

ÖZGÜN ARAŞTIRMA

Postnatal Fare Testis Gelişiminde Kaspaz-Bağımlı ve Kaspaz-Bağımsız Apoptozun Değerlendirilmesi*

Nazlı Ece GÜNGÖR-ORDUERİ¹, Tuğba ELGÜN¹, Pınar ŞAHİN², Nilay KUŞCU², Çiler ÇELİK-ÖZENCİ²

¹ Biruni Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

² Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Antalya.

ÖZET

Hücre ölümü; testis gelişimi sırasında “kaspaz-bağımlı” ya da mitokondriden salınan Apoptoz indükleyici factor (AIF) gibi çeşitli proapoptotik faktörler aracılığıyla “kaspaz-bağımsız” olmak üzere iki şekilde düzenlenmektedir. PARP-1’in aşırı aktivasyonunun hücre ölümünde önemli bir rolü olduğu bilinmekte ancak fare testis gelişiminde rolü olup olmadığı bilinmemektedir. Bu çalışmanın amacı, postnatal testis gelişiminde, apoptotik yollara ait proteinlerin incelenmesidir. Postnatal (PN) gelişimin 0, 5, 9, 15, 20. günlerinde ve erişkin fare testis dokularında; PARP-1, yarıklanmış (cleaved) PARP-1 (cPARP-1), cleaved-Caspase-3 (cCsp3-3) ve AIF proteinlerinin düzeyleri western blot ve immünohistokimya, apoptoz ise TUNEL metodu ile değerlendirilmiştir. Protein yoğunluklarına göre, PARP-1 ekspresyonu, seçilen tüm günlerde aynıdır. cPARP-1 ve cCsp3-3’ün, PN0, PN5, PN9 ve PN15 günlerinde ekspresyonları benzerdir. PN5. günde artan AIF protein düzeyleri, PN9, PN15, PN20. günlerde ve erişkinde de artmıştır. cCsp3-3 ekspresyonu, PN0 ve PN5 günlerinde gonosit ve spermatogonya sitoplazmalarında yoğun, PN9, PN15 ve PN20 günlerinde sadece apoptotik hücrelerde, erişkin de ise yine apoptotik hücrelerde ve uzayan spermatidlerde nüklear olarak izlenmiştir. AIF ekspresyonu, PN0. günde gonositlerin ve PN5 ve PN9. günlerde spermatogonya sitoplazmalarında, PN9. günden itibaren PN15. ve PN20. günlerde spermatositlerin sitoplazmalarında artan düzeylerde izlenmiştir. PN5. günde spermatogonyular TUNEL pozitif iken, PN9. günden itibaren esasen mayotik hücrelerde reaksiyon izlenmiştir. Bulgularımız, postnatal gelişim sürecinde doğumdan sonra esasen kaspaz-bağımlı yolların germ hücre apoptozunda rol aldığını düşündürmektedir. İlginç olarak, aynı süreçlerde artan AIF’nin sitoplazmik ekspresyonu, normal gelişim sürecinde bu molekülün nükleusa taşınmaması, kaspaz-bağımsız apoptotik yolağın germ hücre apoptozunda rolü olmayabileceğini ve/veya AIF’nin germ hücre farklılaşmasında başka bir role sahip olabileceğini düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Fare testis gelişimi. Kaspaz-3. AIF. PARP.

Assessment of Caspase-Dependent and Caspase-Independent Apoptosis in the Development of Postnatal Mouse Testis

ABSTRACT

Cell death is "caspase-independent" through various proapoptotic factors such as "caspase-dependent" or mitochondrial released Apoptosis-inducing factor (AIF) during testis development. Over-activation of PARP-1 is known to play an important role in "caspase-dependent" cell death, which is unknown in the development of mouse testis. The aim of this study was to examine the expression of apoptotic proteins developmental process of testis. On days 0, 5, 9, 15, and 20 of postnatal (PN) development and adult mouse testis tissues, the levels of PARP-1, cleaved-PARP-1 (cPARP-1), cleaved caspase-3 (cCsp3-3) and AIF proteins were evaluated by western blotting and immunohistochemistry, TUNEL method for germ cell apoptosis. PARP-1 expression continued on all selected days. cPARP-1 and cCsp3-3, PN0, PN5, PN9, and PN15. similar expressions were shown on days. Increased AIF protein levels on PN5, PN9, PN15, PN20 days and adults. cCsp3-3 expression, PN0 and PN5, PN9, PN15 and PN20 intensified in the cytoplasm of spermatogonia and gonocyte. PN5 spermatogonia were TUNEL positive but in PN9, was mainly observed in the meiotic cells. Our findings suggest that caspase-dependent pathways play a role in germ cell apoptosis in the postnatal developmental process. Interestingly, the increased cytoplasmic expression of AIF in the same processes suggests that the caspase-independent apoptotic pathway may not play a role in germ cell apoptosis and/or AIF may have a different role in germ cell differentiation in the normal developmental process.

Key Words: Mouse testis development. Kaspaz-3. AIF. PARP.

Geliş Tarihi: 21 Mayıs 2018

Kabul Tarihi: 13 Temmuz 2018

* 11. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi’nde (16-17 Mayıs 2012, Denizli) sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

Nazlı Ece GÜNGÖR-ORDUERİ
Biruni Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye
Tel.: 0533 668 68 72
E-posta: ece_gunvor@hotmail.com

Kök hücreden itibaren sağlıklı sperm üretilmesi için, embriyonik dönemde hem apoptozu indükleyen hem de hücre devamlılığını/canlılığını sağlayan faktörlerin doğru zamanda ve dengeli bir şekilde ortamda bulunması gerekmektedir. Testis gelişimi sırasında somatik ve germ hücrelerinin proliferasyon ve farklılaşmalarının doğru şekilde gerçekleşmesi normal testis gelişimi ve spermatogenez açısından oldukça önemlidir. Hücre

proliferasyonu mitoz ile belirlendiği gibi dokuda olması gereken hücre sayısı da apoptoz ile belirlenir^{1,2}. Yeni hücreler üretilirken, hücrelerin bir kısmı hücre ölümü ile ortadan kaldırılmakta ve böylece denge korunmaktadır.

