binding protein and functions in poly(A)-dependent translation. *EMBO J*, 1998; 17(24): 7480-9.
22. Tarun S.Z., Jr. and Sachs A.B. Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G. *EMBO J*, 1996; 15(24): 7168-77.
23. Wells S.E., Hillner P.E., Vale R.D. and Sachs A.B. Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Mol Cell*, 1998; 2(1): 135-40.
24. Steger K. Transcriptional and translational regulation of gene expression in haploid spermatids. *Anat Embryol (Berl)*, 1999; 199(6): 471-87.
25. Hecht N.B. Molecular mechanisms of male germ cell differentiation. *Bioessays*, 1998; 20(7): 555-61.

26. Penttila T.L., Yuan L., Mali P., Hoog C. and Parvinen M. Haploid gene expression: temporal onset and storage patterns of 13 novel transcripts during rat and mouse spermiogenesis. *Biol Reprod*, 1995; 53(3): 499-510.
27. Kimmins S., Kotaja N., Davidson I. and Sassone-Corsi P. Testis-specific transcription mechanisms promoting male germ-cell differentiation. *Reproduction*, 2004; 128(1): 5-12.
28. Wright R.M., John E., Klotz K., Flickinger C.J. and Herr J.C. Cloning and sequencing of cDNAs coding for the human intra-acrosomal antigen SP-10. *Biol Reprod*, 1990; 42(4): 693-701.
29. Kistler M.K., Sassone-Corsi P. and Kistler W.S. Identification of a functional cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element in the 5'-flanking region of the gene for transition protein 1 (TP1), a basic chromosomal protein of mammalian spermatids. *Biol Reprod*, 1994; 51(6): 1322-9.
30. Peschon J.J., Behringer R.R., Brinster R.L. and Palmiter R.D. Spermatid-specific expression of protamine 1 in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987; 84(15): 5316-9.
31. Flach G., Johnson M.H., Braude P.R., Taylor R.A. and Bolton V.N. The transition from maternal to embryonic control in the 2-cell mouse embryo. *EMBO J*, 1982; 1(6): 681-6.
32. Braude P., Bolton V. and Moore S. Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature*, 1988; 332(6163): 459-61.
33. Kim J.H. and Richter J.D. Opposing polymerase-deadenylase activities regulate cytoplasmic polyadenylation. *Mol Cell*, 2006; 24(2): 173-83.
34. Richter J.D. Cytoplasmic polyadenylation in development and beyond. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1999; 63(2): 446-56.
35. Monesi V. Ribonucleic Acid Synthesis during Mitosis and Meiosis in the Mouse Testis. *J Cell Biol*, 1964; 22(521-32).
36. Yan W. Male infertility caused by spermiogenic defects: lessons from gene knockouts. *Mol Cell Endocrinol*, 2009; 306(1-2): 24-32.