Programlanmış hücre ölümü, hücre intiharı, fizyolojik hücre ölümü apoptoz ile aynı anlamda kullanılan terimlerdir^{1,3,4}. Apoptoz genetik olarak kontrol edilen fizyolojik mekanizmalarla düzenlenir⁵. Apoptozun gerçekleşebilmesi için hücre içinde yüksek ATP seviyelerine ihtiyaç vardır ve hücre içi ATP düzeyi hücrenin apoptoz ile ölüp ölmeyeceğine karar verir. Bu da mitokondrinin apoptozun erken fazındaki önemini göstermektedir. Apoptoz, nükleer büzülme ve DNA fragmentasyonu ile karakterizedir^{6,7}. Mitokondri normal şartlar altında ATP oluşturmak üzere sitokrom-c içerir. Mitokondrial stres durumlarında serbestlenen sitokrom-c apoptotik hücre ölümünde kaspaz-3 aktivasyonu için önemli rol oynar⁷⁻¹¹. PARP-1'in nükleer lokalizasyon sinyalleri (NLS) içeren bölgesinden, kaspaz-3 tarafından yarıklanması sonucunda 24 ve 89 kDa'luk iki adet parça oluşur ve bu nedenle cPARP apoptozun biyokimyasal bir belirteci olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Ayrıca PARP-1 aktivasyonu, AIF mitokondriden nükleusa translokasyonundan sorumludur ve AIF, PARP-1 bağımlı hücre ölümünde gereklidir¹². Bilindiği gibi, AIF tarafından indüklenen apoptotik yolak kaspaz bağımsızdır. Dolayısıyla PARP-1 aktivasyonu; hem kaspaz bağımlı hem de AIF-indüklü apoptotik yollarda rol oynayabilir¹³. 2008 yılında Jha ve ekibi tarafından yapılan bir çalışmada, PARP'in apoptotik formunun ejaküle insan spermındaki varlığı ve apoptozla ilişkisi açıklanmıştır³³. Bu araştırmaların sonucunda, PARP'in apoptotik formu olan cPARP'in ejaküle spermatozoada flow-sitometri yöntemiyle belirlenebilecek yeni bir apoptotik belirteç olduğu ve kaspaz-3 aktivasyonu ile ilişkili olabileceği ortaya konmuştur¹⁴. Apoptoz, gelişen testiste etkili spermatogenez ve fertilitenin sağlanması için gerekli olan germ hücre/Sertoli hücresi oranını düzenlediğinden dolayı önemli bir fizyolojik süreçtir¹⁵.

Spermatogenez, fetal hayatta başlayan ve erişkinde devam eden bir süreçtir. Gonad oluşumu sırasında primordiyal germ hücreleri gonositlere farklanır, farklı gonositler bir kaç gün proliferer olduktan sonra G0/G1 fazında mitotik sessizliğe girer. Gonositler, doğumdan sonra spermatogonyal kök hücreyi ve tip A spermatogonyumları oluşturmak üzere yeniden mitoz başlarlar¹⁶. Testis gelişimi sırasında oluşan germ hücre farklılaşma sürecinde hem intrekisik hem de ekstrinsik yolak üzerinden aktive olan apoptoz, fetal dönemde (E12.5-15.5) ve postnatal dönemde (PN5- PN15) artış göstermektedir¹⁵⁻²⁰.

Daha önce yapılan çalışmamızda, erişkin dönemde önemli rolleri olduğu bildirilen PARP-1 proteininin prenatal ve postnatal fare testislerindeki varlığını ve hücre lokalizasyonu göstermiştik³⁴. Bu çalışmamız-

da, testis gelişimindeki apoptoz mekanizmasının PARP-1 ilişkili olabileceğinin, cPARP-1 varlığı ile desteklenmesi ve postnatal testis gelişiminde, kaspaz-bağımlı ve kaspaz-bağımsız apoptotik proteinlerin ekspresyonlarının değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

Gereç ve Yöntem

Deney Hayvanları

Akdeniz Üniversitesi deney hayvanları ünitesinden alınan yetişkin erkek fareler rastgele olarak 9 farklı kafese yerleştirildikten sonra çiftleştirilmiştir. Ertesi gün vajinal plak oluşumu gözlenen dişi fareler gebeliğin 0.gününde kabul edilerek, postnatal gelişim günleri takip edilerek erkek yavru fareler elde edilmiştir. Yavruların elde edildiği günler: PN0. gün (n=6), PN5. gün (n=6), PN9.gün (n=6), PN15. gün (n=6), PN20.gün (n=6) ve erişkin (n=6) olarak sınıflandırılmıştır.

Örneklerin Hazırlanması

Testis dokuları, % 10'luk formalin ile fikse edildikten sonra su ile yıkanma yapılmadan direk olarak %50'lik alkol içine alınmış ve alkol (etil alkol) serilerinden (% 70, 80, 90, 100) geçirilerek dehidrate edilmiştir. Şeffaflaştırma basamağı için iki seri oalcak şekilde 2'şer dakika ksilolde geçirilerek dokuların şeffaflaştırılması sağlanmıştır. Üç seri halinde sıvı parafin (54-60 °C) değiştirilerek ksilol uzaklaştırılmıştır ve parafinin donması ile de dokuların parafin blokları elde edilmiştir. Testis doku kesitleri mikrotom cihazı ile beş mikrometre olacak şekilde alınmıştır.

İmmünohistokimya

Beş mikrometre kalınlığındaki parafin kesitler, bir gece 45°C'lik etüvde bekletilmiştir. Deparafinizasyon için iki kere 10'ar dakika ksilollerden geçirildikten sonra, her birinde beşer dakika olmak kaydıyla % 100, % 90, % 70'lik alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edilmiştir. Daha sonra, distile suda çalkalanarak, tris tamponunda (TT; pH: 7.2-7.4) üç kere beşer dakika yıkanmıştır. Antijenik maskenin giderilmesi amacıyla kesitler 200 ml glisin tamponu (pH:3.5) içerisinde mikrodalga fırında 10 dakika muamele edildikten sonra 20 dakika oda ısısında soğumaya bırakılmıştır. Çevresi hidrofobik kalemle çizilen kesitler, distile su ve TT'ten geçirilmiştir. Endojen peroksidaz aktivitesinin giderilmesi amacıyla %3'lük hidrojen peroksit ile 5 dakika inkübe edilmiştir. Distile suda çalkalanıp TT'te yıkanan kesitler, oda sıcaklığında ve nemli ortamda özgül olmayan immunoglobulin (Ig) bağlanmalarını önlemek amacıyla bloklama serumu (Abcam, #ab80436) ile 7 dakika muamele edilmiştir. Serumun fazlası alındıktan sonra, tavşan poliklonal anti-AIF (Cell Signalling #9642) ile

Postnatal Fare Testis Gelişimi

1:400 oranında oda ısısında gece boyu, tavşan poliklonal anti-cleaved caspase-3 (Cell Signalling #9664L) ile 1:500 oranında oda ısısında gece boyu kesitler inkübe edilmişlerdir. Kesitler, inkübasyon sonunda TT ile üç defa 5'er dakika yıkanmıştır. Daha sonra sırasıyla, 1 saat oda ısısında biyotinli anti-tavşan sekonder antikor (Vector) ile ve önceden 30 dakika oda ısısında bekletilen Vectastain Avidin Biotin Complex kiti (Vector PK-4000) ile 30 dk inkübasyon yapılmıştır. Her iki uygulama sonrasında da, TT ile 3 defa 5'er dakika yıkama yapılmıştır. Sinyali geliştirmek için dokular üç dakika 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) kromojeni (SIGMAFAST Kat No:4168) ile muamele edildikten sonra distile suda yıkanmıştır.

Mayer'in Hematoksilin'inde (Bio-Optika, #05-06002E) 30 saniye zıt boyama yapıldıktan sonra 3'er dk sırasıyla % 70, % 90'lık alkol, 10 dk % 100'lük alkol ve son olarak 5'er dk ksilollerden geçirilerek entellan kapatma solüsyonu ile kapatılmıştır. İmmunohistokimyasal tekniklerle boyanan bütün kesitler Axioplan mikroskopunda (Zeiss) değerlendirilmiştir. Kesitlerden Spot Advance programı aracılığı ile resimler elde edilmiştir.

Poliakrilamid Jel Elektroforezi ve Western Blot

Testis doku örnekleri, 0.2 g dokuya 600 µl "lysis buffer" ve 10 µl proteaz inhibitör kokteyli (Boehringer) olacak şekilde inkübe edilerek homojenize edilmiştir. Numuneler, 15000 g'de, +4 °C'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısımları -20 °C'de saklanmak üzere hazırlanmıştır. Numunelerin protein konsantrasyonlarını belirlemek için BCA (Bicinchoninic Acid) Assay Kit (Sigma Aldrich, Kat No B9643) kullanılmıştır. Her numunede var olan protein miktarı, standartlarla karşılaştırılarak tespit edilmiştir. Jele yüklenen numunelerin her birinin eşit protein miktarı taşınması sağlanacak şekilde hesaplanmıştır. Elektroforezden önce numuneler 5 dakika 100 °C'de suda kaynatılmıştır. Örneklerin hedef proteinlerinin moleküler ağırlıklarına uygun olarak, % 10'luk poliakrilamid jeller hazırlanmıştır. BCA testine göre yapılmış protein konsantrasyonu hesaplamaları baz alınarak her bir antikor için yüklenecek protein konsantrasyonu belirlenmiştir. 50 µg protein yüklenmiştir. Her kuyucuğa 20 mikrolitre numune, protein miktarları eşit olacak şekilde yüklenerek Mini protean sistem III (Biorad) tankının içine yerleştirilmiştir. Mini protean sistem III tankına "yürütme solüsyonu" eklenerek tank güç kaynağına bağlanmıştır. Proteinler güç kaynağı aracılığı ile 80 Volt, 30 Miliamperde 90-100 dakika elektroforez edilmiştir. Bu sırada, PVDF membran (Biorad), üstte ve altta 3'er adet filtre kağıdı olacak şekilde sandviç biçiminde hazırlanmıştır.