37. Giorgini F., Davies H.G. and Braun R.E. Translational repression by MSY4 inhibits spermatid differentiation in mice. *Development*, 2002; 129(15): 3669-79.
38. Yang J., Morales C.R., Medvedev S., Schultz R.M. and Hecht N.B. In the absence of the mouse DNA/RNA-binding protein MSY2, messenger RNA instability leads to spermatogenic arrest. *Biol Reprod*, 2007; 76(1): 48-54.
39. Mali P., Kaipia A., Kangasniemi M., Toppari J., Sandberg M., Hecht N.B. and Parvinen M. Stage-specific expression of nucleoprotein mRNAs during rat and mouse spermiogenesis. *Reprod Fertil Dev*, 1989; 1(4): 369-82.
40. Shih D.M. and Kleene K.C. A study by in situ hybridization of the stage of appearance and disappearance of the transition protein 2 and the mitochondrial capsule seleno-protein mRNAs during spermatogenesis in the mouse. *Mol Reprod Dev*, 1992; 33(2): 222-7.
41. McCarrey J.R., Berg W.M., Paragioudakis S.J., Zhang P.L., Dilworth D.D., Arnold B.L. and Rossi J.J. Differential transcription of Pgk genes during spermatogenesis in the mouse. *Dev Biol*, 1992; 154(1): 160-8.
42. Schumacher J.M., Lee K., Edelhoff S. and Braun R.E. Distribution of Tenr, an RNA-binding protein, in a lattice-like network within the spermatid nucleus in the mouse. *Biol Reprod*, 1995; 52(6): 1274-83.
43. Schumacher J.M., Lee K., Edelhoff S. and Braun R.E. Spnr, a murine RNA-binding protein that is localized to cytoplasmic microtubules. *J Cell Biol*, 1995; 129(4): 1023-32.
44. Braun R.E. Post-transcriptional control of gene expression during spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol*, 1998; 9(4): 483-9.
45. Curtis D., Lehmann R. and Zamore P.D. Translational regulation in development. *Cell*, 1995; 81(2): 171-8.
46. Wickens M., Anderson P. and Jackson R.J. Life and death in the cytoplasm: messages from the 3' end. *Curr Opin Genet Dev*, 1997; 7(2): 220-32.
47. Kleene K.C. Poly(A) shortening accompanies the activation of translation of five mRNAs during spermiogenesis in the mouse. *Development*, 1989; 106(2): 367-73.

48. Sachs A.B., Davis R.W. and Kornberg R.D. A single domain of yeast poly(A)-binding protein is necessary and sufficient for RNA binding and cell viability. *Mol Cell Biol*, 1987; 7(9): 3268-76.
49. Sigrist S.J., Thiel P.R., Reiff D.F., Lachance P.E., Lasko P. and Schuster C.M. Postsynaptic translation affects the efficacy and morphology of neuromuscular junctions. *Nature*, 2000; 405(6790): 1062-5.
50. Simmer F., Moorman C., van der Linden A.M., Kuijk E., van den Berghe P.V., Kamath R.S., Fraser A.G., Ahringer J. and Plasterk R.H. Genome-wide RNAi of *C. elegans* using the hypersensitive rrf-3 strain reveals novel gene functions. *PLoS Biol*, 2003; 1(1): E12.
51. Blobel G. A protein of molecular weight 78,000 bound to the polyadenylate region of eukaryotic messenger RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1973; 70(3): 924-8.
52. Grange T., de Sa C.M., Oddos J. and Pictet R. Human mRNA polyadenylate binding protein: evolutionary conservation of a nucleic acid binding motif. *Nucleic Acids Res*, 1987; 15(12): 4771-87.
53. Kuhn U. and Wahle E. Structure and function of poly(A) binding proteins. *Biochim Biophys Acta*, 2004; 1678(2-3): 67-84.
54. Mangus D.A., Evans M.C. and Jacobson A. Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the post-transcriptional control of gene expression. *Genome Biol*, 2003; 4(7): 223.
55. Burd C.G., Matunis E.L. and Dreyfuss G. The multiple RNA-binding domains of the mRNA poly(A)-binding protein have different RNA-binding activities. *Mol Cell Biol*, 1991; 11(7): 3419-24.
56. Sladic R.T., Lagnado C.A., Bagley C.J. and Goodall G.J. Human PABP binds AU-rich RNA via RNA-binding domains 3 and 4. *Eur J Biochem*, 2004; 271(2): 450-7.
57. Melo E.O., Dhalia R., Martins de Sa C., Standart N. and de Melo Neto O.P. Identification of a C-terminal poly(A)-binding protein (PABP)-PABP interaction domain: role in cooperative binding to poly (A) and efficient cap distal translational repression. *J Biol Chem*, 2003; 278(47): 46357-68.
58. Kozlov G., Trempe J.F., Khaleghpour K., Kahvejian A., Ekiel I. and Gehring K. Structure and function of the C-terminal PABC domain of



human poly(A)-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001; 98(8): 4409-13.