Jelde yürütülen proteinler, hazırlanan sandviçte PVDF membran üzerine alınarak tekrar mini protean III sistemindeki tank blot içerisine alınmıştır. Mini pro-

tean III tankına "transfer solüsyonu" eklenerek +4 °C'de gece boyu proteinlerin membrana transfer olması sağlanmıştır. Proteinlerin PVDF membrana transferinden sonra, membran 1 saat süre ile oda ısısında pH'sı 7.2-7.4 olan 0.14 mol/l tris tuz solüsyonu (TT) ile hazırlanan ve ek olarak % 0.1 Tween-20 (Sigma) ilave edilen (TT-T), % 5'lik yağsız kuru süt tozu (Biorad) ile bloklanmıştır. Membranlar, full length PARP-1 (Abcam, #Ab6079), cCsp3-3 (Cell signaling #9664L), AIF (Cell Signalling 9642) için sırasıyla, 1:500 oranında bloklama solüsyonu ile dilue edilmiş antikolarla gece boyu, +4 °C'de, karıştırıcı üzerinde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında TT-T ile 1 saat boyunca 5'er dakikada bir TT-T solüsyonu yenilenecek, yıkama yapılmıştır. Membranlar, 1:5000 oranında bloklama solüsyonu ile dilue edilmiş, peroksidazla işaretlenmiş anti-fare IgG ve peroksidazla işaretlenmiş anti-tavşan IgG (Vector) sekonder antikolarla oda sıcaklığında karıştırıcı üzerinde 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında TT-T ile 30 dakika boyunca 5'er dakikada bir TT-T solüsyonu yenilenecek yıkama yapılmıştır. Membranlar Super Signal Chemiluminisans (CL)-HRP substrat sistemi (Pierce) ile 5 dakika inkübe edildikten sonra karanlık oda içerisinde hiperfilme (Amersham Pharmacia Biotech) aktarılmıştır. Film görüntüleme amacıyla developer ve fiksatiften geçirilmiş ve distile su ile yıkanarak kurutulmuştur. İnternal kontrol olarak, fare monoklonal Beta-aktin antikorunu (Abcam, #Ab6276) kullanılmıştır. Western blot sonuçlarının kantitatif değerlendirmelerini yapmak amacıyla ImageJ programı kullanılmıştır.

TUNEL Metodu

Testis dokusundaki apoptoz, DNA iplikçiklerindeki kırılmaların TUNEL yöntemi ile enzimatik olarak işaretlenmesiyle belirlenmiştir. TUNEL metodu ile işaretleme, hücre ölümü belirleme kiti (Roche, Mannheim, Germany).ile üreticinin önerileri doğrultusunda yapılmıştır. Pozitif yüklü lamlara testis dokusundan 5µm kalınlığında parafin kesitler alınarak kurutulmuş ve kesitler etüvde gece boyu 45 °C'de ve takiben 60 °C'de 1 saat bırakılmıştır. Deparafinizasyon ve rehidratasyondan sonra; lamlar PBS'te iki kere 5 dakika yıkanmıştır. Permeabilizasyon solüsyonu (0.1 % Triton X-100 in 0.1 % sodyum sitrat) ile kesitler +4⁰de 8 dakika inkübe edilmiş ve PBS ile iki kere 5 dakika yıkanmıştır.

Enzimsiz ajan eklenen (sadece işaretleme solüsyonu ve tunel dilüsyon tamponu) negatif kontrol haricinde her kesit için; 50µl enzim solüsyonu ve 450 µl TUNEL işaretleme solüsyonu ve 1000 µl TUNEL dilüsyon tamponu kullanılarak hazırlanan işaretleme reaksiyonu ile 37 °C'de 1 saat nemli ortamda inkübe edilerek gerçekleştirilmiştir. Bu süre sonunda lamlar PBS ile yıkandıktan sonra, dönüştürücü ajan (Conver-

ter-AP) ile 37 °C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Yıkamadan sonra işaretli DNA iplikliği kırıkları içeren hücrelerin lokalizasyonu için renk geliştirme işlemi, kesitleri DAB substrat solüsyonu ile yaklaşık 8-10 dakika inkübe ederek gerçekleştirilmiştir. Ardından Mayer's Hematoksileni ile zıt boyama yapılmıştır.

Apoptotik Hücrelerin Sayımı

Sayım işlemi kesit üzerinde 40X objektif kullanılarak her gruba ait testiste (n=5) homojen boyanmış ve 10x büyütmede rastlantısal seçilmiş olan 100 seminifer tübüldeki kahverengi boyanmış apoptotik germ hücreleri sayıları karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Her testiste tübül başına düşen apoptotik germ hücresi hesaplanarak apoptotik indeks* oluşturulmuştur.

***Apoptotik İndeks;** Tübül başına düşen toplam apoptotik germ hücresi sayısı/ Total sayılan seminifer tübül sayısı oranı olarak grafikte değerlendirilmiştir.

İstatistiksel Analiz

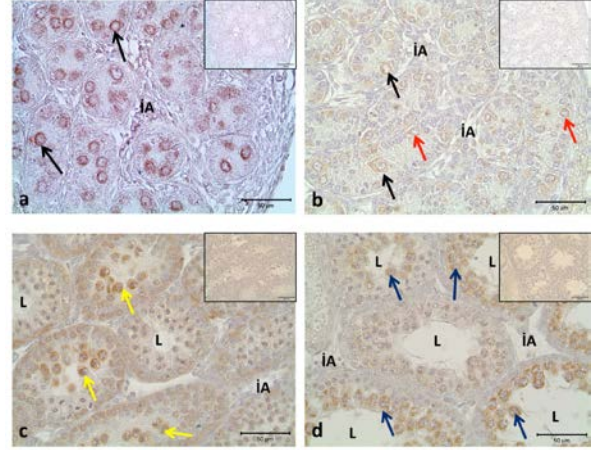
İstatistiksel analiz için SigmaStat 3.5 programı kullanılmıştır. Verilerin analizinde tanımlayıcı analizler kullanılmıştır. Parametrik verilerin analizi için One Way ANOVA testi (PARP-1, cPARP, cKaspaz) ve parametrik olmayan verilerin analizi için One Way ANOVA on Ranks testi (AIF) kullanılmıştır. Çoklu karşılaştırmalarda (Post Hoc Analizler) Tukey testi kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir.