59. Yang H., Duckett C.S. and Lindsten T. iPABP, an inducible poly(A)-binding protein detected in activated human T cells. *Mol Cell Biol*, 1995; 15(12): 6770-6.
60. Cosson B., Berkova N., Couturier A., Chabelskaya S., Philippe M. and Zhouravleva G. Poly(A)-binding protein and eRF3 are associated in vivo in human and *Xenopus* cells. *Biol Cell*, 2002; 94(4-5): 205-16.
61. Kleene K.C., Wang M.Y., Cutler M., Hall C. and Shih D. Developmental expression of poly(A) binding protein mRNAs during spermatogenesis in the mouse. *Mol Reprod Dev*, 1994; 39(4): 355-64.
62. Feral C., Guellaen G. and Pawlak A. Human testis expresses a specific poly(A)-binding protein. *Nucleic Acids Res*, 2001; 29(9): 1872-83.
63. Blanco P., Sargent C.A., Boucher C.A., Howell G., Ross M. and Affara N.A. A novel poly(A)-binding protein gene (PABPC5) maps to an X-specific subinterval in the Xq21.3/Yp11.2 homology block of the human sex chromosomes. *Genomics*, 2001; 74(1): 1-11.
64. Voeltz G.K., Ongkasuwan J., Standart N. and Steitz J.A. A novel embryonic poly(A) binding protein, ePAB, regulates mRNA deadenylation in *Xenopus* egg extracts. *Genes Dev*, 2001; 15(6): 774-88.
65. Seli E., Lalioti M.D., Flaherty S.M., Sakkas D., Terzi N. and Steitz J.A. An embryonic poly(A)-binding protein (ePAB) is expressed in mouse oocytes and early preimplantation embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005; 102(2): 367-72.
66. Guzeloglu-Kayisli O., Pauli S., Demir H., Lalioti M.D., Sakkas D. and Seli E. Identification and characterization of human embryonic poly(A) binding protein (EPAB). *Mol Hum Reprod*, 2008; 14(10): 581-8.
67. Wahle E. A novel poly(A)-binding protein acts as a specificity factor in the second phase of messenger RNA polyadenylation. *Cell*, 1991; 66(4): 759-68.
68. Good P.J., Abler L., Herring D. and Sheets M.D. *Xenopus* embryonic poly(A) binding protein 2 (ePABP2) defines a new family of

cytoplasmic poly(A) binding proteins expressed during the early stages of vertebrate development. *Genesis*, 2004; 38(4): 166-75.

69. Gorgoni B. and Gray N.K. The roles of cytoplasmic poly(A)-binding proteins in regulating gene expression: a developmental perspective. *Brief Funct Genomic Proteomic*, 2004; 3(2): 125-41.
70. Bienroth S., Keller W. and Wahle E. Assembly of a processive messenger RNA polyadenylation complex. *EMBO J*, 1993; 12(2): 585-94.
71. Wahle E. Poly(A) tail length control is caused by termination of processive synthesis. *J Biol Chem*, 1995; 270(6): 2800-8.
72. Cosson B., Braun F., Paillard L., Blackshear P. and Beverley Osborne H. Identification of a novel *Xenopus laevis* poly (A) binding protein. *Biol Cell*, 2004; 96(7): 519-27.
73. Jacobson A.L. Myosin B--ouabain interactions. *Manit Med Rev*, 1968; 48(10): 451-3.
74. Wilkie G.S., Dickson K.S. and Gray N.K. Regulation of mRNA translation by 5'- and 3'-UTR-binding factors. *Trends Biochem Sci*, 2003; 28(4): 182-8.
75. Barkoff A.F., Dickson K.S., Gray N.K. and Wickens M. Translational control of cyclin B1 mRNA during meiotic maturation: coordinated repression and cytoplasmic polyadenylation. *Dev Biol*, 2000; 220(1): 97-109.
76. de Moor C.H. and Richter J.D. Cytoplasmic polyadenylation elements mediate masking and unmasking of cyclin B1 mRNA. *EMBO J*, 1999; 18(8): 2294-303.
77. Stebbins-Boaz B., Cao Q., de Moor C.H., Mendez R. and Richter J.D. Maskin is a CPEB-associated factor that transiently interacts with eIF-4E. *Mol Cell*, 1999; 4(6): 1017-27.
78. Mendez R., Murthy K.G., Ryan K., Manley J.L. and Richter J.D. Phosphorylation of CPEB by Eg2 mediates the recruitment of CPSF into an active cytoplasmic polyadenylation complex. *Mol Cell*, 2000; 6(5): 1253-9.
79. Sheets M.D., Fox C.A., Hunt T., Vande Woude G. and Wickens M. The 3'-untranslated regions of c-mos and cyclin mRNAs stimulate