Bulgular

İmmunohistokimya

Postnatal (PN0, PN5, PN9, PN15, PN20) ve erişkin fare testisinde AIF ekspresyonu

PN0. günde gonositlerde sitoplazmik ekspresyonu gösterilmiştir (Şekil. 1a). PN5. günde (Şekil. 1b) lümenenden bazale doğru göç eden ve farklanmalarını sürdüren gonositlerde ve bazalde yer alan spermatogonyumlarda AIF ekspresyonu sitoplazmik olarak devam etmektedir. AIF ekspresyonu, PN9. günde (Şekil. 1c), spermatogonyumlarda ve mayotik primer spermatisitlerde sitoplazmik olarak izlenmektedir. Farede testiküler gelişimde puberteye giriş olarak tanımlanan PN15. günde (Şekil. 1d), AIF mayotik spermatisitlerin sitoplazmalarında eksprese olmaktadır. PN20. günde (Şekil. 2a) spermatisitlerde sitoplazmik ekspresyon görülmektedir. Erişkin fare testisinde ise spermatisitlerin ve yuvarlak spermatidlerin sitoplazmalarında AIF ekspresyonu gözlenmiştir (Şekil. 2b).

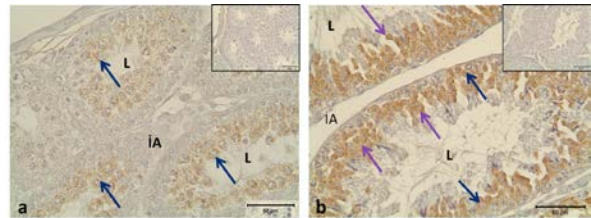


Şekil 1.

PN0 (a), P5 (b), PN9 (c) ve PN 15. günlere (d) ait fare testislerinde (d) AIF ekspresyonları. PN0. günde gonositlerde (siyah oklar), PN5. günde gonositlerin (siyah oklar) ve spermatogonyanın (kırmızı oklar) sitoplazmalarında, PN9. günde, spermatogonya (kırmızı oklar) sitoplazmalarında ve mayotik spermatisitlerde sitoplazmik (sarı oklar), PN15. günde spermatisitlerin sitoplazmalarında (mavi oklar) AIF ekspresyonları gösterilmiştir. İA= İnterstisiyel alan, L: Lümen.

Postnatal (PN0, PN5, PN9, PN15, PN20) ve erişkin fare testisinde cCsp-3 ekspresyonu

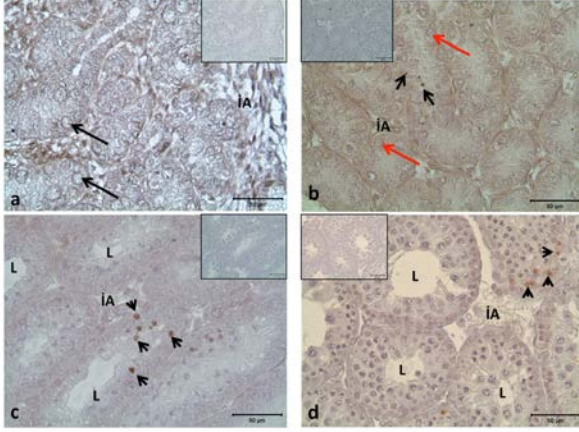
PN0. günde gonositlerde sitoplazmik cCsp-3 ekspresyonu izlenmiştir (Şekil 3a). PN5. günde (Şekil 3b) bazalde yer alan spermatogonyumlarda cCsp-3 ekspresyonu sitoplazmik olarak devam etmektedir. cCsp-3 ekspresyonu, PN9. (Şekil 3c), PN15. (Şekil 3d) ve PN20. (Şekil 4a) günlerde nükleer olarak apoptotik hücrelerde gösterilmiştir. Erişkin fare testisinde spermatisitlerde ekspre olan cCsp-3, aynı zamanda bazı uzayan spermatidlerin başlarında da izlenmiştir (Şekil 4b).



Şekil 2.

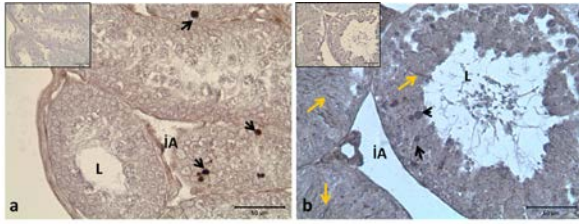
PN20. günde ve erişkin fare testislerinde AIF ekspresyonları. PN20. günde spermatisitlerde (mavi oklar), erişkin testiste, spermatisitlerde (mavi oklar) ve yuvarlak spermatidlerde (mor oklar) AIF ekspresyonları gösterilmiştir. İA= İnterstisiyel alan, L: Lümen.

Postnatal Fare Testis Gelişimi



Şekil 3.

PNO (a), P5 (b), PN9 (c) ve PN15. günlere (d) ait fare testislerinde cCsp3 ekspresyonları. PNO. günde gonosit sitoplazmalarında (siyah oklar), PN5. günde spermatogonya sitoplazmalarında (kırmızı oklar) ve apoptotik hücrelerde (siyah oklar), PN9. ve PN15. günlerde apoptotik hücrelerde (siyah oklar) nükleer ekspresyon gösterilmiştir. İA= İnterstisyel alan, L: Lümen.

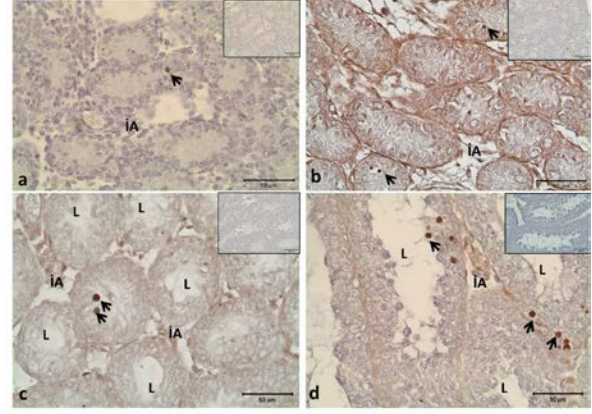


Şekil 4.