translation by regulating cytoplasmic polyadenylation. *Genes Dev*, 1994; 8(8): 926-38.

80. Tarun S.Z., Jr., Wells S.E., Deardorff J.A. and Sachs A.B. Translation initiation factor eIF4G mediates in vitro poly(A) tail-dependent translation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997; 94(17): 9046-51.
81. Hoshino S., Imai M., Kobayashi T., Uchida N. and Katada T. The eukaryotic polypeptide chain releasing factor (eRF3/GSPT) carrying the translation termination signal to the 3'-Poly(A) tail of mRNA. Direct association of erf3/GSPT with polyadenylate-binding protein. *J Biol Chem*, 1999; 274(24): 16677-80.
82. Uchida N., Hoshino S., Imataka H., Sonenberg N. and Katada T. A novel role of the mammalian GSPT/eRF3 associating with poly(A)-binding protein in Cap/Poly(A)-dependent translation. *J Biol Chem*, 2002; 277(52): 50286-92.
83. Piccioni F., Zappavigna V. and Verrotti A.C. Translational regulation during oogenesis and early development: the cap-poly(A) tail relationship. *C R Biol*, 2005; 328(10-11): 863-81.
84. Tourriere H., Chebli K. and Tazi J. mRNA degradation machines in eukaryotic cells. *Biochimie*, 2002; 84(8): 821-37.
85. Bernstein P., Peltz S.W. and Ross J. The poly(A)-poly(A)-binding protein complex is a major determinant of mRNA stability in vitro. *Mol Cell Biol*, 1989; 9(2): 659-70.
86. Khanna R. and Kiledjian M. Poly(A)-binding-protein-mediated regulation of hDcp2 decapping in vitro. *EMBO J*, 2004; 23(9): 1968-76.
87. Gao M., Wilusz C.J., Peltz S.W. and Wilusz J. A novel mRNA-decapping activity in HeLa cytoplasmic extracts is regulated by AU-rich elements. *EMBO J*, 2001; 20(5): 1134-43.
88. Piron M., Vende P., Cohen J. and Poncet D. Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4GI and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F. *EMBO J*, 1998; 17(19): 5811-21.
89. Bevilacqua A., Ceriani M.C., Capaccioli S. and Nicolini A. Post-transcriptional regulation of gene expression by degradation of messenger RNAs. *J Cell Physiol*, 2003; 195(3): 356-72.