PN20. günde ve erişkin fare testislerinde cCsp3 ekspresyonları. PN20. günde apoptotik hücrelerde nükleer ekspresyon, erişkin de ise apoptotik hücreler (siyah oklar) ve uzayan spermatid başlarında (sarı oklar) nükleer ekspresyonu gösterilmiştir. İA= İnterstisyel alan, L: Lümen

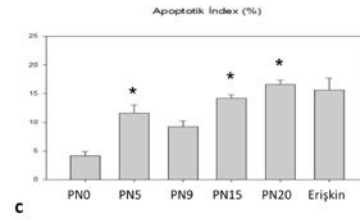
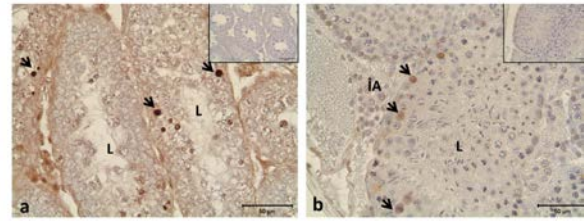
TUNEL

PNO. günde, TUNEL pozitif hücre sayısı az olarak tespit edilmiştir (Şekil 5a). PN5. gün de bazı spermatogonyular TUNEL-pozitif reaksiyon göstermişlerdir (Şekil 5b). PN9. günden (Şekil 5c) itibaren, PN15. (Şekil 5d) ve PN20. (Şekil 6a) günlerde cCsp3 ile paralel olarak mayotik hücrelerde TUNEL reaksiyonu izlenmiştir. Erişkin testiste ise seminifer tübüllerin bazalinde yer alan bazı spermatogonyularda ve bazı mayotik germ hücrelerinde TUNEL pozitifliği gösterilmiştir (Şekil 6b). Tüm seçilen günlere ait testislerin apoptotik hücre sayısı karşılaştırıldığında, anlamlı olarak PN5., PN15 ve PN20. günde artmış apoptozu işaret eden hücre yüzdesi elde edilmiştir (Şekil 6c).



Şekil 5.

PNO (a), P5 (b), PN9 (c) ve PN15. günlere (d) ait fare testislerinde TUNEL boyamaları. TUNEL-pozitif hücreler kısa siyah oklar ile gösterilmiştir. İA= İnterstisyel alan, L: Lümen.



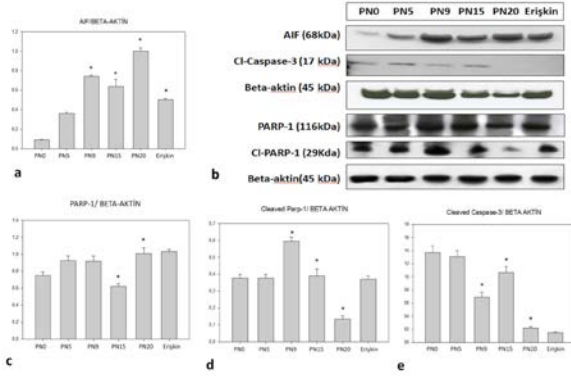
Şekil 6.

PN20. gün (a), erişkin (b) fare testislerinde TUNEL boyamaları, (c) PNO, PN5, PN9, PN15, PN20 ve erişkin fare testislerinde TUNEL pozitif hücre sayısı ile elde edilen apoptotik indeks grafiği. p<0.05 for*. TUNEL-pozitif hücreler kısa siyah oklar ile gösterilmiştir İA= İnterstisyel alan, L: Lümen

Western Blot

Western Blot bulgularımıza göre; "Full length" PARP-1 testis gelişimi süresince genel olarak benzer seviyelerde değişmeden ekspre olurken, PN15. günde ekspresyonunda anlamlı bir azalma izlenmektedir (p<0.05). PARP-1 PN20. günde tekrar artmakta ve erişkinde benzer seviyede ekspresyonunu sürdürmektedir. cPARP-1 ise; PN9. günde anlamlı bir artış gösterir (p<0.05) ve ardından PN15. günde anlamlı olarak ekspresyonu düşer (p<0.05). PN20. günde tekrar azalan cPARP-1 ekspresyonu, erişkin testiste tekrar artan bir ekspresyon gösterir. cCsp3 PN9. günde, PN5. güne göre anlamlı olarak azalır (p<0.05) ve PN15. günde belirgin olarak ekspresyonu artar. PN20. günde cCsp3 ekspresyonu anlamlı olarak azalır (p<0.05) ve

erişkin testiste bu seyide ekspre olmaya devam eder. Son olarak; AIF ekspresyonu PN5. ve PN9. günlerde anlamlı olarak artar ve PN20. günde en yüksek ekspresyon seviyesini gösterir ($p<0.05$). Erişkinde de PN20. güne kıyasla daha düşük ancak yine de belli bir düzeyde eksprese olur (Şekil 7).



Şekil 7.

PN0, PN5, PN9, PN 15, PN20. günlerde ve erişkin fare testistlerinde, AIF, cCsp-3, PARP-1, cPARP-1 protein düzeyleri. Beta-aktin (B-aktin) internal standart olarak kullanılmıştır. $p<0.05$ for*.