90. Chen C.Y., Gherzi R., Ong S.E., Chan E.L., Raijmakers R., Pruijn G.J., Stoecklin G., Moroni C., Mann M. and Karin M. AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs. *Cell*, 2001; 107(4): 451-64.
91. Kuyumcu-Martinez N.M., Van Eden M.E., Younan P. and Lloyd R.E. Cleavage of poly(A)-binding protein by poliovirus 3C protease inhibits host cell translation: a novel mechanism for host translation shutoff. *Mol Cell Biol*, 2004; 24(4): 1779-90.
92. Drawbridge J., Grainger J.L. and Winkler M.M. Identification and characterization of the poly(A)-binding proteins from the sea urchin: a quantitative analysis. *Mol Cell Biol*, 1990; 10(8): 3994-4006.
93. Fraser C.S., Pain V.M. and Morley S.J. The association of initiation factor 4F with poly(A)-binding protein is enhanced in serum-stimulated *Xenopus* kidney cells. *J Biol Chem*, 1999; 274(1): 196-204.
94. Bollig F., Winzen R., Gaestel M., Kostka S., Resch K. and Holtmann H. Affinity purification of ARE-binding proteins identifies polyA-binding protein 1 as a potential substrate in MK2-induced mRNA stabilization. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003; 301(3): 665-70.
95. Lee J. and Bedford M.T. PABP1 identified as an arginine methyltransferase substrate using high-density protein arrays. *EMBO Rep*, 2002; 3(3): 268-73.
96. Khanam T., Muddashetty R.S., Kahvejian A., Sonenberg N. and Brosius J. Poly(A)-binding protein binds to A-rich sequences via RNA-binding domains 1+2 and 3+4. *RNA Biol*, 2006; 3(4): 170-7.
97. Afonina E., Stauber R. and Pavlakis G.N. The human poly(A)-binding protein 1 shuttles between the nucleus and the cytoplasm. *J Biol Chem*, 1998; 273(21): 13015-21.
98. Hornstein E., Git A., Braunstein I., Avni D. and Meyuhas O. The expression of poly(A)-binding protein gene is translationally regulated in a growth-dependent fashion through a 5'-terminal oligopyrimidine tract motif. *J Biol Chem*, 1999; 274(3): 1708-14.
99. de Melo Neto O.P., Standart N. and Martins de Sa C. Autoregulation of poly(A)-binding protein synthesis in vitro. *Nucleic Acids Res*, 1995; 23(12): 2198-205.

100. Wu J. and Bag J. Negative control of the poly(A)-binding protein mRNA translation is mediated by the adenine-rich region of its 5'-untranslated region. *J Biol Chem*, 1998; 273(51): 34535-42.
101. Kimura M., Ishida K., Kashiwabara S. and Baba T. Characterization of two cytoplasmic poly(A)-binding proteins, PABPC1 and PABPC2, in mouse spermatogenic cells. *Biol Reprod*, 2009; 80(3): 545-54.
102. Gu W., Kwon Y., Oko R., Hermo L. and Hecht N.B. Poly (A) binding protein is bound to both stored and polysomal mRNAs in the mammalian testis. *Mol Reprod Dev*, 1995; 40(3): 273-85.
103. Martineau Y., Derry M.C., Wang X., Yanagiya A., Berlanga J.J., Shyu A.B., Imataka H., Gehring K. and Sonenberg N. Poly(A)-binding protein-interacting protein 1 binds to eukaryotic translation initiation factor 3 to stimulate translation. *Mol Cell Biol*, 2008; 28(21): 6658-67.
104. Khaleghpour K., Svitkin Y.V., Craig A.W., DeMaria C.T., Deo R.C., Burley S.K. and Sonenberg N. Translational repression by a novel partner of human poly(A) binding protein, Paip2. *Mol Cell*, 2001; 7(1): 205-16.
105. Karim M.M., Svitkin Y.V., Kahvejian A., De Crescenzo G., Costa-Mattioli M. and Sonenberg N. A mechanism of translational repression by competition of Paip2 with eIF4G for poly(A) binding protein (PABP) binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006; 103(25): 9494-9.
106. Khaleghpour K., Kahvejian A., De Crescenzo G., Roy G., Svitkin Y.V., Imataka H., O'Connor-McCourt M. and Sonenberg N. Dual interactions of the translational repressor Paip2 with poly(A) binding protein. *Mol Cell Biol*, 2001; 21(15): 5200-13.
107. Yanagiya A., Delbes G., Svitkin Y.V., Robaire B. and Sonenberg N. The poly(A)-binding protein partner Paip2a controls translation during late spermiogenesis in mice. *J Clin Invest*, 2010; 120(9): 3389-400.
108. Friend K., Brook M., Bezirci F.B., Sheets M.D., Gray N.K. and Seli E. Embryonic poly(A)-binding protein (ePAB) phosphorylation is required for *Xenopus* oocyte maturation. *Biochem J*, 2012;
109. Guzeloglu-Kayisli O., Lalioti M.D., Aydiner F., Sasson I., Ilbay O., Sakkas D., Lowther K.M., Mehlmann L.M. and Seli E. Embryonic poly(A) binding protein (EPAB) is required for oocyte maturation and female fertility in mice. *Biochem J*, 2012;

110. Kashiwabara S., Arai Y., Kodaira K. and Baba T. Acrosin biosynthesis in meiotic and postmeiotic spermatogenic cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1990; 173(1): 240-5.
111. Aslam I., Robins A., Dowell K. and Fishel S. Isolation, purification and assessment of viability of spermatogenic cells from testicular biopsies of azoospermic men. *Hum Reprod*, 1998; 13(3): 639-45.
112. Romrell L.J., Bellve A.R. and Fawcett D.W. Separation of mouse spermatogenic cells by sedimentation velocity. A morphological characterization. *Dev Biol*, 1976; 49(1): 119-31.
113. Bellve A.R. Purification, culture, and fractionation of spermatogenic cells. *Methods Enzymol*, 1993; 225(84-113).
114. Bellve A.R., Cavicchia J.C., Millette C.F., O'Brien D.A., Bhatnagar Y.M. and Dym M. Spermatogenic cells of the prepuberal mouse. Isolation and morphological characterization. *J Cell Biol*, 1977; 74(1): 68-85.
115. Forand A., Messiaen S., Habert R. and Bernardino-Sgherri J. Exposure of the mouse perinatal testis to radiation leads to hypospermia at sexual maturity. *Reproduction*, 2009; 137(3): 487-95.
116. Meng X., Lindahl M., Hyvonen M.E., Parvinen M., de Rooij D.G., Hess M.W., Raatikainen-Ahokas A., Sainio K., Rauvala H., Lakso M., Pichel J.G., Westphal H., Saarma M. and Sariola H. Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science*, 2000; 287(5457): 1489-93.
117. Naughton C.K., Jain S., Strickland A.M., Gupta A. and Milbrandt J. Glial cell-line derived neurotrophic factor-mediated RET signaling regulates spermatogonial stem cell fate. *Biol Reprod*, 2006; 74(2): 314-21.
118. Chen C., Ouyang W., Grigura V., Zhou Q., Carnes K., Lim H., Zhao G.Q., Arber S., Kurpios N., Murphy T.L., Cheng A.M., Hassell J.A., Chandrashekar V., Hofmann M.C., Hess R.A. and Murphy K.M. ERM is required for transcriptional control of the spermatogonial stem cell niche. *Nature*, 2005; 436(7053): 1030-4.
119. Falender A.E., Freiman R.N., Geles K.G., Lo K.C., Hwang K., Lamb D.J., Morris P.L., Tjian R. and Richards J.S. Maintenance of spermatogenesis requires TAF4b, a gonad-specific subunit of TFIID. *Genes Dev*, 2005; 19(7): 794-803.