Tartışma

Apoptoz programlı ve kontrollü hücre ölümüdür ve hasarlı hücrelerin ayıklanmasında rol oynar²¹. Bazı gen ve mediyatörlerle kontrol edilen apoptoz mekanizması henüz tam anlaşılabilir olmakla beraber, bazı fizyolojik olaylar ya da patolojik durumların etkisi ile artar veya azalır. Normal spermatogenezde ve testiküller gelişim sürecinde hemen hemen her basamakta apoptoz sık görülür²². Normal testis gelişimi; sadece fertil bir gonadın oluşumu için değil aynı zamanda gelişim sürecinden sapmamış bir gonad farklılaşması için de ön koşuldur. Germ hücre tümörlerinin ortaya çıkış mekanizmasının, fetal ve neonatal hayatta gonosit proliferasyonundaki ve farklılaşmasındaki bozukluklardan kaynaklandığı düşünülmektedir²³. Bu nedenle, testis gelişimi sırasında somatik ve germ hücrelerin proliferasyon ve farklılaşmalarının doğru şekilde gerçekleşmesi, normal testis gelişimi açısından önemlidir. Bulgularımız, postnatal gelişim sürecinde doğumdan sonra esasen kaspaz-bağımlı yolların germ hücre apoptozunda rol aldığını düşündürmektedir. Çünkü, aynı süreçlerde AIF'nin artarak devam eden sitoplazmik ekspresyonu, normal gelişim sürecinde bu molekülün nükleusa taşınmaması, kaspaz-bağımsız apoptotik yolağın germ hücre apoptozunda rolü olmayabileceğini ve/veya AIF'nin germ hücre farklılaşmasında başka bir role sahip olabileceğini akla getirmektedir. AIF'nin mitokondriyonükleer translokasyonu, DNA-hasarına duyarlı ajanlara cevap olarak gerçekleşir^{24,25}. DNA hasarı hücrede yüksek seviyeye ulaştığında PARP-1'in aktive olduğu bilinmektedir²⁶⁻²⁸. Ardından,

PARP-1 tarafından PAR'ın aşırı sentezi gerçekleşmekte ve PAR polimerlerinin üretimi de hücrede mitokondriyal NAD⁺ ve ATP'nin aşırı tüketilmesine yol açmaktadır^{29,30}. Böylece, hücredeki enerji derecesine bağlı olarak apoptotik ölüm yolları aktive olmaktadır³¹. PARP-1 apoptozda iki şekilde rol alır;¹ Kaspaz-bağımlı yolağ² Kaspaz-bağımsız yolağ. Kaspaz-bağımlı yolağta; PARP-1 aşırı aktive olmakta ve mitokondriden sitokrom c salınarak kaspaz-3'ü aktive etmektedir. Aktive olan kaspaz-3 PARP-1'i otomodifikasyon domeyninden keserek, yarıklanmış (cleaved) PARP-1 formunu oluşturmaktadır. Ve sonuç olarak apoptotik hücre ölümü gerçekleşmektedir. PARP-1'in apoptotik yolağla ilgisi apoptoz indükleyici faktör (AIF) ile kaspaz-bağımsız olarak da gerçekleşmektedir. Bu durumda ise, aşırı PARP aktivasyonu AIF'yi mitokondriden nükleusa taşımaktadır ve apoptozla ilişkili genlerin ekspresyonunu indüklemektedir. Yine ortaya çıkan ölüm şekli, apoptozdur. Bu çalışmada; postnatal testis gelişim sürecinde erişkin testis oluşuncaya kadar PARP-1'in "full length" formu genel olarak değişmeden sabit bir ekspresyon göstermektedir. Ancak; PARP-1 testis gelişim sürecinde eksprese olurken, mayoz bölünmelerin başladığı ve ilerlediği PN15. ve PN20. günlerde önce azalma ardından artış şeklinde bir dalgalanma gösterir. Buna paralel olarak; yükselen PARP-1 seviyesi cCsp-3'ün (yani full length PARP-1'i yarıklayan aktif kaspaz 3) PN15. günde anlamlı olarak artması sonucunda azalarak, yine azalmış düzeyde cleaved-PARP-1 ekspresyonuna neden oluyor olabilir. cCsp-3 PN20. günden itibaren daha düşük ekspresyon seviyesini korurken, aynı şekilde PN20. günde azalan c-PARP-1 ekspresyonu erişkin testiste tekrar bir artış gösterir. Bu şekilde dalgalanmalar gösteren PARP-1 ve cCsp-3 ekspresyonları; testis gelişim sürecinde hücreler çoğalırken ve farklılaşırken oluşan DNA kırıklarına karşı aktive olan PARP-1'in aşırı aktivasyonunu engelleyerek, dengeli bir düzeyde eksprese olmasına neden oluyor ve kontrol ediyor olabilir. Testis gelişim sürecinde esasen PN5. günde artan ve daha sonraki gelişim günlerinde benzer oranda kalan apoptotik germ hücresi sayısı da bu bulgularımızı destekler niteliktedir. Tüm bunlara karşılık, giderek artan seviyelerde eksprese olan AIF en belirgin artışını PN20. günde göstermektedir. AIF'nin apoptoz süreçlerinde yer alması için nükleusa taşınması gerekirken, tüm testis gelişimi sürecinde sitoplazmik ekspresyonu dikkat çekicidir. Bu bulgumuz, AIF'nin testis gelişim sürecinde kaspaz-bağımsız apoptozdan ziyade farklı bir rolü olabileceğini düşündürmektedir.

Kontrol altında tutulan PARP-1 aktivasyonu sebebiyle AIF'nin nükleusa taşınmasını engelliyor olabilir. Literatürde, AIF'nin sitoplazmik ekspresyonunun mitokondriyal solunum ile ilişkili önemli rolleri olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur³². Çalışmamız, testis gelişim sürecinde apoptoz ile ilişkili proteinlerin kapsamlı olarak değerlendirildiği literatürdeki ilk çalışmadır. *Ex vivo* gonad kültürlerinde bu yolların inhibe

Postnatal Fare Testis Gelişimi

edilerek fonksiyonlarının belirlenmesiyle ilgili çalışmalar planlanması bu bulgularımızdan sonra önemli araştırma konuları olarak karşımıza çıkmaktadır.

Teşekkür

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi tarafından desteklenmiştir.

Kaynaklar

1. Bellamy, C.O., et al., Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. *Semin Cancer Biol*, 1995. 6(1): p. 3-16.
2. Cummings, M.C., C.M. Winterford, and N.I. Walker, Apoptosis. *Am J Surg Pathol*, 1997. 21(1): p. 88-101.
3. Majno, G. and I. Joris, Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol*, 1995. 146(1): p. 3-15.
4. Schwartzman, R.A. and J.A. Cidlowski, Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocr Rev*, 1993. 14(2): p. 133-51.
5. Cohen, J.J., Apoptosis. *Immunol Today*, 1993. 14(3): p. 126-30.
6. Gavrieli, Y., Y. Sherman, and S.A. Ben-Sasson, Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*, 1992. 119(3): p. 493-501.
7. Lu, J., K.W. Ashwell, and P. Waite, Advances in secondary spinal cord injury: role of apoptosis. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2000. 25(14): p. 1859-66.
8. Crowe, M.J., et al., Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys. *Nat Med*, 1997. 3(1): p. 73-6.
9. Li, M., et al., Functional role of kaspaz-1 and kaspaz-3 in an ALS transgenic mouse model. *Science*, 2000. 288(5464): p. 335-9.
10. Lou, J., et al., Apoptosis as a mechanism of neuronal cell death following acute experimental spinal cord injury. *Spinal Cord*, 1998. 36(10): p. 683-90.
11. Takagi, T., et al., Kaspaz activation in neuronal and glial apoptosis following spinal cord injury in mice. *Neurol Med Chir (Tokyo)*, 2003. 43(1): p. 20-9; discussion 29-30.
12. Susin, S.A., et al., Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, 1999. 397(6718): p. 441-6.
13. Petrilli, V., et al., Noncleavable poly(ADP-ribose) polymerase-1 regulates the inflammation response in mice. *J Clin Invest*, 2004. 114(8): p. 1072-81.
14. Mahfouz, R.Z., et al., Evaluation of poly(ADP-ribose) polymerase cleavage (cPARP) in ejaculated human sperm fractions after induction of apoptosis. *Fertil Steril*, 2009. 91(5 Suppl): p. 2210-20.
15. Rodriguez, I., et al., An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *EMBO J*, 1997. 16(9): p. 2262-70.
16. de Rooij, D.G. and J.A. Grootegoed, Spermatogonial stem cells. *Curr Opin Cell Biol*, 1998. 10(6): p. 694-701.
17. Furuchi, T., et al., Inhibition of testicular germ cell apoptosis and differentiation in mice misexpressing Bcl-2 in spermatogonia. *Development*, 1996. 122(6): p. 1703-9.
18. Knudson, C.M., et al., Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science*, 1995. 270(5233): p. 96-9.
19. Lizama, C., et al., Up-regulation of CD95 (Apo-1/Fas) is associated with spermatocyte apoptosis during the first round of spermatogenesis in the rat. *Apoptosis*, 2007. 12(3): p. 499-512.
20. Wang, R.A., P.K. Nakane, and T. Koji, Autonomous cell death of mouse male germ cells during fetal and postnatal period. *Biol Reprod*, 1998. 58(5): p. 1250-6.
21. Goyal, G., et al., Role of mitochondrial remodeling in programmed cell death in *Drosophila melanogaster*. *Dev Cell*, 2007. 12(5): p. 807-16.
22. Gassei, K. and S. Schlatt, Testicular morphogenesis: comparison of in vivo and in vitro models to study male gonadal development. *Ann N Y Acad Sci*, 2007. 1120: p. 152-67.
23. Mego, M., Cancer stem cell in relapsed testicular germ cell cancer: embryonic or somatic? *Int J Androl*, 2006. 29(6): p. 627.
24. Cande, C., et al., Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel kaspaz-independent death effector released from mitochondria. *Biochimie*, 2002. 84(2-3): p. 215-22.
25. Cande, C., et al., Apoptosis-inducing factor (AIF): kaspaz-independent after all. *Cell Death Differ*, 2004. 11(6): p. 591-5.
26. Ha, H.C. and S.H. Snyder, Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(24): p. 13978-82.
27. de Murcia, G. and J. Menissier de Murcia, Poly(ADP-ribose) polymerase: a molecular nick-sensor. *Trends Biochem Sci*, 1994. 19(4): p. 172-6.
28. Berger, N.A., Poly(ADP-ribose) in the cellular response to DNA damage. *Radiat Res*, 1985. 101(1): p. 4-15.
29. Burkle, A., Poly (ADP-Ribosyl)ation. 2006, Konstanz, Germany: Landes Bioscience.
30. Kim, M.Y., T. Zhang, and W.L. Kraus, Poly(ADP-ribosyl)ation by PARP-1: 'PAR-laying' NAD⁺ into a nuclear signal. *Genes Dev*, 2005. 19(17): p. 1951-67.
31. Burkle, A., Poly(ADP-ribose). The most elaborate metabolite of NAD⁺. *Febs J*, 2005. 272(18): p. 4576-89.
32. Hangen, E., et al., Life with or without AIF. *Trends Biochem Sci*, 2010. 35(5): p. 278-87.
33. Jha, R., et al., Determination of Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) homologues in human ejaculated sperm and its correlation with sperm maturation. *Fertil Steril*. 2009 Mar; 91(3):782-90.
34. Gungor, Ordueri, N.E., et al., The expression pattern of PARP-1 and PARP-2 in the developing and adult mouse testis. *Acta Histochem*. 2014 Jun;116(5):958-64.