120. Oatley J.M., Avarbock M.R., Telaranta A.I., Fearon D.T. and Brinster R.L. Identifying genes important for spermatogonial stem cell self-renewal and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006; 103(25): 9524-9.
121. Takubo K., Ohmura M., Azuma M., Nagamatsu G., Yamada W., Arai F., Hirao A. and Suda T. Stem cell defects in ATM-deficient undifferentiated spermatogonia through DNA damage-induced cell-cycle arrest. *Cell Stem Cell*, 2008; 2(2): 170-82.
122. Costoya J.A., Hobbs R.M., Barna M., Cattoretti G., Manova K., Sukhwani M., Orwig K.E., Wolgemuth D.J. and Pandolfi P.P. Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells. *Nat Genet*, 2004; 36(6): 653-9.
123. de Rooij D.G., Okabe M. and Nishimune Y. Arrest of spermatogonial differentiation in *jsd/jsd*, *Sl17H/Sl17H*, and cryptorchid mice. *Biol Reprod*, 1999; 61(3): 842-7.
124. Ballow D., Meistrich M.L., Matzuk M. and Rajkovic A. *Sohlh1* is essential for spermatogonial differentiation. *Dev Biol*, 2006; 294(1): 161-7.
125. Hao J., Yamamoto M., Richardson T.E., Chapman K.M., Denard B.S., Hammer R.E., Zhao G.Q. and Hamra F.K. *Sohlh2* knockout mice are male-sterile because of degeneration of differentiating type A spermatogonia. *Stem Cells*, 2008; 26(6): 1587-97.
126. Raverot G., Weiss J., Park S.Y., Hurley L. and Jameson J.L. *Sox3* expression in undifferentiated spermatogonia is required for the progression of spermatogenesis. *Dev Biol*, 2005; 283(1): 215-25.
127. Izadyar F., Wong J., Maki C., Pacchiarotti J., Ramos T., Howerton K., Yuen C., Greilach S., Zhao H.H., Chow M., Chow Y.C., Rao J., Barritt J., Bar-Chama N. and Copperman A. Identification and characterization of repopulating spermatogonial stem cells from the adult human testis. *Hum Reprod*, 2011; 26(6): 1296-306.
128. Choi Y.H., Park C.H., Kim W., Ling H., Kang A., Chang M.W., Im S.K., Jeong H.W., Kong Y.Y. and Kim K.T. Vaccinia-related kinase 1 is required for the maintenance of undifferentiated spermatogonia in mouse male germ cells. *PLoS One*, 2010; 5(12): e15254.
129. Gassei K., Ehmcke J. and Schlatt S. Efficient enrichment of undifferentiated GFR alpha 1+ spermatogonia from immature rat testis

by magnetic activated cell sorting. *Cell Tissue Res*, 2009; 337(1): 177-83.

- 130.** Hamra F.K., Chapman K.M., Wu Z. and Garbers D.L. Isolating highly pure rat spermatogonial stem cells in culture. *Methods Mol Biol*, 2008; 450(163-79).



## ÖZGEÇMİŞ

Saffet Öztürk, 1979 yılında Manisa/Ahmetli, Mandallı Köyünde doğdu. Ortaokul ve lise eğitimini, sırasıyla Turgutlu Ortaokulu (1994) ve Turgutlu lisesinde (1997) tamamladı. 1997-2002 yılları arasında Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümünden bölüm ve fakülte ikincisi olarak mezun oldu. Yüksek lisans eğitimimi (2002-2005), Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalının Tıbbi Genetik Programında tamamladı. Askerlik görevini takiben, doktora eğitimine 2006 yılında Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında başladı. Saffet Öztürk, TÜBİTAK 2214 (Doktora öğrencileri için yurtdışı araştırma bursu) bursu ile doktora tez çalışmalarının bir bölümünü gerçekleştirmek üzere 2010-2011 yılları arasında Yale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Bölümde çalışmalar yapmıştır. Yüksek lisans ve doktora eğitim dönemlerinde Science Citation Index ve Science Citation Index-Expanded'a kayıtlı dergilerde yayınlanmış 12 makale çalışması bulunan Saffet Öztürk, 12'si uluslararası olmak üzere 29 bildiriye sahiptir. Ayrıca, 6 araştırma projesinde görev yapan Saffet Öztürk, eğitim-öğretim sürecinde yapmış olduğu bilimsel araştırmaların sonucunda 4 adet ödüle layık görülmüştür.